PROCESOS PARA LA PRODUCCIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR Y USOS DE ESTOS EN INMUNOTERAPIA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. Núm. 62/775 954, presentada el 5 de noviembre de 2018 y la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. Núm. 62/903 585, presentada el 20 de septiembre de 2019, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El tratamiento de cánceres voluminosos y refractarios mediante el uso de la transferencia adoptiva de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) representa un poderoso enfoque terapéutico para pacientes con mal pronóstico. Gattinoni, *y otros, Nat. Rev. Immunol.* **2006,** *6,* 383-393. Se requiere una gran cantidad de TIL para una inmunoterapia exitosa, y se necesita un proceso robusto y confiable para su comercialización. Esto ha sido un desafío de lograr debido a problemas técnicos, logísticos y regulatorios con la expansión celular. La expansión de TIL basada en IL-2 seguida de un "proceso de expansión rápida" (REP) se ha convertido en un método preferido para la expansión de TIL debido a su velocidad y eficiencia. Dudley, *y otros*, *Science* **2002,** *298,* 850-54; Dudley, *y otros*, *J. Clin. Oncol.* **2005,** *23,* 2346-57; Dudley, *y otros*, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26,* 5233-39; Riddell, *y otros, Science* **1992,** *257,* 238-41; Dudley, *y otros*, *J. Immunother.* **2003**, *26,* 332-42. El REP puede resultar en una expansión de TIL de 1000 veces durante un período de 14 días, aunque requiere un gran exceso (por ejemplo, 200 veces) de células mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (PBMC, también conocidas como células mononucleares (MNC)), a menudo de múltiples donantes, como células alimentadoras, así como también de anticuerpos anti-CD3 (OKT3) y altas dosis de IL-2. Dudley, y otros, *J. Immunother.* **2003,** *26,* 332-42. Los TIL que se han sometido a un procedimiento de REP han producido una terapia celular adoptiva exitosa después de la inmunosupresión del hospedero en pacientes con melanoma. Los parámetros actuales de aceptación de la infusión dependen de las lecturas de la composición de los TIL (por ejemplo, positividad para CD28, CD8 o CD4) y en las veces de expansión y viabilidad del producto del REP.

Los procesos actuales de producción de TIL están limitados por la duración, el costo, las preocupaciones de esterilidad y otros factores descritos en la presente descripción. Existe una necesidad urgente de proporcionar procesos de producción de TIL y terapias basadas en tales procesos que se caracterizan por una mejor rentabilidad y escalabilidad en la producción y fenotipos antineoplásicos más potentes de preparaciones de TIL producidas para el tratamiento de pacientes humanos en múltiples centros clínicos. La presente invención satisface esta necesidad porque proporciona un proceso novedoso de expansión de TIL que incluye células presentadoras de antígenos alimentadoras desde el inicio de la expansión, con el propósito de sensibilizar los TIL para la expansión, en lugar de una etapa de expansión tradicional previo al REP, por lo tanto, permite una reducción sustancial del tiempo total para el proceso de expansión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona métodos mejorados y/o abreviados para expandir TIL y producir poblaciones terapéuticas de TIL.

La presente invención proporciona un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:

(a) obtener y/o recibir una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto mediante el procesamiento de una muestra de tumor que se obtiene del sujeto en múltiples fragmentos tumorales;

(b) realizar una primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, opcionalmente OKT-3 y, opcionalmente, células presentadoras de antígeno (APC) para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza en un recipiente que comprende una primera área de superficie permeable a los gases, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza durante un primer período de aproximadamente 1 a 7/8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es mayor en número que la primera población de TIL;

(c) realizar una segunda expansión rápida mediante el suplemento al medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y APC adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida es al menos el doble del número de APC añadidas en la etapa (b), en

donde la segunda expansión rápida se realiza durante un segundo período de aproximadamente 1 a 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza en un recipiente que comprende una segunda área de superficie permeable a los gases;

(d) cosechar la población terapéutica de TIL que se obtiene en la etapa (c); y

(e) transferir la población de TIL cosechada de la etapa (d) a una bolsa de infusión.

La presente invención proporciona un método A para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:

(a)obtener y/o recibir una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto mediante el procesamiento de una muestra de tumor que se obtiene del sujeto, en múltiples fragmentos tumorales;

(b)realizar una primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, opcionalmente OKT-3 y, opcionalmente, que comprende células presentadoras de antígeno (APC), para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza durante un primer período de aproximadamente 1 a 7/8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es mayor en número que la primera población de TIL;

(c)realizar una segunda expansión rápida al poner en contacto la segunda población de TIL con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y APC, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza durante un segundo período de aproximadamente 1 a 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL; y

(d)cosechar la población terapéutica de TIL que se obtiene en la etapa (c).

En algunas modalidades, "obtener" indica que los TIL empleados en el método y/o proceso pueden derivarse directamente de la muestra (que incluye una resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia con aguja gruesa, biopsia pequeña u otra muestra) como parte del método y/o etapas del proceso. En algunas modalidades, "recibir" indica que los TIL empleados en el método y/o proceso pueden derivarse indirectamente de la muestra (que incluye una resección quirúrgica, biopsia con aguja, biopsia con aguja gruesa, biopsia pequeña u otra muestra) y después emplearse en el método y/o proceso (por ejemplo, donde comienza la etapa (a), los TIL que ya se han derivado de la muestra

mediante un proceso separado no incluido en la parte (a), tales TIL podrían denominarse "recibidos").

En algunas modalidades del método, en la etapa (b) el medio de cultivo celular comprende, además, células presentadoras de antígeno (APC), y en donde el número de APC en el medio de cultivo en la etapa (c) es mayor que el número de APC en el medio de cultivo en la etapa (b).

La presente invención proporciona un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:

(a) realizar una primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de una primera población de TIL, dicha primera población de TIL se obtiene mediante el procesamiento de una muestra tumoral de un tumor extirpado de un sujeto, en múltiples fragmentos tumorales, en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, opcionalmente OKT-3 y, opcionalmente, células presentadoras de antígeno (APC) para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza en un recipiente que comprende una primera área de superficie permeable a los gases, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza durante el primer período de aproximadamente de 1 a 7/8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es mayor en número que la primera población de TIL;
(b) realizar una segunda expansión rápida poniendo en contacto la segunda población de TIL con un medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y APC adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde el número de APC en la segunda expansión rápida es al menos el doble del número de APC en la etapa (a), en donde la segunda expansión rápida se realiza durante un segundo período de aproximadamente 1 a 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza en un recipiente que comprende una segunda área de superficie permeable a los gases; y
(c) cosechar la población terapéutica de TIL que se obtiene en la etapa (b).
La presente invención proporciona, además, un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende:

(a) realizar una primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de una primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, opcionalmente OKT-3 y, opcionalmente, que comprende células presentadoras de

antígeno (APC), para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza durante un primer período de aproximadamente 1 a 7/8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es mayor en número que la primera población de TIL;

(b) realizar una segunda expansión rápida poniendo en contacto la segunda población de TIL con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y APC, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza durante un segundo período de aproximadamente 1 a 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL; y

(c) cosechar la población terapéutica de TIL que se obtiene en la etapa (b).

En algunas modalidades del método, en la etapa (a) el medio de cultivo celular comprende, además, células presentadoras de antígeno (APC), y en donde el número de APC en el medio de cultivo en la etapa (c) es mayor que el número de APC en el medio de cultivo en la etapa (b).

En algunas modalidades, la relación entre el número de APC en la segunda expansión rápida y el número de APC en la primera expansión con sensibilización se selecciona de un intervalo de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 20:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de APC en la segunda expansión rápida y el número de APC en la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 10:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de APC en la segunda expansión rápida y el número de APC en la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de APC en la segunda expansión rápida y el número de APC en la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de APC en la segunda expansión rápida y el número de APC en la primera expansión con sensibilización es de aproximadamente 2:1.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización se selecciona del intervalo de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente

4,5 × 10^6 APC/cm^2, y en donde el número de APC en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 2,5 x 10^6 APC/cm^2 a aproximadamente 7,5 x 10^6 APC/cm^2.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización se selecciona del intervalo de aproximadamente 1,5 x 10^6 APC/cm^2 a aproximadamente 3,5 x 10^6 APC/cm^2, y en donde el número de APC en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 3,5 x 10^6 APC/cm^2 a aproximadamente 6,0 x 10^6 APC/cm^2.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización se selecciona del intervalo de aproximadamente 2,0 x 10^6 APC/cm^2 a aproximadamente 3,0 x 10^6 APC/cm^2, y en donde el número de APC en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 4,0 x 10^6 APC/cm^2 a aproximadamente 5,5 x 10^6 APC/cm^2.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización se selecciona del intervalo de aproximadamente 1 × 10^8 APC a aproximadamente 3,5 × 10^8 APC, y en donde el número de APC en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 3,5 × 10^8 APC a aproximadamente 1 × 10^9 APC.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización se selecciona del intervalo de aproximadamente 1,5 × 10^8 APC a aproximadamente 3 × 10^8 APC, y en donde el número de APC en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 4 × 10^8 APC a aproximadamente 7,5 × 10^8 APC.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización se selecciona del intervalo de aproximadamente 2 × 10^8 APC a aproximadamente 2,5 × 10^8 APC, y en donde el número de APC en la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 4,5 × 10^8 APC a aproximadamente 5,5 × 10^8 APC.

En algunas modalidades, aproximadamente 2,5 × 10^8 APC se añaden a la primera expansión con sensibilización y 5 × 10^8 APC se añaden a la segunda expansión rápida.

En algunas modalidades, la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 100:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 50:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 25:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 20:1.

En algunas modalidades, la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 10:1.

En algunas modalidades, la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL.

En algunas modalidades, el método comprende realizar, después de la etapa de cosechar la población terapéutica de TIL, la etapa adicional de:

transferir la población terapéutica cosechada de TIL a una bolsa de infusión.

En algunas modalidades, los múltiples fragmentos tumorales se distribuyen en una pluralidad de recipientes separados, en cada uno de los recipientes separados se obtiene la segunda población de TIL a partir de la primera población de TIL en la etapa de primera expansión con sensibilización, y la tercera población de TIL se obtienen a partir de la segunda población de TIL en la etapa de la segunda expansión rápida, y en donde la población terapéutica de TIL que se obtiene a partir de la tercera población de TIL se recolecta de cada uno de la pluralidad de recipientes y se combina para producir la población de TIL cosechada.

En algunas modalidades, la pluralidad de recipientes separados comprende al menos dos recipientes separados.

En algunas modalidades, la pluralidad de recipientes separados comprende de dos a veinte recipientes separados.

En algunas modalidades, la pluralidad de recipientes separados comprende de dos a diez recipientes separados.

En algunas modalidades, la pluralidad de recipientes separados comprende de dos a cinco recipientes separados.

En algunas modalidades, cada uno de los recipientes separados comprende una primera área de superficie permeable a los gases.

En algunas modalidades, los múltiples fragmentos tumorales se distribuyen en un solo recipiente.

En algunas modalidades, el único recipiente comprende una primera área de superficie permeable a los gases.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización el medio de cultivo celular comprende células presentadoras de antígeno (APC) y las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente una capa celular a aproximadamente tres capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1,5 capas celulares a aproximadamente 2,5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la segunda expansión rápida, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor de aproximadamente 3 capas celulares a aproximadamente 5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la segunda expansión rápida, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor de aproximadamente 3,5 capas celulares a aproximadamente 4,5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la segunda expansión rápida las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor de aproximadamente 4 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización, la primera expansión con sensibilización se realiza en un primer recipiente que comprende una primera área de superficie permeable a los gases y en la etapa de la segunda expansión rápida, la segunda expansión rápida se realiza en un segundo recipiente que comprende segunda superficie permeable a los gases.

En algunas modalidades, el segundo recipiente es más grande que el primer recipiente.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización el medio de cultivo celular comprende células presentadoras de antígeno (APC) y las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente una capa celular a aproximadamente tres capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1,5 capas celulares a aproximadamente 2,5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas celulares.

En algunas modalidades, en la segunda expansión rápida las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas celulares a aproximadamente 5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la segunda expansión rápida las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3,5 capas celulares a aproximadamente 4,5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la segunda expansión rápida, las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas celulares.

En algunas modalidades, para cada recipiente en donde se realiza la primera expansión con sensibilización en una primera población de TIL, la segunda expansión rápida se realiza en el mismo recipiente sobre la segunda población de TIL que se produce a partir de dicha primera población de TIL.

En algunas modalidades, cada recipiente comprende una primera área de superficie permeable a los gases.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización el medio de cultivo celular comprende células presentadoras de antígeno (APC) y las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un

grosor promedio de aproximadamente una capa celular a aproximadamente tres capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1,5 capas celulares a aproximadamente 2,5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la segunda expansión rápida, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas celulares a aproximadamente 5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la segunda expansión rápida, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3,5 capas celulares a aproximadamente 4,5 capas celulares.

En algunas modalidades, en la etapa de la segunda expansión rápida, las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas celulares.

En algunas modalidades, en donde para cada recipiente en el que se realiza la primera expansión con sensibilización en una primera población de TIL en la etapa de la primera expansión con sensibilización, el primer recipiente comprende una primera área de superficie, el medio de cultivo celular comprende células presentadoras de antígeno (APC), y las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases, y en donde la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:10.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número

promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,2 a aproximadamente 1:8.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,3 a aproximadamente 1:7.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,4 a aproximadamente 1:6.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:5.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,6 a aproximadamente 1:4.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,7 a aproximadamente 1:3,5.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,8 a aproximadamente 1:3.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida se selecciona del intervalo de aproximadamente 1:1,9 a aproximadamente 1:2,5.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el número

promedio de capas de APC dispuestas en capas en la etapa de la segunda expansión rápida es de aproximadamente 1:2.

En algunas modalidades, después de 2 a 3 días en la etapa de la segunda expansión rápida, el medio de cultivo celular se suplementa con IL-2 adicional.

En algunas modalidades, el método comprende, además, crioconservar la población de TIL cosechada en la etapa de cosechar la población terapéutica de TIL mediante el uso de un proceso de crioconservación.

En algunas modalidades, el método comprende, además, la etapa de crioconservar la bolsa de infusión.

En algunas modalidades, el proceso de crioconservación se realiza mediante el uso de una relación 1:1 de la población de TIL cosechada con respecto al medio de crioconservación.

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígenos son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En algunas modalidades, las PBMC son irradiadas y alogénicas.

En algunas modalidades, en la etapa de la primera expansión con sensibilización el medio de cultivo celular comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y en donde el número total de PBMC añadidas al medio de cultivo celular en la etapa de la primera expansión con sensibilización es aproximadamente $2,5 \times 10^8$.

En algunas modalidades, en la etapa de la segunda expansión rápida las células presentadoras de antígeno (APC) en el medio de cultivo celular son células mononucleares de sangre periférica (PBMC), y en donde el número total de PBMC añadidas al medio de cultivo celular en la etapa de la segunda expansión rápida es de aproximadamente 5×10^8.

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno son células presentadoras de antígeno artificiales.

En algunas modalidades, la cosecha en la etapa de cosechar la población terapéutica de TIL se realiza mediante el uso de un sistema de procesamiento celular basado en membranas.

En algunas modalidades, la cosecha en la etapa de cosecha de la población terapéutica de TIL se realiza mediante el uso de un sistema de procesamiento de células LOVO.

En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa de la primera expansión con sensibilización, en donde cada fragmento tiene un volumen de aproximadamente 27 mm^3.

En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1300 mm^3 a aproximadamente 1500 mm^3.

En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1350 mm^3.

En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con una masa total de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 1,5 gramos.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular se proporciona en un recipiente seleccionado del grupo que consiste en un recipiente G y una bolsa de células Xuri.

En algunas modalidades, la concentración de IL-2 es de aproximadamente 10 000 UI/ml a aproximadamente 5000 UI/ml.

En algunas modalidades, la concentración de IL-2 es de aproximadamente 6000 UI/ml.

En algunas modalidades, la bolsa de infusión en la etapa de transferir la población terapéutica de TIL cosechada hacia una bolsa de infusión es una bolsa de infusión que contiene HypoThermosol.

En algunas modalidades, el medio de crioconservación comprende dimetilsulfóxido (DMSO).

En algunas modalidades, el medio de crioconservación comprende de 7 % a 10 % de DMSO.

En algunas modalidades, el primer período en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el segundo período en la etapa de la segunda expansión rápida se realizan cada uno individualmente dentro de un período de 5 días, 6 días o 7 días.

En algunas modalidades, el primer período en la etapa de la primera expansión con sensibilización se realiza dentro de un período de 5 días, 6 días o 7 días.

En algunas modalidades, el segundo período en la etapa de la segunda expansión rápida se realiza dentro de un período de 7 días, 8 días o 9 días.

En algunas modalidades, el primer período en la etapa de la primera expansión con sensibilización y el segundo período en la etapa de la segunda expansión rápida se realizan cada uno individualmente dentro de un período de 7 días.

En algunas modalidades, las etapas de la primera expansión con sensibilización hasta la cosecha de la población terapéutica de TIL se realizan dentro de un período de aproximadamente 14 días a aproximadamente 16 días.

En algunas modalidades, las etapas de la primera expansión con sensibilización hasta la cosecha de la población terapéutica de TIL se realizan dentro de un período de aproximadamente 15 días a aproximadamente 16 días.

En algunas modalidades, las etapas de la primera expansión con sensibilización hasta la cosecha de la población terapéutica de TIL se realizan en un período de aproximadamente 14 días.

En algunas modalidades, las etapas de la primera expansión con sensibilización hasta la cosecha de la población terapéutica de TIL se realizan dentro de un período de aproximadamente 15 días.

En algunas modalidades, las etapas de la primera expansión con sensibilización hasta la cosecha de la población terapéutica de TIL se realizan dentro de un período de aproximadamente 16 días.

En algunas modalidades, el método comprende, además, la etapa de crioconservar la población terapéutica de TIL cosechada mediante el uso de un proceso de crioconservación, en donde las etapas de la primera expansión con sensibilización hasta la cosecha de la población terapéutica de TIL y crioconservación se realizan en 16 días o menos.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL cosechada en la etapa de cosecha de la población terapéutica de TIL comprende suficientes TIL para una dosificación con eficacia terapéutica de los TIL.

En algunas modalidades, el número de TIL suficientes para una dosificación con eficacia terapéutica es de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ a aproximadamente $13,7 \times 10^{10}$.

En algunas modalidades, la tercera población de TIL en la etapa de la segunda expansión rápida proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal.

En algunas modalidades, la tercera población de TIL en la etapa de la segunda expansión rápida proporciona al menos una producción de interferón gamma de una a cinco veces o más en comparación con las TIL preparadas mediante un proceso de más de 18 días.

En algunas modalidades, las células T efectoras y/o las células T de memoria central que se obtienen de la tercera población de TIL en la etapa de la segunda expansión rápida exhiben una expresión aumentada de CD8 y CD28 con respecto a las células T efectoras y/o las células T de memoria central que se obtienen de la segunda población de TIL en la etapa de la primera expansión con sensibilización.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL de la etapa de cosecha de la población terapéutica de TIL se infunde en un paciente.

La presente invención proporciona, además, un método para tratar a un sujeto con cáncer, el método comprende la administración de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) expandidos que comprende:

(a) obtener y/o recibir una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto mediante el procesamiento de una muestra de tumor que se obtiene del sujeto en múltiples fragmentos tumorales;
(b) realizar una primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, opcionalmente OKT-3 y, opcionalmente, células presentadoras de antígeno (APC) para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza en un recipiente que comprende una primera área de superficie permeable a los gases, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza durante aproximadamente 1 a 7/8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es al menos 50 veces mayor en número que la primera población de TIL;
(c) realizar una segunda expansión rápida suplementando el medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y APC adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde el número de APC añadidas a la segunda expansión rápida es al menos el doble del número de APC añadidas en la etapa (b), en donde la segunda expansión rápida se realiza durante aproximadamente 1 a 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza en un recipiente que comprende una segunda área de superficie permeable a los gases;
(d) cosechar la población terapéutica de TIL que se obtiene en la etapa (c);

(e) transferir la población de TIL cosechada de la etapa (d) a una bolsa de infusión; y
(f) administrar una dosis con eficacia terapéutica de los TIL de la etapa (e) al sujeto.
En algunas modalidades, el número de TIL suficientes para administrar una dosis con eficacia terapéutica en la etapa (f) es de aproximadamente 2,3 x 10^{10} a aproximadamente 13,7 x 10^{10}.

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno (APC) son PBMC.

En algunas modalidades, antes de administrar una dosis con eficacia terapéutica de células TIL en la etapa (f), se ha administrado al paciente un régimen de linfodepleción no mielosupresora.

En algunas modalidades, el régimen de linfodepleción no mielosupresora comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguido de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

En algunas modalidades, el método comprende, además, la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 de dosis alta que comienza el día después de la administración de las células TIL al paciente en la etapa (f).

En algunas modalidades, el régimen de IL-2 de dosis alta comprende 600 000 o 720 000 UI/kg administradas como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

En algunas modalidades, la tercera población de TIL en la etapa (b) proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón-gamma y/o una mayor diversidad clonal.

En algunas modalidades, la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona al menos una producción de interferón gamma de una a cinco veces o más en comparación con las TIL preparadas mediante un proceso de más de 16 días.

En algunas modalidades, las células T efectoras y/o las células T de memoria central que se obtiene de la tercera población de TIL en la etapa (c) exhiben una expresión aumentada de CD8 y CD28 con respecto a las células T efectoras y/o las células T de memoria central que se obtienen de la segunda población de células en la etapa (b).

En algunas modalidades, el cáncer es un tumor sólido.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal.

En algunas modalidades, el cáncer es melanoma.

En algunas modalidades, el cáncer es HNSCC.

En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de cuello uterino.

En algunas modalidades, el cáncer es NSCLC.

En algunas modalidades, el cáncer es glioblastoma (que incluye GBM).

En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gastrointestinal.

En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hipermutado.

En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hipermutado pediátrico.

En algunas modalidades, el recipiente es un recipiente cerrado.

En algunas modalidades, el recipiente es un recipiente G.

En algunas modalidades, el recipiente es un GREX-10.

En algunas modalidades, el recipiente cerrado comprende un GREX-100.

En algunas modalidades, el recipiente cerrado comprende un GREX-500.

La presente invención proporciona, además, una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) elaborados mediante el método como se describe en la presente descripción.

La presente invención proporciona, además, una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde

la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, proporciona una mayor producción de interferón gamma.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, proporciona una mayor diversidad clonal.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, proporciona una mayor eficacia.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos una vez más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 16 días.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos dos veces más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 16 días.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos tres veces más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 16 días.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), en donde la población terapéutica de TIL es capaz de producir al menos una vez más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin añadir células presentadoras de antígeno (APC).

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL como se describe en la presente descripción es capaz de producir al menos dos veces más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin ninguna APC añadida.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma

en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en donde la primera expansión de TIL se realiza sin ninguna adición de APC.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes del tumor (TIL), en donde la población terapéutica de TIL es capaz de producir al menos una vez más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin ninguna adición de OKT3.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos dos veces más interferón-gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin ninguna adición de OKT3.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos tres veces más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin ninguna adición de OKT3.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), en donde la población terapéutica de TIL es capaz de producir al menos una vez más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin añadir células presentadoras de antígeno (APC) y sin añadir OKT3.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos dos veces más interferón-gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin añadir células presentadoras de antígeno (APC) y sin añadir OKT3.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL, como se describe en la presente descripción, es capaz de producir al menos tres veces más interferón-gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin añadir células presentadoras de antígeno (APC) y sin añadir OKT3.

La presente invención proporciona, además, una composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que comprende la población terapéutica de TIL como se describe en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona, además, una bolsa de infusión estéril que comprende la composición de TIL como se describe en la presente descripción.

La presente invención proporciona, además, una preparación crioconservada de la población terapéutica de TIL como se describe en la presente descripción.

La presente invención proporciona, además, una composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que comprende la población terapéutica de TIL como se describe en la presente descripción y un medio de crioconservación.

En algunas modalidades, el medio de crioconservación contiene DMSO.

En algunas modalidades, el medio de crioconservación contiene DMSO 7-10 %.

La presente invención proporciona, además, una preparación crioconservada de la composición de TIL, como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), como se describe en la presente descripción, es para usar como un medicamento.

En algunas modalidades, la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer.

En algunas modalidades, la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer de tumor sólido.

En algunas modalidades, la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), como se describe en la presente descripción, para usar en el tratamiento de un cáncer seleccionado de melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales.

En algunas modalidades, la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer

seleccionado del grupo que consiste en melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal.

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es melanoma.

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es HNSCC.

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es de cuello uterino.

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es NSCLC.

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es glioblastoma (que incluye GBM).

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es cáncer gastrointestinal.

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es un cáncer hipermutado.

En algunas modalidades, la composición de TIL, como se describe en la presente descripción, es para usar en el tratamiento de un cáncer en donde el cáncer es un cáncer hipermutado pediátrico.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona el uso de la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) como se describe en la presente descripción en un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar una dosificación con eficacia terapéutica de la composición de TIL al sujeto. En algunas modalidades, el cáncer es un tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer

de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal. En algunas modalidades, el cáncer es melanoma. En algunas modalidades, el cáncer es HNSCC. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de cuello uterino. En algunas modalidades, el cáncer es NSCLC. En algunas modalidades, el cáncer es glioblastoma (que incluye GBM). En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gastrointestinal. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hipermutado. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hipermutado pediátrico.

En algunas modalidades, la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), como se describe en la presente descripción, es para usar en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende administrar una dosificación con eficacia terapéutica de la composición de TIL al sujeto. En algunas modalidades, el cáncer es un tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal.

La presente invención proporciona, además, un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una dosificación con eficacia terapéutica de la composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el cáncer es un tumor sólido.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de

células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal. En algunas modalidades, el cáncer es melanoma. En algunas modalidades, el cáncer es HNSCC. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de cuello uterino. En algunas modalidades, el cáncer es NSCLC. En algunas modalidades, el cáncer es glioblastoma (que incluye GBM). En algunas modalidades, el cáncer es cáncer gastrointestinal. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hipermutado. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer hipermutado pediátrico.

La presente invención proporciona, además, un método para expandir células T que comprende:

(a) realizar una primera expansión con sensibilización de una primera población de células T que se obtienen de un donante, mediante el cultivo de la primera población de células T, para efectuar el crecimiento y sensibilizar una activación de la primera población de células T;
(b) después que la activación de la primera población de células T sensibilizadas en la etapa (a) comience a decaer, realizar una segunda expansión rápida de la primera población de células T mediante el cultivo de la primera población de células T para lograr el crecimiento y estimular la activación de la primera población de células T para obtener una segunda población de células T; y
(c) cosechar la segunda población de células T.
En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de la etapa (a) se realiza durante un período de hasta 7 días.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 11 días.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de 9 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de la etapa (a) se realiza durante un período de hasta 8 días.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 8 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de la etapa (a) se realiza durante un período de 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de 8 días.

En algunas modalidades del método, en la etapa (a) se cultiva la primera población de células T en un primer medio de cultivo que comprende OKT-3 e IL-2.

En algunas modalidades, el primer medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

En algunas modalidades del método, en la etapa (b) se cultiva la primera población de células T en un segundo medio de cultivo que comprende OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

En algunas modalidades del método, en la etapa (a) se cultiva la primera población de células T en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable a los gases, en donde el primer medio de cultivo comprende, opcionalmente, OKT-3, IL-2 y, opcionalmente, una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en donde la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, en donde en la etapa (b) se cultiva la primera población de células T en un segundo medio de cultivo en el recipiente, en donde el segundo medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una segunda población de APC, en donde la segunda población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, y en donde la segunda población de APC es mayor que la primera población de APC.

En algunas modalidades, la relación entre el número de APC en la segunda población de APC y el número de APC en la primera población de APC es aproximadamente 2:1.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera población de APC es aproximadamente $2,5 \times 10^8$ y el número de APC en la segunda población de APC es aproximadamente 5×10^8.

En algunas modalidades del método, en la etapa (a) la primera población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases con un grosor promedio de 2 capas de APC.

En algunas modalidades del método, en la etapa (b) la segunda población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases con un grosor promedio seleccionado del intervalo de 4 a 8 capas de APC.

En algunas modalidades, la relación entre el número promedio de capas de APC dispuestas sobre la primera superficie permeable a los gases en la etapa (b) y el número promedio de capas de APC dispuestas sobre la primera superficie permeable a los gases en la etapa (a) es 2:1.

En algunas modalidades, las APC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En algunas modalidades, las APC comprenden PBMC, en donde las PBMC son irradiadas y exógenas al donante de la primera población de células T.

En algunas modalidades, las células T son linfocitos infiltrantes de tumor (TIL).

En algunas modalidades, las células T son linfocitos infiltrantes de la médula (MIL).

En algunas modalidades, las células T son linfocitos de sangre periférica (PBL).

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular es un medio definido y/o un medio libre de suero.

En algunas modalidades, el medio definido comprende transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) y albúmina (opcionalmente recombinante).

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o un sustituto del suero.

En algunas modalidades, el medio de células basales incluye, pero no se limita a, medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, SFM de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, medio CTS™ AIM-V, CTS™ AIM-V SFM, medio basal de expansión de células T LymphoONE™ libre de componentes xenogénicos, Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo (MEM), medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, medio esencial mínimo (αMEM), medio

esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), medio de crecimiento RPMI, Medio de Dulbecco modificado por Iscove.

En algunas modalidades, el suplemento de suero o el sustituto de suero se selecciona del grupo que consiste en el Suplemento de Suero de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer y el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende una o más albúminas o sustitutos de albúmina.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende uno o más aminoácidos.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de la transferrina.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de la insulina.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos y uno o más oligoelementos. En

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende albúmina.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina y compuestos que contienen las porciones de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende, además, L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o 2-mercaptoetanol.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende una concentración del sustituto de suero total (% en volumen) de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % en volumen del medio de cultivo celular.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende una concentración del sustituto de suero total de aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 % o aproximadamente 10 % del volumen total del medio de cultivo celular.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende, además, glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, de 0,5 mM a aproximadamente 9 mM, de 1 mM a aproximadamente 8 mM, de 2 mM a aproximadamente 7 mM, de 3 mM a aproximadamente 6 mM, o de 4 mM a aproximadamente 5 mM.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende, además, glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende, además, 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de 10 mM a aproximadamente 140 mM, de 15 mM a aproximadamente 130 mM, de 20 mM a aproximadamente 120 mM, de 25 mM a aproximadamente 110 mM, de 30 mM a aproximadamente 100 mM, de 35 mM a aproximadamente 95 mM, de 40 mM a aproximadamente 90 mM, de 45 mM a aproximadamente 85 mM, de 50 mM a aproximadamente 80 mM, de 55 mM a aproximadamente 75 mM, de 60 mM a aproximadamente 70 mM o aproximadamente 65 mM.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende, además, 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55 mM.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende los medios definidos descritos en la Publicación PCT Internacional Núm. WO/1998/030679.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende glicina en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, L- histidina en el intervalo de aproximadamente 5-250 mg/L, L-isoleucina en el intervalo de aproximadamente 5-300 mg/L, L-metionina en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, L-fenilalanina en el intervalo de aproximadamente 5-400 mg/L, L-prolina en el intervalo de aproximadamente 1-1000 mg/L, L- hidroxiprolina en el intervalo de aproximadamente 1-45 mg/L, L-serina en el intervalo de aproximadamente 1-250 mg/L, L-treonina en el intervalo de aproximadamente 10-500 mg/L, L-triptófano en el intervalo de aproximadamente 2-110 mg/L, L-tirosina en el intervalo de aproximadamente 3-175 mg/L, L-valina en el intervalo de aproximadamente 5-500 mg/L, tiamina en el intervalo de aproximadamente 1-20 mg/L, glutatión reducido en el intervalo de aproximadamente 1-20 mg/L, L-ácido ascórbico-2-fosfato en el intervalo de aproximadamente 1-200 mg/L, transferrina saturada de hierro en el intervalo de aproximadamente 1-50 mg/L, insulina en el intervalo de aproximadamente 1-100 mg/L, selenita de sodio en el intervalo de aproximadamente

0,000001-0,0001 mg/L, y/o albumina (por ejemplo, AlbuMAX® I) en el intervalo de aproximadamente 5000-50,000 mg/L.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende uno o más de los ingredientes de las porciones que no son oligoelementos en el medio definido que están presentes en los intervalos de concentración enumerados en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en Medio 1X" en la Tabla A proporcionada en la presente descripción.

En algunas modalidades, la osmolaridad del medio de cultivo celular está entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende, además, aproximadamente 3,7 g/L o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende, además, L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM) y/o 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende SFM de Expansión de Células T CTS OpTmizer, Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS al 3 %, BME 55 mM y opcionalmente glutamina.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende el Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ suplementado con el Suplemento de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/L) y SR de Células Inmunitarias CTS™ 3 % y Glutamax 2 mM, opcionalmente comprende, además, IL-2 6000 UI/ml.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ suplementado con Suplemento de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/L) y SR de Células Inmunitarias CTS™ 3 %, Glutamax 2 mM y opcionalmente comprende, además, IL-2 3000 UI/ml.

La presente invención proporciona, además, una composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que comprende:

i) una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), y

ii) medio definido o medio libre de suero que comprende opcionalmente transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) y albúmina (opcionalmente recombinante).

La presente invención proporciona, además, una composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) expandida que comprende:

i) una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), y

ii) medio definido o medio libre de suero que comprende opcionalmente transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) y albúmina (opcionalmente recombinante).

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) y albúmina (opcionalmente recombinante).

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o un sustituto de suero.

En algunas modalidades, el medio de células basales incluye, pero no se limita a, medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, SFM de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, medio CTS™ AIM-V, CTS™ AIM-V SFM, medio basal de expansión de células T LymphoONE™ libre de componentes xenogénicos, Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo (MEM), medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, medio esencial mínimo (αMEM), medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), medio de crecimiento RPMI, Medio de Dulbecco modificado por Iscove.

En algunas modalidades, el suplemento de suero o el sustituto de suero se selecciona del grupo que consiste en el Suplemento de Suero de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer y el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende una o más albúminas o sustitutos de albúmina.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende uno o más aminoácidos.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de la transferrina.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de la insulina.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos y uno o más oligoelementos.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende albúmina.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina y compuestos que contienen las porciones de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende además L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o 2-mercaptoetanol.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende una concentración del sustituto de suero total (% en volumen) de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % en volumen del medio de cultivo celular.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende una concentración del sustituto de suero total de aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 % o aproximadamente 10 % del volumen total del medio de cultivo celular.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende, además, glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, de 0,5 mM a aproximadamente 9 mM, de 1 mM a aproximadamente 8 mM, de 2 mM a aproximadamente 7 mM, de 3 mM a aproximadamente 6 mM, o de 4 mM a aproximadamente 5 mM.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende, además, glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende, además, 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de 10 mM a aproximadamente 140 mM, de 15 mM a aproximadamente 130 mM, de 20 mM a aproximadamente 120 mM, de 25 mM a aproximadamente 110 mM, de 30 mM a aproximadamente 100 mM, de 35 mM a aproximadamente 95 mM, de 40 mM a aproximadamente 90 mM, de 45 mM a aproximadamente 85 mM, de 50 mM a aproximadamente 80 mM, de 55 mM a aproximadamente 75 mM, de 60 mM a aproximadamente 70 mM o aproximadamente 65 mM.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende, además, 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55 mM.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende los medios definidos descritos en la Publicación PCT Internacional Núm. WO/1998/030679.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende glicina en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, L- histidina en el intervalo de aproximadamente 5-250 mg/L, L-isoleucina en el intervalo de aproximadamente 5-300 mg/L, L-metionina en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, L-fenilalanina en el intervalo de aproximadamente 5-400 mg/L, L-prolina en el intervalo de aproximadamente 1-1000 mg/L, L- hidroxiprolina en el intervalo de aproximadamente 1-45 mg/L, L-serina en el intervalo de aproximadamente 1-250 mg/L, L-treonina en el intervalo de aproximadamente 10-500 mg/L, L-triptófano en el intervalo de aproximadamente 2-110 mg/L, L-tirosina en el intervalo de aproximadamente 3-175 mg/L, L-valina en el intervalo de aproximadamente 5-500 mg/L, tiamina en el intervalo de aproximadamente 1-20 mg/L, glutatión reducido en el intervalo de aproximadamente 1-20 mg/L, L-ácido ascórbico-2-fosfato en el intervalo de aproximadamente 1-200 mg/L, transferrina saturada de hierro en el intervalo de aproximadamente 1-50 mg/L, insulina en el intervalo de aproximadamente 1-100 mg/L, selenita de sodio en el intervalo de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y/o albumina (por ejemplo, AlbuMAX® I) en el intervalo de aproximadamente 5000-50,000 mg/L.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende uno o más de los ingredientes de las porciones que no son oligoelementos en el medio definido que están presentes en los intervalos de concentración enumerados en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en Medio 1X" en la Tabla A proporcionada en la presente descripción.

En algunas modalidades, la osmolaridad del medio definido o medio libre de suero está entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende, además, aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio.

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero comprende, además, L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM) y/o 2 -mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

En algunas modalidades, el medio definido o medio libre de suero en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende SFM de Expansión de Células T CTS OpTmizer, Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS al 3 %, BME 55 mM y opcionalmente glutamina.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende el Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ suplementado con el Suplemento de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/L) y SR de Células Inmunitarias CTS™ 3 % y Glutamax 2 mM, opcionalmente comprende, además, IL-2 6000 UI/ml.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ suplementado con Suplemento de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/L) y SR de Células Inmunitarias CTS™ 3 %, Glutamax 2 mM y opcionalmente comprende, además, IL-2 3000 UI/ml.

En algunas modalidades, la población de TIL es una población terapéutica de TIL.

En algunas modalidades, la población terapéutica de TIL exhibe un aumento en el suero de IFN-γ, en donde el aumento de IFN-γ es mayor de 200 pg/ml, mayor de 250 pg/ml, mayor de 300 pg/ml, mayor de 350 pg/ml, mayor de 400 pg/ml, mayor de 450 pg/ml, mayor de 500 pg/ml, mayor de 550 pg/ml, mayor de 600 pg/ml, mayor de 650 pg/ml, mayor de 700 pg/ml, mayor de 750 pg/ml, mayor de 800 pg/ml, mayor de 850 pg/ml, mayor de 900 pg/ml, mayor de 950 pg/ml o mayor de 1000 pg/ml.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1A-1C: A) Muestra una comparación entre el proceso 2A (proceso de aproximadamente 22 días) y una modalidad del proceso Gen 3 para la producción de TIL (proceso de aproximadamente 14 días a 16 días). **B)** Proceso Gen3 ilustrativo que proporciona una descripción general de las etapas A hasta F (proceso de aproximadamente 14 días a 16 días). **C)** Gráfico que proporciona tres procesos de Gen 3 ilustrativos con una descripción general de las Etapas A hasta F (proceso de aproximadamente 14 días a 16 días) para cada una de las tres variaciones del proceso.

Figura 2: Proporciona un diagrama de flujo experimental para comparar entre GEN 2 (proceso 2A) y GEN 3.

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

Figura 4A-4C: **A)** L4054 – Análisis de marcadores de memoria del producto TIL de los procesos Gen 2 y Gen 3. **B)** L4055 - Análisis de marcadores de memoria del producto TIL de los procesos Gen 2 y Gen 3. **C)** M1085T- Análisis de marcadores de memoria del producto TIL de los procesos Gen 2 y Gen 3.

Figura 5: Marcadores de activación y agotamiento de L4054 **(A)** portal de salida en CD4+, **(B)** portal de salida en CD8+.

Figura 6: Marcadores de activación y agotamiento de L4055 **(A)** portal de salida en CD4+, **(B)** portal de salida en CD8+.

Figura 7: Producción de IFNγ (pg/ml): (A) L4054, (B) L4055 y (C) M1085T para los procesos Gen 2 y Gen 3: Cada barra representada aquí es la media + SEM para los niveles de IFNγ de estimulados, no estimulados y control de medio. Densidad óptica medida a 450 nm.

Figura 8: Análisis ELISA de la concentración de IL-2 en el sobrenadante del cultivo celular: **(A) L4054** y **(B) L4055**. Cada barra representada aquí es la media + SEM para los niveles de IL-2 en los medios metabolizados. Densidad óptica medida a 450 nm.

Figura 9: Cuantificación de glucosa y lactato (g/L) en medios metabolizados: (A) Glucosa y (B) Lactato: En las dos líneas tumorales, y en ambos procesos, se observó una disminución de glucosa a lo largo de la expansión del REP. Por el contrario, como

se esperaba, se observó un aumento de lactato. Tanto la disminución de glucosa como el aumento de lactato son comparables entre los procesos Gen 2 y Gen 3.

Figura 10: A) Cuantificación de L-glutamina en medio metabolizado para L4054 y L4055. **B)** Cuantificación de Glutamax en medio metabolizado para L4054 y L4055. C) Cuantificación de amoniaco en medio metabolizado para L4054 y L4055.

Figura 11: Análisis de la longitud de los telómeros. El valor de la longitud relativa del telómero (RTL) indica que la fluorescencia media del telómero por cromosoma/genoma en los procesos Gen 2 y Gen 3 de la fluorescencia del telómero por cromosoma/genoma en la línea de células de control (línea celular de leucemia 1301) mediante el uso del kit DAKO.

Figura 12: Análisis de secuencia de CDR3 único para el producto final TIL en L4054 y L4055 bajo los procesos Gen 2 y Gen 3. Las columnas muestran el número de clonotipos únicos de TCR B identificados a partir de 1 x 10^6 células recolectadas en el Día de Cosecha de los proceso Gen 2 (por ejemplo, día 22) y Gen 3 (por ejemplo, días 14-16). Gen 3 muestra una mayor diversidad clonal en comparación con Gen 2 en función del número de péptidos de CDR únicos dentro de la muestra.

Figura 13: Frecuencia de secuencias CDR3 únicas en el producto celular final cosechado L4054 TIL (procesos Gen 2 (por ejemplo, día 22) y Gen 3 (por ejemplo, día 14-16)).

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

Figura 15: Índice de Diversidad para el producto final de TIL en L4054 y L4055 bajo los procesos Gen 2 y Gen 3. El índice de diversidad de entropía de Shanon es una métrica más confiable y común para la comparación. L4054 y L4055 de Gen 3 mostraron una diversidad ligeramente mayor que Gen 2.

Figura 16: Datos crudos de los recuentos de células Día 7-Iniciacio del REP de Gen 3 presentados en la Tabla 22 (ver Ejemplo 5 más abajo).

Figura 17: Datos crudos de los recuentos de células Día 11- Inicio del REP de Gen 2 y escalado de Gen 3 presentados en la Tabla 22 (ver Ejemplo 5 más abajo).

Figura 18: Datos crudos de los recuentos de células Día 16- escalado de Gen 2 y Cosecha de Gen 3 (por ejemplo, día 16) presentados en la Tabla 23 (ver Ejemplo 5 más abajo).

Figura 19: Datos crudos de los recuentos de células Día 22- Cosecha de Gen 2 (por ejemplo, día 22) presentados en la Tabla 23 (ver Ejemplo 5 más abajo). Para L4054 Gen 2, el recuento posterior a LOVO se extrapoló a 4 frascos, porque era el número total del estudio. Se contaminó 1 frasco y la extrapolación se realizó para un total = 6,67E+10.

Figura 20: Datos crudos de los resultados de la citometría de flujo representados en las Figuras 3A, 4A y 4B.

Figura 21: Datos crudos de los resultados de la citometría de flujo representados en las Figuras 3C y 4C.

Figura 22: Datos crudos de los resultados de la citometría de flujo representados en las Figuras 5 y 6.

Figura 23: Datos crudos de los resultados del ensayo de producción de IFNγ para las muestras L4054 representadas en la Figura 7.

Figura 24: Datos crudos de los resultados del ensayo de producción de IFNγ para las muestras L4055 representadas en la Figura 7.

Figura 25: Datos crudos de los resultados del ensayo de producción de IFNγ para las muestras de M1085T representadas en la Fig.7.

Figura 26: Datos crudos para los resultados del ensayo ELISA de IL-2 representados en la Figura 8.

Figura 27: Datos crudos del sustrato metabólico y los resultados del análisis metabólico presentados en las Figuras 9 y 10.

Figura 28: Datos crudos de los resultados del análisis de la longitud relativa de los telómeros presentados en la Figura 11.

Figura 29: Datos crudos para la secuencia de CD3 única y resultados de análisis de diversidad clonal presentados en las Figuras 12 y 15.

Figura 30: Muestra una comparación entre varios Gen 2 (procesos 2A) y la modalidad del proceso Gen 3.1.

Figura 31: Tabla que describe varias características de las modalidades de los procesos Gen 2, Gen 2.1 y Gen 3.0.

Figura 32: Descripción general de las condiciones de los medios para una modalidad del proceso Gen 3, denominado Gen 3.1.

Figura 33: Tabla que describe varias características de las modalidades de los proceso Gen 2, Gen 2.1 y Gen 3.0.

Figura 34: Tabla que compara varias características de las modalidades de los procesos Gen 2 y Gen 3.0.

Figura 35: Tabla que proporciona los usos de los medios en las diversas modalidades de los procesos de expansión descritos.

Figura 36: Comparación de fenotipo: Las modalidades Gen 3.0 y Gen 3.1 del proceso mostraron una expresión comparable de CD28, CD27 y CD57. La prueba Gen 3.1 (que incluye la adición de OKT-3 y alimentadores el Día 0) alcanzó la capacidad máxima del frasco en la cosecha.

Figura 37: Mayor producción de IFNγ en el producto final de Gen 3. Se evaluó el análisis de IFNγ (por ELISA) en el sobrenadante congelado del cultivo para comparar ambos procesos. Para cada tumor se estimuló durante la noche con la placa recubierta con anti-CD3, mediante el uso del producto TIL fresco en cada proceso Gen 2 (por ejemplo, día 22) y Gen 3 (por ejemplo, día 16). Aquí cada barra representa los niveles de IFNγ de medios estimulado, no estimulado y de control.

Figura 38: A) Análisis de secuencia de CDR3 único para el producto final de TIL: Las columnas muestran el número de clonotipos de TCR B únicos identificados a partir de 1 × 10^6 células recolectadas en los procesos Gen 2 (por ejemplo, día 22) y Gen 3 (por ejemplo, día 14- 16). Gen 3 muestra una mayor diversidad clonal en comparación con Gen 2 en función del número de péptidos de CDR únicos dentro de la muestra. B) Índice de Diversidad para el producto final TIL: el índice de diversidad de entropía de Shanon es una métrica común más confiable para la comparación. Gen 3 mostró una diversidad ligeramente mayor que Gen 2. C) Análisis de secuencia de CDR3 único para el producto final TIL en L4063 y L4064 bajo los procesos Gen 3, Gen 3.1 control y Gen 3.1 de prueba. Las columnas muestran el número de clonotipos únicos TCR B identificados a partir de 1x10^6 células recolectadas en la Cosecha el día 16, para los procesos Gen 3 y Gen 3.1. Gen 3.1 mostró una diversidad clonal ligeramente mayor en comparación con

Gen 3 en base al número de péptidos de CDR únicos dentro de la muestra. D) Índice de diversidad para el producto final de TIL en L4063 y L4064 bajo Gen 3. Procesos Gen 3.1 de control y Gen 3.1 de prueba. El índice de diversidad de entropía de Shannon es una métrica más confiable y común para la comparación. Las condiciones de Gen 3.1 en L4063 y L4064 mostraron una diversidad ligeramente mayor que el proceso Gen 3.

Figura 39: Se comparten 199 secuencias entre el producto final de Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 97,07 % del 80 % superior de secuencias de CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final de Gen 3.

Figura 40: Se comparten 1833 secuencias entre el producto final de Gen 3 y Gen 2, lo que corresponde al 99,45 % del 80 % superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final de Gen 3.

Figura 41: Esquema de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 42: Esquema de una modalidad ilustrativa para la expansión de TIL a partir de neoplasias malignas hematopoyéticas mediante el uso del proceso Gen 3. En el día 0, se aisló una fracción de células T (CD3+, CD45+) de un producto de aféresis enriquecido con linfocitos, sangre completa o digestión tumoral (fresca o descongelada) mediante el uso de métodos de selección positiva o negativa, es decir, que se eliminan las células T mediante el uso de un marcador de células T (CD2, CD3, etcétera, o se eliminan otras células y se dejan las células T) o centrifugación en gradiente.

Figura 43: Esquema de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 44: Proporciona una descripción general del proceso para una modalidad ilustrativa (Gen 3.1 de prueba) del proceso Gen 3.1 (un proceso de 16 días).

Figura 45: Proporciona datos de la proliferación de TIL, recuentos de células viables totales promedio por fragmento de tumor, porcentaje de viabilidad en el Día de la Cosecha y recuentos de células viables totales (TVC) en el Día de la Cosecha para modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba). Gen 3.1 de prueba (que incluye la adición de OKT-3 y alimentadoras el Día 0) alcanzó la capacidad máxima del frasco en la cosecha. Si se inicia un máximo de 4 frascos el día 0, cada TVC cosechada debe multiplicarse por 4.

Figura 46: Gráfico de barras que representa el recuento total de células viables (TVC) y el porcentaje de viabilidad para modalidades ilustrativas de los proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba), un proceso de 16 días.

Figura 47: Proporciona datos que muestran que las modalidades ilustrativas de los procesos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba) produjeron células que mostraron una expresión comparable de CD28, CD27 y CD57.

Figura 48: Proporciona datos que muestran que los estados de memoria de TIL eran comparables entre las células producidas mediante las modalidades ilustrativas de los procesos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba). Los estados de memoria de TIL del REP se representan de la siguiente manera: subconjuntos de TIL CD4+ o CD8+ de memoria se dividieron en diferentes subconjuntos de memoria. Virgen (CD45RA+ CD62L+), CM: Memoria central (CD45RA-CD62L+), EM: Memoria Efectora (CD45RA-CD62L-), TEMRA/TEFF: RA+ Memoria Efectora/Efectoras (CD45RA+CD62L+). El gráfico de barras presentado son los porcentajes de CD45+/- CD62L +/- positivo cuando se detectan en el portal de CD4+ o CD8+.

Figura 49: Proporciona datos que muestran que los marcadores de activación/agotamiento de TIL eran comparables entre las células producidas mediante las modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba) cuando se detectan en el portal CD4+. La activación y el agotamiento de TIL del REP se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Las muestras de TIL cosechados se tiñeron con anticuerpos de citometría de flujo (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710, CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). Los gráficos de barras presentados son el porcentaje de TIL CD4+ o CD8+ de TIL del REP.

Figura 50: Proporciona datos que muestran que los marcadores de activación/agotamiento de TIL eran comparables entre las células producidas mediante las modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.0, Gen 3.1 de Control y Gen 3.1) cuando se detectan en el portal CD8+. La activación y el agotamiento de TIL del REP se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Las muestras de TIL Cosechadas se tiñeron con anticuerpos de citometría de flujo (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710,

CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). Los gráficos de barras presentados son el porcentaje de TIL CD4+ o CD8+ de TIL del REP.

Figura 51: Proporciona datos que muestran una mayor producción de IFN-γ exhibida por el producto final de Gen 3.1. El análisis de IFNγ mediante ELISA se evaluó en el sobrenadante congelado del cultivo para comparar ambos procesos. Para cada tumor, estimulación durante la noche con la placa recubierta con anti-CD3, mediante el uso del producto TIL fresco en cada día de Cosecha. Aquí cada barra representa los niveles de IFN-γ del medio estimulado, no estimulado y de control.

Figura 52: Proporciona datos que muestran que la concentración de IL-2 en el sobrenadante era comparable en las modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba) mediante el uso de medios estándar. Panel izquierdo: L4063- Gen 2 Medio Estándar. Panel derecho: L4064- Medio CTS Optimizer. *ELISA realizado con diluyente AIM V

Figura 53: Proporciona datos que muestran que las concentraciones de metabolitos eran comparables en los sobrenadantes a través de modalidades ilustrativas de los proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba). Los TIL L4063 se expandieron en medio estándar. Los TIL de L4064 se expandieron en medio CTS Optimizer.

Figura 54: Análisis de la longitud de los telómeros en modalidades ilustrativas de los procesos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de Control, Gen 3.1 de Prueba). El análisis de la longitud de los telómeros para las células producidas por los tumores con números de identificación L4063 y L4064: el valor de la longitud relativa de los telómeros (RTL) indica la fluorescencia media de los telómeros por cromosoma/genoma en las células producidas por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 de Control y Gen 3.1 de prueba sobre la fluorescencia del telómero por cromosoma/genoma en la línea de células de control (línea de células de leucemia 1301) mediante el uso del kit DAKO.

Figura 55: Esquema de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3.1 de prueba (Gen 3.1 optimizado) (un proceso de 16-17 días).

Figura 56: Esquema de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 57A-57B: Tablas de comparación para los procesos Gen 2 ilustrativo y Gen 3 ilustrativos con las diferencias ilustrativas resaltadas.

Figura 58: Esquema de una modalidad ilustrativa del cronograma de preparación del proceso Gen 3 (un proceso de 16/17 días).

Figura 59: Esquema de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 (un proceso de 14-16 días).

Figura 60: Resumen de datos de los Días 16/17 de tres corridas de ingeniería de una modalidad ilustrativa del proceso de Gen 3.

Figura 61: Datos con respecto al fenotipo extendido de TIL: se muestran las características de diferenciación frente a las especificaciones de identidad (ID) de TIL para células producidas mediante dos corridas de ingeniería de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3.

Figura 62: Datos con respecto al fenotipo extendido de TIL expandidos a partir de tumores pulmonares: se muestran las características de diferenciación frente a las especificaciones de identidad (ID) de TIL para células producidas por dos corridas de desarrollo de procesos (PD) de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 mediante el uso tejidos de tumores pulmonares.

Figura 63: Datos con respecto al fenotipo extendido (pureza, identidad y memoria) de TIL expandidos a partir de tumores ováricos: se muestran las características fenotípicas de pureza, identidad y memoria de células expandidas a partir de tumores ováricos mediante el uso de las modalidades ilustrativas de los procesos Gen 2, Gen 3.1 y FR ER (Modalidades de los procesos de tumor congelado, REP temprano); * indica condición no probada; Y indica problema de muestreo, recuento bajo de TVC o células no viables al descongelarse.

Figura 64: Se muestra la estrategia de detección para la caracterización de TIL (se muestra la jerarquía de detección) y los datos relacionados con las características fenotípicas extendidas de las células producidas por dos corridas de ingeniería de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3.

Figura 65: Se muestra la estrategia de detección para la caracterización de TIL (se muestra la jerarquía de detección) y los datos relacionados con las características fenotípicas extendidas de la subpoblación CD4+ y la subpoblación CD8+ de células

producidas por dos corridas de ingeniería de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3.

Figura 66: Se muestran datos con respecto al análisis ELISA de Granzima B de células producidas por dos corridas de ingeniería de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3.

Figura 67A-67B: Esquema de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 68: Esquema de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 69: Comparación de los procesos Gen 2, Gen 2.1 y una modalidad del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 70: Comparación de los procesos Gen 2, Gen 2.1 y una modalidad del proceso Gen 3 (un proceso de 16 días).

Figura 71: Componentes de la modalidad Gen 3.

Figura 72: Comparación del diagrama de flujo de la modalidad Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba).

Figura 73: Se presentan el recuento de células viables totales y las veces de expansión para las modalidades ilustrativas de Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero.

Figura 74: Las puntuaciones del % de viabilidad después de la reactivación, el escalado del cultivo y la cosecha de TIL se presentan para las modalidades ilustrativas de Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero.

Figura 75: Se presenta una caracterización fenotípica del producto TIL final producido mediante el procesamiento de las muestras tumorales L4063 y L4064 en procesos ilustrativos de Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 76: Se presenta un análisis de marcadores de memoria del producto TIL que se producen mediante el procesamiento de las muestras de tumores L4063 y L4064 en

procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 77: Se presentan marcadores de activación y agotamiento de TIL que se producen mediante el procesamiento de las muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS seguido de la clasificación de células detectadas en el portal CD4+.

Figura 78: Se presentan marcadores de activación y agotamiento de TIL que se producen mediante el procesamiento de las muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS seguido de la clasificación de células detectadas en el portal CD8+.

Figura 79: Se presentan puntuaciones de producción de IFN-γ (pg/mL) para el producto TIL final que se producen mediante el procesamiento de las muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 80: Se presenta un análisis de concentración de IL-2 (pg/mL) en medios metabolizados (recolectados después de la reactivación, escalado de cultivo y cosecha de TIL) del procesamiento de muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 81: Se presenta la concentración de glucosa (g/L) en medios metabolizados (recolectados después de la reactivación, escalado de cultivo y cosecha de TIL) del procesamiento de muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 82: Se presenta la concentración de lactato (g/L) en medios metabolizados (recolectados después de la reactivación, escalado de cultivo y cosecha de TIL) del procesamiento de muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 83: Se presenta la concentración de glutamina (mmol/L) en medios metabolizados (recolectados después de la reactivación, escalado de cultivo y cosecha de TIL) del procesamiento de muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 84: Se presenta la concentración de glutamax (mmol/L) en medios metabolizados (recolectados después de la reactivación, escalado de cultivo y cosecha de TIL) del procesamiento de muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS.

Figura 85: Se presenta la concentración de amoníaco (mmol/L) en medios metabolizados (recolectados después de la reactivación, escalado de cultivo y cosecha de TIL) del procesamiento de muestras de tumores L4063 y L4064 en procesos ilustrativos Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS. Análisis de la longitud de los telómeros en modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba). El análisis de la longitud de los telómeros para las células producidas por los tumores con números de identificación L4063 y L4064: el valor de la longitud relativa de los telómeros (RTL) indica la fluorescencia media de los telómeros por cromosoma/genoma en las células producidas por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 de Control y Gen 3.1 de prueba sobre la fluorescencia del telómero por cromosoma/genoma en la línea de células de control (línea de células de leucemia 1301) mediante el uso del kit DAKO.

Figura 86: Análisis de la longitud de los telómeros en TIL producidos por modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS. El análisis de la longitud de los telómeros para las células producidas por los tumores con números de identificación L4063 y L4064: el valor de la longitud relativa de los telómeros (RTL) indica la fluorescencia media de los telómeros por cromosoma/genoma en las células producidas por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 de Control y Gen 3.1 de prueba sobre la fluorescencia del telómero por cromosoma/genoma en la línea de células de control (línea de células de leucemia 1301) mediante el uso del kit DAKO.

Figura 87: Resumen del repertorio de TCR Vβ para los TIL producido por modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) mediante el uso de medio de cultivo celular estándar y medio de cultivo celular sin suero CTS. Se describe el origen clonal de los TIL para el producto TIL final producido por los tumores con números de identificación L4063 y L4064 producidos por los procesos Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba como se mide por el repertorio TCR Vβ de secuencias CDR3 únicas.

Figura 88: Comparación de los TIL producidos por modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) con respecto a la frecuencia de secuencias CDR3 únicas en el producto TIL cosechado del procesamiento de muestras de tumor L4063.

Figura 89: Comparación de los TIL producidos por modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) con respecto al porcentaje de secuencias CDR3 únicas compartidas en el producto de células TIL cosechadas del procesamiento de muestras tumorales L4063: 975 secuencias son compartidas entre el producto final de Gen 3.0 y Gen 3.1 de prueba, equivalente al 88 % del 80 % superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 3.0 compartidas con el producto final de Gen 3.1 de prueba.

Figura 90: Comparación de los TIL producidos por modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) con respecto al porcentaje de secuencias CDR3 únicas compartidas en el producto de células TIL cosechadas del procesamiento de muestras tumorales L4064: 2163 secuencias son compartidas entre el producto final de Gen 3.0 y Gen 3.1 de prueba, equivalente al 87 % del 80 % superior de secuencias CDR3 únicas de Gen 3.0 compartidas con el producto final de Gen 3.1 de prueba.

Figura 91: Comparación de los TIL producidos por modalidades ilustrativas del proceso Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 de control, Gen 3.1 de prueba) con respecto a la frecuencia de secuencias CDR3 únicas en el producto TIL cosechado del procesamiento de muestras de tumor L4064.

Figura 92: Se muestran los componentes de una modalidad ilustrativa del proceso Gen 3 (Gen 3-Optimizado, un proceso de 16-17 días).

Figura 93: Tabla de criterios de aceptación.

Figura 94: Recuentos celulares Día de reactivación.

Figura 95: Recuentos celulares Día de escalado.

Figura 96: Recuentos celulares Cosecha L4063.

Figura 97: Recuentos celulares Cosecha L4064.

Figura 98: Datos de flujo.

Figura 99: Datos de flujo.

Figura 100: Datos de flujo.

Figura 101: Datos de flujo.

Figura 102: Datos de producción de IFN-γ Figura 7-L4063.

Figura 103: Datos de producción de IFN-γ Figura 7-L4064.

Figura 104: Datos del análisis ELISA de concentración de IL-2.

Figura 105: Tabla resumen de datos metabólicos.

Figura 106: Resumen de datos.

Figura 107: Resumen de datos.

Figura 108: Índice de diversidad de Shannon.

Figura 109: Gráfico del Proceso Ilustrativo 2A que proporciona una descripción general de las Etapas A hasta F.

Figura 110: Proporciona las estructuras IA e IB, los cilindros se refieren a dominios de unión a polipéptidos individuales. Las estructuras IA y IB comprenden tres dominios de unión de TNFRSF unidos linealmente derivados de, por ejemplo, 4-1BBL o un anticuerpo que se une a 4-1BB, que se pliega para formar una proteína trivalente, que después se une a una segunda proteína trivalente a través de IgG1-Fc (que incluye los dominios CH3 y CH2) se usa después para unir dos de las proteínas trivalentes mediante enlaces disulfuro (pequeños óvalos alargados), que estabilizan la estructura y proporcionan agonistas capaces de unir los dominios de señalización intracelular de los seis receptores y las proteínas de señalización para formar un complejo de señalización. Los dominios de unión de TNFRSF indicados como cilindros pueden ser dominios scFv que comprenden, por ejemplo, una cadena VH y VL conectada por un enlazador que

puede comprender residuos hidrófilos y secuencias Gly y Ser para la flexibilidad, así como también Glu y Lys para la solubilidad.

Figura 111: Descripción general de los procesos Gen 2 y Gen 3 que usan muestras de biopsia.

Figura 112: Modalidad ilustrativa de los procesos Gen 3.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácidos de 4-1BB humana.

SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de 4-1BB murina.

SEQ ID NO:11 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:12 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:13 es la región variable de la cadena pesada (VH) para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:14 es la región variable de cadena ligera (VL) para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:15 es la CDR1 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:16 es la CDR2 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:17 es la CDR3 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:18 es la CDR1 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:19 es la CDR2 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:20 es la CDR3 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB utomilumab (PF-05082566).

SEQ ID NO:21 es la cadena pesada para anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:22 es la cadena ligera para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:23 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:24 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:25 es la CDR1 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:26 es la CDR2 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:27 es la CDR3 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:28 es la CDR1 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:29 es la CDR2 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal agonista 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:30 es la CDR3 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal agonista de 4-1BB urelumab (BMS-663513).

SEQ ID NO:31 es un dominio Fc para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:32 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:33 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO: 34 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:35 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:36 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:37 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:38 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:39 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:40 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:41 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:42 es un dominio Fc para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:43 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:44 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:45 es un enlazador para una proteína de fusión agonista de TNFRSF.

SEQ ID NO:46 es una secuencia de aminoácidos del ligando 4-1BB (4-1BBL).

SEQ ID NO:47 es una porción soluble del polipéptido 4-1BBL.

SEQ ID NO:48 es una región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo 4B4-1-1 versión 1 agonista de 4-1BB.

SEQ ID NO:49 es una región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo 4B4-1-1 versión 1 agonista de 4-1BB.

SEQ ID NO:50 es una región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo 4B4-1-1 versión 2 agonista de 4-1BB.

SEQ ID NO:51 es una región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo 4B4-1-1 versión 2 agonista de 4-1BB.

SEQ ID NO:52 es una región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo H39E3-2 agonista de 4-1BB.

SEQ ID NO:53 es una región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo H39E3-2 agonista de 4-1BB.

SEQ ID NO:54 es la secuencia de aminoácidos de OX40 humano.

SEQ ID NO:55 es la secuencia de aminoácidos de OX40 murino.

SEQ ID NO:56 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:57 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:58 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:59 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:60 es la CDR1 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:61 es la CDR2 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:62 es la CDR3 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:63 es la CDR1 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:64 es la CDR2 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:65 es la CDR3 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal tavolixizumab (MEDI-0562) agonista de OX40.

SEQ ID NO:66 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:67 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:68 es la región variable de la cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:69 es la región variable de la cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:70 es la CDR1 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:71 es la CDR2 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:72 es la CDR3 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:73 es la CDR1 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:74 es la CDR2 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:75 es la CDR3 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal 11D4 agonista de OX40.

SEQ ID NO:76 es la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:77 es la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:78 es la región variable de la cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:79 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:80 es la CDR1 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:81 es la CDR2 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:82 es la CDR3 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:83 es la CDR1 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:84 es la CDR2 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:85 es la CDR3 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal 18D8 agonista de OX40.

SEQ ID NO:86 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO:87 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO:88 es la CDR1 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO:89 es la CDR2 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO:90 es la CDR3 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO:91 es la CDR1 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO:92 es la CDR2 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO: 93 es la CDR3 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal Hu119-122 agonista de OX40.

SEQ ID NO:94 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO:95 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO:96 es la CDR1 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO:97 es la CDR2 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO:98 es la CDR3 de cadena pesada para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO:99 es la CDR1 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO:100 es la CDR2 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO:101 es la CDR3 de cadena ligera para el anticuerpo monoclonal Hu106-222 agonista de OX40.

SEQ ID NO: 102 es una secuencia de aminoácidos del ligando OX40 (OX40L).

SEQ ID NO:103 es una porción soluble del polipéptido OX40L.

SEQ ID NO:104 es una porción soluble alternativa del polipéptido OX40L.

SEQ ID NO:105 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal 008 agonista de OX40.

SEQ ID NO:106 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal 008 agonista de OX40.

SEQ ID NO:107 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal 011 agonista de OX40.

SEQ ID NO:108 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal 011 agonista de OX40.

SEQ ID NO:109 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal 021 agonista de OX40.

SEQ ID NO:110 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal 021 agonista de OX40.

SEQ ID NO:111 es la región variable de cadena pesada (V_H) para el anticuerpo monoclonal 023 agonista de OX40.

SEQ ID NO:112 es la región variable de cadena ligera (V_L) para el anticuerpo monoclonal 023 agonista de OX40.

SEQ ID NO:113 es la región variable de cadena pesada (V_H) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40.

SEQ ID NO:114 es la región variable de cadena ligera (V_L) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40.

SEQ ID NO:115 es la región variable de cadena pesada (V_H) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40.

SEQ ID NO:116 es la región variable de cadena ligera (V_L) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40.

SEQ ID NO:117 es la región variable de cadena pesada (V_H) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:118 es la región variable de cadena pesada (V_H) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:119 es la región variable de cadena ligera (V_L) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:120 es la región variable de cadena ligera (V_L) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:121 es la región variable de cadena pesada (V_H) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:122 es la región variable de cadena pesada (V_H) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:123 es la región variable de cadena ligera (V_L) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:124 es la región variable de cadena ligera (V_L) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 humanizado.

SEQ ID NO:125 es la región variable de cadena pesada (V_H) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40.

SEQ ID NO:126 es la región variable de cadena ligera (V_L) para un anticuerpo monoclonal agonista de OX40.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las patentes y publicaciones a las que se hace referencia en la presente descripción se incorporan como referencia en su totalidad.

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

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

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

El término "expansión rápida" significa un aumento en el número de TIL específicos para un antígeno de al menos aproximadamente 3 veces (o 4, 5, 6, 7, 8 o 9 veces) durante un período de una semana, con mayor preferencia al menos aproximadamente 10 veces (o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 veces) durante un período de una semana, o con la máxima preferencia en al menos unas 100 veces durante un período de una semana. Más abajo se describen varios protocolos de expansión rápida.

Por "linfocitos infiltrantes de tumor" o "TIL" en la presente descripción se entiende una población de células que se obtienen originalmente como leucocitos que han

abandonado el torrente sanguíneo de un sujeto y migraron a un tumor. Los TIL incluyen, pero no se limitan a, células T citotóxicas $CD8^+$ (linfocitos), células T $CD4^+$ Th1 y Th17, células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto los TIL primarios como los secundarios. Los "TIL primarios" son aquellos que se obtienen de muestras de tejido de pacientes como se describe en la presente descripción (a veces denominados "recién obtenidos" o "recién aislados"), y los "TIL secundarios" son cualquiera de las poblaciones celulares de TIL que se hayan expandido o proliferado como se discutió en la presente descripción, que incluye, entre otros, TIL mayoritarios y TIL expandidos ("REP TIL" o "post-REP TIL"). Las poblaciones celulares TIL pueden incluir TIL modificados genéticamente.

Por "población de células" (que incluye los TIL) en la presente descripción se entiende un número de células que comparten características comunes. En general, las poblaciones oscilan entre 1×10^6 a 1×10^{10} en número, con diferentes poblaciones de TIL que comprenden diferentes números. Por ejemplo, el crecimiento inicial de TIL primarios en presencia de IL-2 resulta en una población de TIL mayoritaria de aproximadamente 1×10^8 células. La expansión del REP se realiza generalmente para proporcionar poblaciones de $1,5 \times 10^9$ a $1,5 \times 10^{10}$ células para infusión. En algunas modalidades, la expansión del REP se realiza para proporcionar poblaciones de $2,3 \times 10^{10} – 13,7 \times 10^{10}$.

Por "TIL crioconservados" en la presente descripción se entiende que los TIL, primarios, mayoritarios o expandidos (REP TIL), se tratan y almacenan en el intervalo de aproximadamente -150 °C a -60 °C. Los métodos generales para la crioconservación también se describen en otra parte en la presente descripción, que se incluye en los Ejemplos. Para mayor claridad, los "TIL crioconservados" son distintos de las muestras de tejido congeladas que pueden usarse como fuente de TIL primarios.

Por "TIL crioconservados descongelados" en la presente descripción se entiende una población de TIL que se crioconservó previamente y después se trató para volver a temperatura ambiente o superior, que incluye, entre otras, temperaturas de cultivo celular o temperaturas en donde pueden administrarse TIL a un paciente.

Los TIL generalmente pueden definirse bioquímicamente, mediante el uso de marcadores de superficie celular, o funcionalmente, por su capacidad para infiltrar tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL generalmente pueden clasificarse mediante la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1, y CD25. Además, y alternativamente, los

TIL pueden definirse funcionalmente por su capacidad para infiltrar tumores sólidos después de la reintroducción en un paciente.

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

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

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

El término "sistema cerrado" se refiere a un sistema que es cerrado con respecto al entorno exterior. Puede emplearse cualquier sistema cerrado apropiado para métodos de cultivo celular con los métodos de la presente invención. Los sistemas cerrados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a recipientes G cerrados. Una vez que se añade

un segmento tumoral al sistema cerrado, el sistema no se abre al ambiente exterior hasta que los TIL estén listos para administrarse al paciente.

Los términos "fragmentación", "fragmento" y "fragmentado", como se usan en la presente descripción para describir los procesos para romper un tumor, incluyen métodos de fragmentación mecánica tales como triturar, cortar, dividir y morcelar el tejido tumoral, así como también cualquier otro método para romper la estructura física del tejido tumoral.

El término "aspiración con aguja fina" o FNA se refiere a un tipo de procedimiento de biopsia que puede emplearse para procedimientos de muestreo o diagnóstico, que incluye el muestreo de tumores, en el que se toma una muestra pero el tumor no se extrae ni se extirpa. En la aspiración con aguja fina, una aguja hueca, por ejemplo de calibre 25-18, se inserta en el tumor o en un área que contiene el tumor y se obtienen líquido y células (que incluye el tejido) para análisis o expansión adicionales, como se describe en la presente descripción. Con una FNA, las células se eliminan sin conservar la arquitectura histológica de las células del tejido. Una FNA puede comprender TIL. En algunos casos, se realiza una biopsia por aspiración con aguja fina mediante el uso de una aguja de biopsia por aspiración con aguja fina guiada por ecografía. Las agujas de FNA están disponibles comercialmente de Becton Dickinson, Covidien y similares.

El término "biopsia con aguja gruesa" o "punción biópsica con aguja gruesa" se refiere a un tipo de procedimiento de biopsia que puede emplearse para procedimientos de muestreo o diagnóstico, que incluye el muestreo de tumores, en donde se toma una muestra pero el tumor no se extrae ni se extirpa. En una biopsia con aguja gruesa, se inserta una aguja hueca, por ejemplo de calibre 16-11, en el tumor o en un área que contiene el tumor y se obtienen líquido y células (que incluye el tejido) para análisis o expansión adicionales, como se describe en la presente descripción. Con una biopsia con aguja gruesa, las células pueden extraerse con cierta conservación de la arquitectura histológica de las células del tejido, dado el tamaño de aguja más grande en comparación con una FNA. La aguja de la biopsia con aguja gruesa es generalmente de un calibre que puede preservar al menos una parte de la arquitectura histológica del tumor. Una biopsia con aguja gruesa puede comprender TIL. En algunos casos, una biopsia con aguja gruesa se realiza mediante el uso de un instrumento de biopsia, un instrumento de biopsia con aguja gruesa asistido por vacío, un instrumento de biopsia con aguja gruesa guiado estereotácticamente, un instrumento de biopsia con aguja

gruesa guiado por ecografía, un instrumento de biopsia con aguja gruesa guiado por MRI disponible comercialmente de Bard Medical, Becton Dickinson y similares.

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

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

El término "anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo o una variante de este, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal y que incluye anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos que se dirigen contra el receptor CD3 en el receptor de antígeno de células T de células T maduras. Los anticuerpos anti-CD3 incluyen OKT-3, también conocido como muromonab. Los anticuerpos anti-CD3 incluyen, además, el clon UHCT1, también conocido como T3 y CD3ε. Otros anticuerpos anti-CD3 incluyen, por ejemplo, otelixizumab, teplizumab y visilizumab.

El término "OKT-3" (también denominado en la presente descripción como "OKT3") se refiere a un anticuerpo monoclonal o biosimilar o variante de este, que incluye anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos, dirigidos contra el receptor CD3 en el receptor del antígeno de células T de células T maduras, e incluye formas disponibles comercialmente tales como OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 puro, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, EE.UU.) y muromonab o variantes, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas o biosimilares de estos. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de muromonab se proporcionan en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2). Se depositó un hibridoma capaz de producir OKT-3 con la Colección Americana de Tipos de Cultivos y se le asignó el número de acceso ATCC CRL 8001. Un hibridoma capaz de producir OKT-3 también se depositó con la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC) y se le asignó el número de catálogo 86022706.

TABLA 1. Secuencias de aminoácidos de muromonab.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:1 Cadena pesada de muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Cadena ligera de muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

El término "IL-2" (también denominado en la presente descripción como "IL2") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-2, e incluye todas las formas de IL-2, que incluye las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biosimilares y variantes de estas. La IL-2 se describe, por ejemplo, en Nelson, *J. Immunol.* **2004,** *172,* 3983-88 y Malek, *Annu. Rev. Immunol.* **2008,** *26,* 453-79, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. La secuencia de aminoácidos de IL-2 humana recombinante adecuada para usar en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:3). Por ejemplo, el término IL-2 abarca formas humanas recombinantes de IL-2 tal como la aldesleucina (PROLEUKIN, disponible comercialmente de múltiples proveedores en 22 millones de UI por viales de un solo uso), así como también la forma de IL-2 recombinante suministrada comercialmente por CellGenix, Inc., Portsmouth, NH,

EE.UU. (CELLGRO GMP) o ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, Nueva Jersey, EE.UU. (Cat. Núm. CYT-209-b) y otros equivalentes comerciales de otros proveedores. La aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana) es una forma recombinante humana no glicosilada de IL-2 con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. La secuencia de aminoácidos de la aldesleucina adecuada para usar en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:4). El término IL-2 abarca, además, formas pegiladas de IL-2, como se describe en la presente descripción, que incluye el profármaco de IL2 pegilada NKTR-214, disponible de Nektar Therapeutics, San Francisco del Sur, CA, EE.UU. La NKTR-214 y la IL-2 pegilada adecuada para usar en la invención se describen en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. Núm. US 2014/0328791 A1 y en la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO 2012/065086 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las formas alternativas de IL-2 conjugada adecuadas para usar en la invención se describen en las Patentes de los EE.UU. Núms. 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 y 4902,502, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las formulaciones de IL-2 adecuadas para usar en la invención se describen en la Patente de los EE.UU. núm. 6,706,289, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia.

TABLA 2. Secuencias de aminoácidos de interleucinas.

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:3 IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Aldesleucina	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60

IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

El término "IL-4" (también denominado en la presente descripción "IL4") se refiere a la citocina conocida como interleucina 4, que es producida por células T Th2 y por eosinófilos, basófilos y mastocitos. IL-4 regula la diferenciación de células T cooperadoras vírgenes (células Th0) a células T Th2. Steinke and Borish, *Respir. Res.* **2001,** *2,* 66-70. Después de la activación por IL-4, las células T Th2 producen posteriormente IL-4 adicional en un circuito de retroalimentación positiva. IL-4 estimula, además, la proliferación de células B y la expresión del MHC de clase II e induce el cambio de clase hacia la expresión de IgE e IgG_1 de las células B. La IL-4 humana recombinante adecuada para usar en la invención está disponible comercialmente de múltiples proveedores, que incluyen ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE. UU. (Cat. Núm. CYT-211) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE.UU. (Proteína recombinante IL-15 humana, cat. Núm. Gibco CTP0043). La secuencia de aminoácidos de IL-4 humana recombinante adecuada para usar en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:5).

El término "IL-7" (también denominado en la presente descripción "IL7") se refiere a una citocina glicosilada derivada de tejido conocida como interleucina 7, que puede obtenerse de células estromales y epiteliales, así como también de células dendríticas. Fry and Mackall, *Blood* **2002,** *99,* 3892-904. La IL-7 puede estimular el desarrollo de células T. La IL-7 se une al receptor de IL-7, un heterodímero que consiste en el receptor alfa de IL-7 y el receptor de cadena gamma común, que transduce una serie de señales importantes para el desarrollo de las células T dentro del timo y la supervivencia en la

periferia. La IL-7 humana recombinante adecuada para usar en la invención está disponible comercialmente de múltiples proveedores, que incluyen ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE.UU. (Cat. Núm. CYT-254) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE.UU. (Proteína recombinante IL-15 humana, cat. Núm. Gibco PHC0071). La secuencia de aminoácidos de IL-7 humana recombinante adecuada para usar en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:6).

El término "IL-15" (también denominado en la presente descripción como "IL15") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-15, e incluye todas las formas de IL-2, que incluye las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biosimilares y variantes de estas. La IL-15 se describe, por ejemplo, en Fehniger and Caligiuri, *Blood* **2001,** *97,* 14-32, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. La IL-15 comparte subunidades de receptores de señalización β y γ con IL-2. La IL-15 humana recombinante es una sola cadena polipeptídica no glicosilada que contiene 114 aminoácidos (y una metionina N-terminal) con una masa molecular de 12,8 kDa. La IL-15 humana recombinante está disponible comercialmente de múltiples proveedores, que incluyen ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE.UU. (Cat. Núm. CYT-230-b) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE.UU. (proteína recombinante IL-15 humana, cat. Núm. 34-8159-82). La secuencia de aminoácidos de IL-15 humana recombinante adecuada para usar en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:7).

El término "IL-21" (también denominado en la presente descripción como "IL21") se refiere a la proteína citocina pleiotrópica conocida como interleucina-21, e incluye todas las formas de IL-21, que incluye las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biosimilares y variantes de estas. La IL-21 se describe, por ejemplo, en Spolski and Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2014,** *13,* 379-95, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. La IL-21 es producida principalmente por células T asesinas naturales y células T $CD4^+$ humanas activadas. La IL-21 humana recombinante es una cadena polipeptídica única no glicosilada que contiene 132 aminoácidos con una masa molecular de 15,4 kDa. La IL-21 humana recombinante está disponible comercialmente de múltiples proveedores, que incluyen ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE.UU. (Cat. Núm. CYT-408-b) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE.UU. (Proteína recombinante IL-21 humana, cat. Núm. 14-8219-80). La secuencia de aminoácidos de

IL-21 humana recombinante adecuada para usar en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO:8).

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

El término "neoplasia maligna hematológica", "malignidad hematológica" o términos de significado correlativo se refieren a cánceres de mamíferos y tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides, que incluyen pero no se limitan a tejidos de la sangre, médula ósea, ganglios linfáticos y sistema linfático. Las neoplasias malignas hematológicas también se denominan como "tumores líquidos". Las neoplasias malignas hematológicas incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma linfocítico crónico (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica aguda (AMoL), linfoma de Hodgkin, y linfomas no Hodgkin. El término "neoplasia hematológica de células B" se refiere a neoplasias hematológicas que afectan a las células B.

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

El término "tumor líquido" se refiere a una masa anormal de células que es de naturaleza fluida. Los cánceres de tumores líquidos incluyen, pero no se limitan a, leucemias, mielomas y linfomas, así como también otras neoplasias malignas hematológicas. Los TIL que se obtienen de tumores líquidos también pueden denominarse en la presente descripción linfocitos infiltrantes de médula (MIL). Los TIL que se obtienen de tumores líquidos, que incluyen los tumores líquidos que circulan en sangre periférica, además pueden denominarse en la presente descripción PBL. Los términos MIL, TIL y PBL se usan indistintamente en la presente descripción y difieren únicamente en función del tipo de tejido del que se derivan las células.

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

En una modalidad, la invención incluye un método para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde un paciente se trata previamente con quimioterapia no mielosupresora antes de una infusión de TIL de acuerdo con la invención. En algunas modalidades, puede proporcionarse la población de TIL en donde un paciente se trata

previamente con quimioterapia no mielosupresora antes de una infusión de TIL de acuerdo con la presente invención. En una modalidad, la quimioterapia no mielosupresora es ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 26 antes de la infusión de TIL) y fludarabina 25 mg/m2/d durante 5 días (días 27 a 23 antes de la infusión de TIL). En una modalidad, después de la quimioterapia no mielosupresora y la infusión de TIL (en el día 0) de acuerdo con la invención, el paciente recibe una infusión intravenosa de IL-2 por vía intravenosa a 720 000 UI/kg cada 8 horas hasta la tolerancia fisiológica.

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

Los términos "coadministración", "administración conjunta", "administrado en combinación con", "administración en combinación con", "simultáneo" y "concurrente", como se usan en la presente descripción, abarcan la administración de dos o más ingredientes farmacéuticos activos (en una modalidad preferida de la presente invención, por ejemplo, al menos un agonista del canal de potasio en combinación con una pluralidad de TIL) a un sujeto de manera que ambos ingredientes farmacéuticos activos y/o sus metabolitos estén presentes en el sujeto al mismo tiempo. La coadministración incluye la administración simultánea en composiciones separadas, la administración en diferentes momentos en composiciones separadas o la administración en una composición en la que están presentes dos o más ingredientes farmacéuticos activos. Se prefiere la administración simultánea en composiciones separadas y la administración en una composición en donde están presentes ambos agentes.

El término "cantidad con eficacia" o "cantidad con eficacia terapéutica" se refiere a la cantidad de un compuesto o combinación de compuestos como se describe en la presente descripción que es suficiente para efectuar la aplicación pretendida que incluye, pero no se limita a, el tratamiento de la enfermedad. Una cantidad con eficacia terapéutica puede variar según la aplicación prevista (in vitro o in vivo), o el sujeto y la afección que se está tratando (por ejemplo, el peso, la edad y el sexo del sujeto), la

gravedad de la enfermedad o la forma de administración. El término se aplica, además, a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células diana (por ejemplo, la reducción de la adhesión plaquetaria y/o la migración celular). La dosis específica variará en dependencia de los compuestos particulares elegidos, el régimen de dosificación a seguir, si el compuesto se administra en combinación con otros compuestos, el momento de administración, el tejido al que se administra y el sistema de suministro físico en donde se transporta el compuesto.

Los términos "tratamiento", "tratar", "terapia" y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad o síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente descripción, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado como que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o progresión; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad. "Tratamiento" también pretende abarcar la administración de un agente con el fin de proporcionar un efecto farmacológico, incluso en ausencia de una enfermedad o afección. Por ejemplo, "tratamiento" abarca la administración de una composición que puede provocar una respuesta inmunitaria o conferir inmunidad en ausencia de una enfermedad, por ejemplo, en el caso de una vacuna.

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

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

Como se usa en la presente descripción, el término "variante" abarca, pero no se limita a, proteínas, anticuerpos o proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de una proteína de referencia, anticuerpo o proteína de fusión por una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones en determinadas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, proteína o proteína de fusión de referencia. La variante puede comprender una o más sustituciones conservadoras en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de referencia. Las sustituciones conservadoras pueden implicar, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. La variante conserva la capacidad de unirse específicamente al antígeno del anticuerpo, proteína o proteína de

fusión de referencia. El término variante incluye, además, anticuerpos o proteínas pegilados.

Por "linfocitos infiltrantes de tumor" o "TIL" en la presente descripción se entiende una población de células que se obtienen originalmente como leucocitos que han abandonado el torrente sanguíneo de un sujeto y migraron a un tumor. Los TIL incluyen, pero no se limitan a, células T citotóxicas $CD8^+$ (linfocitos), células T $CD4^+$ Th1 y Th17, células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto los TIL primarios como los secundarios. Los "TIL primarios" son aquellos que se obtienen de muestras de tejido de pacientes como se describe en la presente descripción (a veces denominados "recién obtenidos" o "recién aislados"), y los "TIL secundarios" son cualquier población de células TIL que se hayan expandido o proliferado como se discutió en la presente descripción, que incluye, pero no se limita a, TIL mayoritarios, TIL expandidos ("REP TIL") así como también "reREP TIL" como se describe en la presente descripción. Los TIL del reREP pueden incluir, por ejemplo, TIL de segunda expansión o TIL de segunda expansión adicional (tal como, por ejemplo, los descritos en la etapa D de la Figura 1, que incluye los TIL denominados TIL del reREP).

Los TIL generalmente pueden definirse bioquímicamente, mediante el uso de marcadores de superficie celular, o funcionalmente, por su capacidad para infiltrar tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL generalmente pueden clasificarse mediante la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1, y CD25. Además, y alternativamente, los TIL pueden definirse funcionalmente por su capacidad para infiltrar tumores sólidos después de la reintroducción en un paciente. Los TIL puede caracterizarse, además, por su potencia; por ejemplo, los TIL puede considerarse potente si, por ejemplo, la liberación de interferón (IFN) es mayor que aproximadamente 50 pg/ml, mayor que aproximadamente 100 pg/ml, mayor que aproximadamente 150 pg/ml o mayor que aproximadamente 200 pg/ml. Los TIL puede considerarse potente si, por ejemplo, la liberación de interferón (IFNγ) es mayor que aproximadamente 50 pg/ml, mayor que aproximadamente 100 pg/ml, mayor que aproximadamente 150 pg/ml o mayor que aproximadamente 200 pg/ml, mayor que aproximadamente 300 pg/ml, mayor que aproximadamente 400 pg/ml, mayor que aproximadamente 500 pg/ml, mayor que aproximadamente 600 pg/ml, mayor que aproximadamente 700 pg/ml, mayor que aproximadamente 800 pg/ml, mayor que aproximadamente 900 pg/ml, mayor que aproximadamente 1000 pg/ml.

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

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

Los términos transitorios "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en", cuando se usan en las reivindicaciones adjuntas, en forma original y enmendada, definen el alcance de la reivindicación con respecto a los elementos o etapas adicionales de la reivindicación no citados, si los hubiera, están excluidos del alcance de las reivindicaciones. El término "que comprende" pretende ser inclusivo o ilimitado y no excluye ningún elemento, método, etapa o material adicional no mencionado. El término "compuesto por" excluye cualquier elemento, etapa o material

distinto de los especificados en la reivindicación y, en este último caso, las impurezas ordinarias asociadas con los materiales especificados. El término "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los elementos, etapas o materiales especificados y aquellos que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Todas las composiciones, métodos y kits descritos en la presente descripción que incorporan la presente invención pueden, en modalidades alternativas, definirse más específicamente mediante cualquiera de los términos de transición "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en."

II. Procesos de Producción de TIL (Modalidades de los Procesos GEN3, que opcionalmente incluyen Medios Definidos)

Sin limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que la primera expansión con sensibilización que induce una activación de células T seguida de la segunda expansión rápida que aumenta la activación de células T como se describe en los métodos de la invención permite la preparación de células T expandidas que retienen un fenotipo "más joven" y, como tales, se espera que las células T expandidas de la invención exhiban una mayor citotoxicidad contra las células cancerosas que las células T expandidas mediante otros métodos. En particular, se cree que una activación de las células T que se sensibilizan mediante la exposición a un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT-3), IL-2 y, opcionalmente, células presentadoras de antígeno (APC) y después se refuerza mediante la exposición posterior a más anticuerpo anti-CD-3 adicional (por ejemplo, OKT-3), IL-2 y APC como se enseña en los métodos de la invención limita o evita la maduración de las células T en cultivo, produciendo una población de células T con un fenotipo menos maduro, en el que las células T se extenúan menos por la expansión en cultivo y exhiben una mayor citotoxicidad contra las células cancerosas. En algunas modalidades, la etapa de la segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida mediante el cultivo de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia de las células T del cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500MCS y cultivar las células T del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala en el segundo recipiente durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado del cultivo mediante: (a)

realizar la segunda expansión rápida mediante el cultivo de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de las células T desde el primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes que son iguales en tamaño al primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente la porción de las células T del primer cultivo a pequeña escala transferidas a dicho segundo recipiente se cultivan en un segundo cultivo a pequeña escala durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y una ampliación del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida mediante el cultivo de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un contenedor G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de las células T desde el cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado y una ampliación del cultivo mediante: (a) realizar la segunda expansión rápida mediante el cultivo de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de las células T del cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de células T del cultivo a pequeña escala transferida a dicho segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 5 días.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida se realiza después que la activación de las células T efectuada mediante la primera expansión con sensibilización comienza a disminuir, atenuar, descomponer o declinar.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida se realiza después que la activación de las células T efectuada mediante la primera expansión con sensibilización

haya disminuido en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida se realiza después que la activación de las células T efectuada mediante la primera expansión con sensibilización haya disminuido en un porcentaje en el intervalo de aproximadamente 1 % a 100 %.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida se realiza después que la activación de las células T efectuada por la primera expansión con sensibilización haya disminuido en un porcentaje en el intervalo de aproximadamente 1 % a 10 %, 10 % a 20 %, 20 % a 30 %, 30 % a 40 %, 40 % a 50 %, 50 % a 60 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 80 % a 90 % o 90 % a 100 %.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida se realiza después que la activación de las células T efectuada mediante la primera expansión con sensibilización haya disminuido al menos en o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 %.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida se realiza después que la activación de las células T efectuada mediante la primera expansión con sensibilización haya disminuido hasta o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %.

En algunas modalidades, la disminución en la activación de células T efectuada mediante la primera expansión con sensibilización se determina por una reducción en la cantidad de interferón gamma liberado por las células T en respuesta a la estimulación con antígeno.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 7 días o aproximadamente 8 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 11 días.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días u 11 días.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días u 11 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día, o aproximadamente 7 días y la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día hasta, o aproximadamente, 11 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días y la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días u 11 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día hasta o aproximadamente 8 días y la segunda expansión rápida de células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día hasta o aproximadamente 9 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de 8 días y la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de 9 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día hasta o aproximadamente 7 días y la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de hasta o aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 9 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de las células T se realiza durante un período de 7 días y la segunda expansión rápida de las células T se realiza durante un período de 9 días.

En algunas modalidades, las células T son linfocitos infiltrantes de tumor (TIL).

En algunas modalidades, las células T son linfocitos infiltrantes de la médula (MIL).

En algunas modalidades, las células T son linfocitos de sangre periférica (PBL).

En algunas modalidades, las células T se obtienen de un donante que padece cáncer.

En algunas modalidades, las células T son TIL que se obtienen de un tumor extirpado de un paciente que padece cáncer.

En algunas modalidades, las células T son MIL que se obtienen de la médula ósea de un paciente que padece una neoplasia maligna hematológica.

En algunas modalidades, las células T son PBL que se obtienen de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante. En algunas modalidades, el donante padece cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es el cáncer que se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el

carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el donante padece de un tumor. En algunas modalidades, el tumor es un tumor líquido. En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, el donante padece una neoplasia maligna hematológica.

En determinados aspectos de la presente descripción, las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, las células T, pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre que se extrae de un sujeto mediante el uso de cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tal como la separación por FICOLL. En un aspecto preferido, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, que incluye linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otras células leucocitarias nucleadas, eritrocitos y plaquetas. En un aspecto, las células recolectadas mediante aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y, opcionalmente, colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En una modalidad, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una modalidad alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, cationes divalentes. En un aspecto, las células T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y eliminando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL o mediante elutriación por centrifugación a contraflujo.

En algunas modalidades, las células T son PBL separados de sangre completa o producto de aféresis enriquecido en linfocitos de un donante. En algunas modalidades, el donante padece cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es el cáncer que se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el

carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el donante padece de un tumor. En algunas modalidades, el tumor es un tumor líquido. En algunas modalidades, el tumor es un tumor sólido. En algunas modalidades, el donante padece una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, los PBL se aíslan de sangre completa o producto de aféresis enriquecido para linfocitos mediante el uso de métodos de selección positiva o negativa, es decir, eliminando los PBL mediante el uso de marcadores, por ejemplo, CD3+ CD45+, para el fenotipo de células T, o eliminando células de fenotipo de diferente a las células T, dejando los PBL. En otras modalidades, los PBL se aíslan mediante centrifugación en gradiente. Tras el aislamiento de los PBL del tejido del donante, la primera expansión con sensibilización de los PBL puede iniciarse sembrando un número adecuado de PBL aislados (en algunas modalidades, aproximadamente 1×10^7 PBL) en el primer cultivo de la primera expansión con sensibilización de acuerdo con la primera etapa de expansión con sensibilización de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

Un de proceso TIL ilustrativo conocido como proceso 3 (también denominado en la presente descripción GEN3) que contiene algunas de estas características se representa en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), y algunas de las ventajas de esta modalidad de la presente invención sobre el proceso 2A se describen en las Figuras 1, 2, 30 y 31 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En las Figuras 1 y 30 se muestran dos modalidades del proceso 3 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). El proceso 2A o Gen 2 también se describe en la publicación de patente de los EE.UU. núm. 2018/0280436, incorporada en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Como se analiza y se describe en general en la presente descripción, los TIL se toman de una muestra de paciente y se manipulan para expandir su número antes del trasplante en un paciente mediante el uso del proceso de expansión de TIL descrito en la presente descripción y denominado Gen 3. En algunas modalidades, los TIL pueden manipularse genéticamente opcionalmente como se describe más abajo. En algunas modalidades, los TIL pueden crioconservarse antes o después de la expansión. Una vez descongelados, también pueden estimularse nuevamente para aumentar su metabolismo antes de la infusión en un paciente.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye los procesos referidos en la presente descripción como la expansión previa a la rápida (Pre-REP), así como también los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) como la Etapa B) se acorta de 1 a 8 días y la segunda expansión rápida (que incluye los procesos a los que se hace referencia en la presente descripción como Protocolo de Expansión Rápida (REP), así como también los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) como Etapa D) se acorta de 1 a 9 días, como se explica en detalle más abajo, así como en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye los procesos referidos en la presente descripción como la expansión previa a la rápida (Pre-REP), así como también los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) como la Etapa B) se acorta de 1 a 8 días y la segunda expansión rápida (que incluye los procesos a los que se hace referencia en la presente descripción como Protocolo de Expansión Rápida (REP), así como los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) como la Etapa D) se acorta de 1 a 8 días, como se explica en detalle más abajo, así como en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye los procesos referidos en la presente descripción como la expansión previa a la rápida (Pre-REP), así como también los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) como la Etapa B) se acorta de 1 a 7 días y la segunda expansión rápida (que incluye los procesos a los que se hace referencia en la presente descripción como Protocolo de Expansión Rápida (REP), así como también los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) como la Etapa D) se acorta de 1 a 9 días, como se explica en detalle más abajo, así como en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye los procesos referidos en la presente descripción como la expansión previa a la rápida (Pre-REP), así como también los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) como la Etapa B) es de 1 a 7 días y la segunda expansión rápida (que incluye los procesos denominados en la presente descripción Protocolo de Expansión Rápida (REP), así como también los procesos que se muestran en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) como la Etapa D) es de 1 a 10 días, como se explica en detalle más abajo, así como en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión

descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) se acorta a 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una la expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 7 a 9 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) es de 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 8 a 9 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) se acorta a 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una la expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 7 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) se acorta a 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una la expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) es de 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión como se describe en la etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 9 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) es de 8 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión como se describe en la etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 10 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) es de 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión como se describe en la etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 7 a 10 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o Figura 1C) es de 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 8 a 10 días. En algunas

modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o Figura 1C) es de 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 9 a 10 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, una expansión descrita como Etapa B en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C) se acorta a 7 días y la segunda expansión rápida (por ejemplo, una expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es de 7 a 9 días. En algunas modalidades, la combinación de la primera expansión con sensibilización y la segunda expansión rápida (por ejemplo, las expansiones descritas como Etapa B y Etapa D en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o Figura 1C) es de 14 a 16 días, como se explica en detalle más abajo y en los ejemplos y figuras. En particular, se considera que determinadas modalidades de la presente invención comprenden una etapa de primera expansión con sensibilización en la que los TIL se activan mediante la exposición a un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3 en presencia de IL-2 o exposición a un antígeno en la presencia de al menos IL-2 y un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3. En determinadas modalidades, los TIL que se activan en la etapa de la primera expansión con sensibilización como se describe anteriormente son una primera población de TIL, es decir, que son una población de células primarias.

Las designaciones de "Etapas" A, B, C, etcétera, más abajo, se refieren al ejemplo no limitativo de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) y en referencia a ciertas modalidades no limitantes descritas en la presente descripción. El orden de las Etapas más abajo y en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) es ilustrativo y cualquier combinación u orden de etapas, así como también etapas adicionales, repetición de etapas y/u omisión de etapas está contemplado por la presente solicitud y los métodos descritos en la presente descripción.

A. ETAPA A: Obtener una muestra tumoral del paciente

En general, los TIL se obtienen inicialmente de una muestra de tumor del paciente ("TIL primarios") o de linfocitos circulantes, tales como linfocitos de sangre periférica, que incluye linfocitos de sangre periférica que tienen características similares a los TIL, y después se expanden a una población más grande para su manipulación adicional como

se describe en la presente descripción, opcionalmente, crioconservado, y opcionalmente evaluado por el fenotipo y parámetros metabólicos como una indicación de la salud de los TIL.

Puede obtenerse una muestra tumoral de un paciente mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, generalmente mediante extirpación quirúrgica, biopsia con aguja u otros medios para obtener una muestra que contiene una mezcla de células tumorales y de TIL. En general, la muestra tumoral puede ser de cualquier tumor sólido, que incluye tumores primarios, tumores invasores o tumores metastásicos. La muestra tumoral también puede ser un tumor líquido, tal como un tumor que se obtiene de una neoplasia maligna hematológica. El tumor sólido puede ser de cualquier tipo de cáncer, que incluye, pero no se limita a, mama, páncreas, próstata, colorrectal, pulmón, cerebro, riñón, estómago y piel (que incluye, entre otros, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y melanoma). En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello (que incluye, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario, sarcoma, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo y carcinoma de pulmón de células no pequeñas. En algunas modalidades, se obtienen TIL útiles a partir de tumores de melanoma malignos, ya que se ha informado que estos tienen niveles particularmente altos de TIL.

Una vez que se obtiene, la muestra de tumor se fragmenta generalmente mediante el uso de disección con bisturí en pequeñas piezas de entre 1 y aproximadamente 8 mm^3, siendo particularmente útil los de aproximadamente 2-3 mm^3. Los TIL se cultivan a partir de estos fragmentos mediante el uso de digestiones tumorales enzimáticas. Tales digestiones tumorales pueden producirse mediante incubación en medios enzimáticos (por ejemplo, Tampón 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), glutamato 2 mM, gentamicina 10 mcg/mL, 30 unidades/mL de DNasa y 1,0 mg/mL de colagenasa) seguido de disociación mecánica (*por ejemplo*, mediante el uso de un disociador de tejidos). La digestión tumoral puede producirse al colocar el tumor en medios enzimáticos y disociar mecánicamente el tumor por aproximadamente 1 minuto, seguido de la incubación por 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 %, seguido de ciclos repetidos de disociación mecánica y la incubación bajo las condiciones anteriores hasta que sólo pequeños trozos de tejido se encuentran presentes. Al final de este proceso, si la suspensión celular contiene una gran cantidad de eritrocitos o células muertas, puede

realizarse una separación en gradiente de densidad mediante el uso de un polisacárido hidrófilo ramificado FICOLL para eliminar estas células. Pueden usarse métodos alternativos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0244133 A1, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. Cualquiera de los métodos anteriores puede usarse en cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción para métodos de expansión de TIL o métodos para tratar un cáncer.

Como se indicó anteriormente, en algunas modalidades, los TIL se derivan de tumores sólidos. En algunas modalidades, los tumores sólidos no están fragmentados. En algunas modalidades, los tumores sólidos no se fragmentan y se someten a digestión enzimática como tumores completos. En algunas modalidades, los tumores se digieren en una mezcla de enzimas que comprende colagenasa, ADNasa e hialuronidasa. En algunas modalidades, los tumores se digieren en una mezcla de enzimas que comprende colagenasa, ADNasa e hialuronidasa durante 1-2 horas. En algunas modalidades, los tumores se digieren en una mezcla de enzimas que comprende colagenasa, ADNasa e hialuronidasa durante 1-2 horas a 37 °C, 5 % de CO_2. En algunas modalidades, los tumores se digieren en una mezcla de enzimas que comprende colagenasa, ADNasa e hialuronidasa durante 1-2 horas a 37 °C, 5 % de CO_2 con rotación. En algunas modalidades, los tumores se digieren durante la noche con rotación constante. En algunas modalidades, los tumores se digieren durante la noche a 37 °C, 5 % de CO_2 con rotación constante.En algunas modalidades, el tumor completo se combina con las enzimas para formar una mezcla de reacción de digestión del tumor.

En algunas modalidades, el tumor se reconstituye con las enzimas liofilizadas en un tampón estéril. En algunas modalidades, el tampón es HBSS estéril.

En algunas modalidades, la mezcla de enzimas comprende colagenasa. En algunas modalidades, la colagenasa es colagenasa IV. En algunas modalidades, la solución de reserva de trabajo para la colagenasa es una solución de reserva de trabajo de 100 mg/ml 10X.

En algunas modalidades, la mezcla de enzimas comprende ADNasa. En algunas modalidades, la solución de reserva de trabajo para la ADNasa es una solución de reserva de trabajo 10X de 10 000 UI/ml.

En algunas modalidades, la mezcla de enzimas comprende hialuronidasa. En algunas modalidades, la solución de reserva de trabajo para la hialuronidasa es una solución de reserva de trabajo 10X de 10 mg/ml.

En algunas modalidades, la mezcla de enzimas comprende colagenasa 10 mg/ml, ADNasa 1000 UI/ml e hialuronidasa 1 mg/ml.

En algunas modalidades, la mezcla de enzimas comprende colagenasa 10 mg/ml, ADNasa 500 UI/ml e hialuronidasa 1 mg/ml.

En general, la suspensión de células que se obtiene del tumor se denomina "población de células primarias" o población de células "recién obtenida" o "recién aislada". En determinadas modalidades, la población celular de TIL recién obtenida se expone a un medio de cultivo celular que comprende células presentadoras de antígeno, IL-12 y OKT-3.

En algunas modalidades, la fragmentación incluye la fragmentación física, que incluye, por ejemplo, disección así como también digestión. En algunas modalidades, la fragmentación es una fragmentación física. En algunas modalidades, la fragmentación es disección. En algunas modalidades, la fragmentación es mediante digestión. En algunas modalidades, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones tumorales enzimáticas y fragmentos tumorales que se obtienen de pacientes. En una modalidad, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones tumorales enzimáticas y fragmentos tumorales que se obtienen de pacientes.

En algunas modalidades, donde el tumor es un tumor sólido, el tumor sufre fragmentación física después de que se obtiene la muestra de tumor en, por ejemplo, la Etapa A (como se proporciona en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la fragmentación se produce antes de la crioconservación. En algunas modalidades, la fragmentación se produce después de la crioconservación. En algunas modalidades, la fragmentación se produce después de obtener el tumor y en ausencia de cualquier crioconservación. En algunas modalidades, la etapa de fragmentación es un proceso *in vitro* o *ex vivo*. En algunas modalidades, el tumor se fragmenta y se colocan 10, 20, 30, 40 o más fragmentos o piezas en cada recipiente para la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, el tumor se fragmenta y se colocan 30 o 40 fragmentos o piezas en cada recipiente para la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, el tumor se fragmenta y se colocan 40 fragmentos o piezas en cada recipiente para la primera

expansión con sensibilización. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente de 4 a aproximadamente 50 fragmentos, en donde cada fragmento tiene un volumen de aproximadamente 27 mm^3. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1300 mm^3 a aproximadamente 1500 mm^3. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1350 mm^3. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con una masa total de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 1,5 gramos. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 4 fragmentos.

En algunas modalidades, los TIL se obtienen a partir de fragmentos tumorales. En algunas modalidades, el fragmento de tumor se obtiene mediante disección con bisturí. En algunas modalidades, el fragmento de tumor está entre aproximadamente 1 mm^3 y 10 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento tumoral se encuentra entre aproximadamente 1 mm^3 y 8 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento tumoral se encuentra en aproximadamente 1 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento tumoral se encuentra en aproximadamente 2 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 3 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 4 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 5 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 6 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 7 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 8 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 9 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 10 mm^3. En algunas modalidades, los fragmentos tumorales son de 1-4 mm x 1-4 mm x 1-4 mm. En algunas modalidades, los fragmentos tumorales son de 1 mm x 1 mm x 1 mm. En algunas modalidades, los fragmentos tumorales son de 2 mm x 2 mm x 2 mm. En algunas modalidades, los fragmentos tumorales son de 3 mm x 3 mm x 3 mm. En algunas modalidades, los fragmentos tumorales son de 4 mm x 4 mm x 4 mm.

En algunas modalidades, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejido hemorrágico, necrótico y/o graso en cada pieza. En algunas modalidades, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejido hemorrágico en cada pieza. En

algunas modalidades, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejido necrótico en cada pieza. En algunas modalidades, los tumores se fragmentan para minimizar la cantidad de tejido graso en cada pieza. En determinadas modalidades, la etapa de fragmentación del tumor es un método *in vitro* o *ex vivo.*

En algunas modalidades, la fragmentación del tumor se realiza para mantener la estructura interna del tumor. En algunas modalidades, la fragmentación del tumor se realiza sin realizar un movimiento de sierra con un bisturí. En algunas modalidades, los TIL se obtienen a partir de digestiones del tumor. En algunas modalidades, se generaron digestiones tumorales mediante la incubación en medio enzimático, por ejemplo, pero que no se limita a RPMI 1640, GlutaMAX 2 mM, gentamicina 10 mg/mL, DNasa 30 U/mL y colagenasa 1,0 mg/mL, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Después de colocar el tumor en medio enzimático, el tumor puede disociarse mecánicamente por aproximadamente 1 minuto. A continuación, la solución puede incubarse durante 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 % y después puede disociarse mecánicamente nuevamente durante aproximadamente 1 minuto. Después que se incuban de nuevo por 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 %, el tumor puede disociarse mecánicamente una tercera vez por aproximadamente 1 minuto. En algunas modalidades, después de la tercera disociación mecánica si grandes piezas de tejido estaban presentes, 1 o 2 disociaciones mecánicas adicionales se aplicaron a la muestra, con o sin 30 minutos adicionales de incubación a 37 °C en 5 % de CO_2. En algunas modalidades, al final de la incubación final si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, puede realizarse una separación por gradiente de densidad mediante el uso de Ficoll para eliminar estas células.

En algunas modalidades, la suspensión celular antes de la etapa de la primera expansión con sensibilización se denomina "población de células primarias" o población de células "recién obtenida" o "recién aislada".

En algunas modalidades, las células pueden congelarse, opcionalmente, después del aislamiento de la muestra (por ejemplo, después de obtener la muestra del tumor y/o después de obtener la suspensión celular de la muestra del tumor) y almacenarse congeladas antes de entrar en la expansión descrita en la Etapa B, que se describe con más detalle más abajo, así como se ejemplifica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

1. TIL Derivados de Biopsia Pequeña/Con Aguja Gruesa

En algunas modalidades, los TIL se obtienen inicialmente de una muestra de tumor del paciente ("TIL primarios") que se obtiene mediante una biopsia con aguja gruesa o un procedimiento similar y después se expanden a una población más grande para su manipulación adicional como se describe en la presente descripción, opcionalmente, crioconservados y, opcionalmente, evaluados por fenotipo y parámetros metabólicos.

En algunas modalidades, puede obtenerse una muestra de tumor del paciente mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, generalmente a través de una biopsia pequeña, biopsia con aguja gruesa, biopsia con aguja u otros medios para obtener una muestra que contiene una mezcla de células del tumor y TIL. En general, la muestra tumoral puede ser de cualquier tumor sólido, que incluye tumores primarios, tumores invasores o tumores metastásicos. La muestra tumoral también puede ser un tumor líquido, tal como un tumor que se obtiene de una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, la muestra puede ser de múltiples biopsias o muestras de tumores pequeños. En algunas modalidades, la muestra puede comprender múltiples muestras del tumor de un solo tumor del mismo paciente. En algunas modalidades, la muestra puede comprender múltiples muestras del tumor de uno, dos, tres o cuatro tumores del mismo paciente. En algunas modalidades, la muestra puede comprender múltiples muestras del tumor de múltiples tumores del mismo paciente. El tumor sólido puede ser de cualquier tipo de cáncer, que incluye, pero no se limita a, mama, páncreas, próstata, colorrectal, pulmón, cerebro, riñón, estómago y piel (que incluye, entre otros, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y melanoma). En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello (que incluye, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario, sarcoma, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En algunas modalidades, se obtienen TIL útiles a partir de tumores de melanoma malignos, ya que se ha informado que estos tienen niveles particularmente altos de TIL.

En general, la suspensión de células que se obtiene del núcleo o fragmento del tumor se denomina "población de células primarias" o población de células "recién obtenida" o "recién aislada". En determinadas modalidades, la población celular de TIL recién obtenida se expone a un medio de cultivo celular que comprende células presentadoras de antígeno, IL-2 y OKT-3.

En algunas modalidades, si el tumor es metastásico y la lesión primaria se ha tratado/eliminado eficazmente en el pasado, puede ser necesaria la eliminación de una de las lesiones metastásicas. En algunas modalidades, el enfoque menos invasivo es eliminar una lesión cutánea o un ganglio linfático en el cuello o en el área axilar cuando esté disponible. En algunas modalidades, se elimina una lesión cutánea o se extrae una pequeña biopsia de esta. En algunas modalidades, se extrae un ganglio linfático o una pequeña biopsia de este. En algunas modalidades, puede emplearse una lesión metastásica pulmonar o hepática, o un ganglio linfático intraabdominal o torácico o una biopsia pequeña de este.

En algunas modalidades, el tumor es un melanoma. En algunas modalidades, la biopsia pequeña de un melanoma comprende un lunar o una parte de este.

En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia en sacabocados. En algunas modalidades, la biopsia en sacabocados se obtiene con una hoja circular presionada en la piel. En algunas modalidades, la biopsia en sacabocados se obtiene con una hoja circular presionada en la piel, alrededor de un lunar sospechoso. En algunas modalidades, la biopsia en sacabocados se obtiene presionando una hoja circular en la piel y se extrae una pieza redonda de piel. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia en sacabocados y se extrae la porción redonda del tumor.

En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por escisión. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por escisión y se extrae todo el lunar o el crecimiento. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por escisión y se elimina todo el lunar o el crecimiento junto con un pequeño borde de piel de apariencia normal.

En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por incisión. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por incisión y solo se toma la parte más irregular de un lunar o crecimiento. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por incisión y la biopsia por incisión se usa cuando no pueden completarse otras técnicas, tal como si un lunar sospechoso es muy grande.

En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia de pulmón. En algunas modalidades, la biopsia pequeña se obtiene mediante broncoscopía. Generalmente, en la broncoscopía, el paciente se pone bajo anestesia y una pequeña herramienta pasa por la nariz o la boca, baja por la garganta y llega a los conductos bronquiales, donde

se usan pequeñas herramientas para extraer algo de tejido. En algunas modalidades, donde no puede alcanzarse el tumor o el crecimiento mediante broncoscopía, puede emplearse una biopsia con aguja transtorácica. Generalmente, para una biopsia con aguja transtorácica, el paciente también está bajo anestesia y se inserta una aguja a través de la piel directamente en el punto sospechoso para extraer una pequeña muestra de tejido. En algunas modalidades, una biopsia con aguja transtorácica puede requerir radiología intervencionista (por ejemplo, el uso de rayos X o tomografía computarizada para guiar la aguja). En algunas modalidades, la biopsia pequeña se obtiene mediante biopsia con aguja. En algunas modalidades, la biopsia pequeña se obtiene mediante ultrasonido endoscópico (por ejemplo, se coloca un endoscopio con una luz y se coloca a través de la boca hasta el esófago). En algunas modalidades, la biopsia pequeña se obtiene quirúrgicamente.

En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia de cabeza y cuello. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por incisión. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por incisión, en donde se corta una pequeña pieza de tejido de un área de aspecto anormal. En algunas modalidades, si se accede fácilmente a la región anormal, la muestra puede tomarse sin hospitalización. En algunas modalidades, si el tumor está más profundo dentro de la boca o la garganta, puede ser necesario realizar la biopsia en un quirófano, con anestesia general. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por escisión. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia por escisión, en donde se extrae toda el área. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una aspiración con aguja fina (FNA). En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una aspiración con aguja fina (FNA), en donde se usa una aguja muy fina unida a una jeringa para extraer (aspirar) células de un tumor o bulto. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia en sacabocados. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia en sacabocados, en donde se usan pinzas para sacabocados para extraer una pieza del área sospechosa.

En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una biopsia cervical. En algunas modalidades, la biopsia pequeña se obtiene mediante colposcopia. Generalmente, los métodos de colposcopia emplean el uso de un instrumento de aumento iluminado unido a binoculares de aumento (un colposcopio) que después se usa para hacer la biopsia de una pequeña sección de la superficie del cuello uterino. En algunas modalidades, la biopsia pequeña es una conización/biopsia de cono. En algunas modalidades, la biopsia

pequeña es una conización/biopsia de cono, en donde puede ser necesaria una cirugía ambulatoria para extirpar una pieza más grande de tejido del cuello uterino. En algunas modalidades, la biopsia de cono, además de ayudar a confirmar un diagnóstico, una biopsia de cono puede servir como un tratamiento inicial.

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

En algunas modalidades, la muestra del tumor se obtiene como un aspirado con aguja fina (FNA), una biopsia con aguja gruesa, una biopsia pequeña (que incluye, por ejemplo, una biopsia en sacabocados). En algunas modalidades, la muestra se coloca primero en un G-Rex 10. En algunas modalidades, la muestra se coloca primero en un G-Rex 10 cuando hay 1 o 2 muestras de biopsias con aguja gruesa y/o biopsia pequeña. En algunas modalidades, la muestra se coloca primero en un G-Rex 100 cuando hay 3, 4, 5, 6, 8, 9 o 10 o más muestras de biopsia con aguja gruesa y/o biopsia pequeña. En algunas modalidades, la muestra se coloca primero en un G-Rex 500 cuando hay 3, 4, 5, 6, 8, 9 o 10 o más muestras de biopsia con aguja gruesa y/o biopsia pequeña.

La FNA puede obtenerse de un tumor seleccionado del grupo que consiste en pulmón, melanoma, cabeza y cuello, cuello uterino, ovárico, pancreático, glioblastoma, colorrectal y sarcoma. En algunas modalidades, la FNA se obtiene de un tumor de pulmón, tal como un tumor de pulmón de un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En algunos casos, el paciente con NSCLC se ha sometido previamente a un tratamiento quirúrgico.

Los TIL descritos en la presente descripción pueden obtenerse a partir de una muestra de FNA. En algunos casos, la muestra de FNA se obtiene o se aísla del paciente

mediante el uso de una aguja de calibre fino que va desde una aguja de calibre 18 a una aguja de calibre 25. La aguja de calibre fino puede ser de calibre 18, calibre 19, calibre 20, calibre 21, calibre 22, calibre 23, calibre 24 o calibre 25. En algunas modalidades, la muestra FNA del paciente puede contener al menos 400 000 TIL, por ejemplo, 400 000 TIL, 450 000 TIL, 500 000 TIL, 550 000 TIL, 600 000 TIL, 650 000 TIL, 700 000 TIL, 750 000 TIL, 800 000 TIL, 850 000 TIL, 900 000 TIL, 950 000 TIL o más.

En algunos casos, los TIL descritos en la presente descripción se obtienen de una muestra de biopsia con aguja gruesa. En algunos casos, la muestra de biopsia con aguja gruesa se obtiene o se aísla del paciente mediante el uso de una aguja quirúrgica o médica que va desde una aguja de calibre 11 a una aguja de calibre 16. La aguja puede ser de calibre 11, calibre 12, calibre 13, calibre 14, calibre 15 o calibre 16. En algunas modalidades, la muestra de biopsia con aguja gruesa del paciente puede contener al menos 400 000 TIL, por ejemplo, 400 000 TIL, 450 000 TIL, 500 000 TIL, 550 000 TIL, 600 000 TIL, 650 000 TIL, 700 000 TIL, 750 000 TIL, 800 000 TIL, 850 000 TIL, 900 000 TIL, 950 000 TIL o más.

En general, la suspensión celular que se cosecha se denomina "población de células primarias" o población de células "recién cosechada".

En algunas modalidades, los TIL no se obtienen a partir de digestiones del tumor. En algunas modalidades, los núcleos de los tumores sólidos no están fragmentados.

En algunas modalidades, los TIL se obtienen a partir de digestiones del tumor. En algunas modalidades, los digeridos tumorales se generaron mediante incubación en medio enzimático, por ejemplo, pero no limitado a RPMI 1640, GlutaMAX 2 mM, gentamicina 10 mg/ml, ADNasa 30 U/ml y colagenasa 1,0 mg/ml, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Después de colocar el tumor en medio enzimático, el tumor puede disociarse mecánicamente por aproximadamente 1 minuto. A continuación, la solución puede incubarse durante 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 % y después puede disociarse mecánicamente nuevamente durante aproximadamente 1 minuto. Después que se incuban de nuevo por 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 %, el tumor puede disociarse mecánicamente una tercera vez por aproximadamente 1 minuto. En algunas modalidades, después de la tercera disociación mecánica si grandes piezas de tejido estaban presentes, 1 o 2 disociaciones mecánicas adicionales se aplicaron a la muestra, con o sin 30 minutos adicionales de incubación a 37 °C en 5 % de CO_2. En algunas modalidades, al final de la incubación final si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, puede

realizarse una separación por gradiente de densidad mediante el uso de Ficoll para eliminar estas células.

2. Métodos de Expansión de Linfocitos de Sangre Periférica (PBL) a partir de Sangre Periférica

Método 1 de PBL. En una modalidad de la invención, los PBL se expanden mediante el uso de los procesos descritos en la presente descripción. En una modalidad de la invención, el método comprende obtener una muestra de PBMC a partir de sangre completa. En una modalidad, el método comprende enriquecer las células T mediante el aislamiento de las células T puras a partir de las PBMC mediante el uso de la selección negativa de una fracción que no es CD19+. En una modalidad, el método comprende enriquecer las células T mediante el aislamiento de las células T puras a partir de PBMC mediante el uso de selección negativa basada en perlas magnéticas de una fracción que no es CD19+.

En una modalidad de la invención, el Método 1 de PBL se realiza como sigue: El día 0, se descongela una muestra de PBMC crioconservada y se cuentan las PBMC. Las células T se aíslan mediante el uso de un kit de aislamiento que abarca todas las células T humanas y columnas LS (Miltenyi Biotec).

Método 2 de PBL. En una modalidad de la invención, los PBL se expanden mediante el uso del Método 2 de PBL, que comprende obtener una muestra de PBMC a partir de sangre completa. Las células T de las PBMC se enriquecen mediante la incubación de las PBMC durante al menos tres horas a 37 ^{o}C y después aislando las células no adherentes.

En una modalidad de la invención, el Método 2 de PBL se realiza de la siguiente manera: El día 0, la muestra de PMBC crioconservada se descongela y las células de PBMC se siembran a razón de 6 millones de células por pocillo en una placa de 6 pocillos en medio CM-2 y se incuban durante 3 horas a 37 grados centígrados. Después de 3 horas, las células no adherentes, que son los PBL, se retiran y se cuentan.

Método 3 de PBL. En una modalidad de la invención, los PBL se expanden mediante el uso del Método 3 de PBL, que comprende obtener una muestra de PBMC a partir de sangre periférica. Las células B se aíslan mediante el uso de una selección de CD19+ y las células T se seleccionan mediante el uso de una selección negativa de la fracción que no es CD19+ de la muestra de PBMC.

En una modalidad de la invención, el Método 3 de PBL se realiza como sigue: El día 0, las PBMC crioconservadas derivadas de sangre periférica se descongelan y se cuentan. Las células B CD19+ se clasifican mediante el uso de un kit CD19 Multisort, Human (Miltenyi Biotec). De la fracción de células que no son CD19+, las células T se purifican mediante el uso del kit de aislamiento que abarca todas las células T humanas y columnas LS (Miltenyi Biotec).

En una modalidad, las PBMC se aíslan de una muestra de sangre completa. En una modalidad, la muestra de PBMC se usa como material de partida para expandir los PBL. En una modalidad, la muestra se crioconserva antes del proceso de expansión. En otra modalidad, se usa una muestra nueva como material de partida para expandir los PBL. En una modalidad de la invención, las células T se aíslan de las PBMC mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. En una modalidad, las células T se aíslan mediante el uso de un kit de aislamiento que abarca todas las células T humanas y columnas LS. En una modalidad de la invención, las células T se aíslan de las PBMC mediante el uso de métodos de selección de anticuerpos conocidos en la técnica, por ejemplo, selección negativa de CD19.

En una modalidad de la invención, la muestra de PBMC se incuba durante un período de tiempo a una temperatura conveniente eficaz para identificar las células no adherentes. En una modalidad de la invención, el tiempo de incubación es de aproximadamente 3 horas. En una modalidad de la invención, la temperatura es de aproximadamente 37 ^{o}Celsius. A continuación, las células no adherentes se expanden mediante el uso del proceso descrito anteriormente.

En algunas modalidades, la muestra de PBMC es de un sujeto o paciente que se ha tratado previamente, opcionalmente, con un régimen que comprende un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK. En algunas modalidades, la muestra de tumor es de un sujeto o paciente que se ha tratado previamente con un régimen que comprende un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK. En algunas modalidades, la muestra de PBMC es de un sujeto o paciente que se ha tratado previamente con un régimen que comprende un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK, ha recibido tratamiento durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o 1 año o más. En otra modalidad, las PBMC se derivan de un paciente que se encuentra actualmente en un régimen con el inhibidor de ITK, tal como ibrutinib.

En algunas modalidades, la muestra de PBMC es de un sujeto o paciente que se ha tratado previamente con un régimen que comprende un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK y es refractario al tratamiento con un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK, tal como ibrutinib.

En algunas modalidades, la muestra de PBMC es de un sujeto o paciente que se ha tratado previamente con un régimen que comprende un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK pero que ya no está en tratamiento con un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK. En algunas modalidades, la muestra de PBMC es de un sujeto o paciente que se ha tratado previamente con un régimen que comprende un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK pero que ya no está en tratamiento con un inhibidor de quinasa o un inhibidor de ITK y no ha recibido tratamiento durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, o al menos 1 año o más. En otra modalidad, las PBMC se derivan de un paciente que ha tenido una exposición previa a un inhibidor de ITK, pero que no se ha tratado en al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 9 meses o al menos 1 año.

En una modalidad de la invención, en el día 0, las células se seleccionan como CD19+ y se clasifican en consecuencia. En una modalidad de la invención, la selección se realiza mediante el uso perlas de unión a anticuerpos. En una modalidad de la invención, las células T puras se aíslan el día 0 a partir de las PBMC.

En una modalidad de la invención, para los pacientes que no se han tratados previamente con ibrutinib u otro inhibidor de ITK, 10-15 ml de la capa leucocitaria producirán aproximadamente $5x10^9$ PBMC, que, a su vez, producirán aproximadamente $5,5x10^7$ PBL.

En una modalidad de la invención, para los pacientes que se trataron previamente con ibrutinib u otro inhibidor de ITK, el proceso de expansión producirá aproximadamente 20×10^9 PBL. En una modalidad de la invención, $40,3 \times 10^6$ PBMC producirán aproximadamente $4,7 \times 10^5$ PBL.

En cualquiera de las modalidades anteriores, las PBMC pueden derivarse de una muestra de sangre completa, por aféresis, de la capa leucocitaria o de cualquier otro método conocido en la técnica para obtener PBMC.

3. Métodos de Expansión de Linfocitos Infiltrantes de Médula (MIL) a partir de PBMC derivados de la médula ósea

Método 3 de MIL. En una modalidad de la invención, el método comprende obtener PBMC de la médula ósea. El día 0, las PBMC se seleccionan por ser CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ y se clasifican, y la fracción de células que no son CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ se somete a ultrasonido y una parte de la fracción de células sometidas a ultrasonido se vuelve a añadir a la fracción de células seleccionada.

En una modalidad de la invención, el Método 3 de MIL se realiza como sigue: El día 0, se descongela una muestra crioconservada de PBMC y se cuentan las PBMC. Las células se tiñen con anticuerpos CD3, CD33, CD20 y CD14 y se clasifican mediante el uso de una célula S3e clasificada (Bio-Rad). Las células se clasifican en dos fracciones: una fracción de células inmunitarias (o la fracción MIL) (CD3+CD33+CD20+CD14+) y una fracción de células blásticas de AML (que no son CD3+CD33+CD20+CD14+).

En una modalidad de la invención, las PBMC se obtienen a partir de la médula ósea. En una modalidad, las PBMC se obtienen de la médula ósea mediante aféresis, aspiración, biopsia con aguja u otros medios similares conocidos en la técnica. En una modalidad, las PBMC son recién obtenidas. En otra modalidad, las PBMC son crioconservadas.

En una modalidad de la invención, los MIL se expanden a partir de 10-50 ml de aspirado de médula ósea. En una modalidad de la invención, se obtienen del paciente 10 ml de aspirado de médula ósea. En otra modalidad, se obtienen 20 ml de aspirado de médula ósea del paciente. En otra modalidad, se obtienen 30 ml de aspirado de médula ósea del paciente. En otra modalidad, se obtienen 40 ml de aspirado de médula ósea del paciente. En otra modalidad, se obtienen 50 ml de aspirado de médula ósea del paciente.

En una modalidad de la invención, el número de PBMC producidas desde aproximadamente 10-50 ml de aspirado de médula ósea es de aproximadamente 5 x 10^7 a aproximadamente 10 x 10^7 PBMC. En otra modalidad, el número de PMBC producidas es de aproximadamente 7 x 10^7 PBMC.

En una modalidad de la invención, aproximadamente 5 x 10^7 a aproximadamente 10 x 10^7 PBMC, producen de aproximadamente 0,5 x 10^6 a aproximadamente 1,5 x 10^6 MIL. En una modalidad de la invención, se obtienen aproximadamente 1 x 10^6 MIL.

En una modalidad de la invención, 12 x 10^6 PBMC derivadas de aspirado de médula ósea producen aproximadamente 1,4 x 10^5 MIL.

En cualquiera de las modalidades anteriores, las PBMC pueden derivarse de una muestra de sangre completa, de la médula ósea, por aféresis, de la capa leucocitaria o de cualquier otro método conocido en la técnica para obtener PBMC.

B. ETAPA B: Primera Expansión con Sensibilización

En algunas modalidades, los presentes métodos proporcionan TIL más jóvenes, que pueden proporcionar beneficios terapéuticos adicionales sobre los TIL más antiguos (es decir, los TIL que se han sometido a más rondas de replicación adicionales antes de la administración a un sujeto/paciente). Las características de los TIL jóvenes se han descrito en la literatura, por ejemplo Donia, y otros, *Scandinavian Journal of Immunology,* 75:157-167 (2012); Dudley y otros, *Clin Cancer Res,* 16:6122-6131 (2010); Huang y otros, *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005); Besser y otros, *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser y otros, *J Immunother* 32:415–423 (2009); Robbins y otros, *J Immunol* 2004; 173:7125-7130; Shen y otros, J Immunother, 30:123-129 (2007); Zhou y otros, *J Immunother*, 28:53-62 (2005); y Tran y otros, J Immunother, 31:742-751 (2008), todos los cuales se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Después de la disección o digestión de fragmentos tumorales y/o fragmentos tumorales, por ejemplo, tal como se describe en la Etapa A de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, Figura 1B y/o Figura 1C), las células resultantes se cultivan en suero que contiene IL-2, OKT-3 y células alimentadoras (por ejemplo, células presentadoras de antígeno alimentadoras), en condiciones que favorecen el crecimiento de los TIL sobre células tumorales y otras. En algunas modalidades, la IL-2, OKT-3 y las células alimentadoras se añaden al inicio del cultivo junto con la digestión del tumor y/o los fragmentos del tumor (por ejemplo, el día 0). En algunas modalidades, los digeridos tumorales y/o los fragmentos tumorales se incuban en un recipiente con hasta 60 fragmentos por recipiente y con 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, esta población de células primarias se cultiva durante un período de días, generalmente de 1 a 8 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta población de células primarias se cultiva durante un período de días, generalmente de 1 a 7 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización se produce durante un período de 1 a 8 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En

algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización se produce durante un período de 1 a 7 días, lo que resulta en una población TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta primera expansión con sensibilización se produce durante un período de 5 a 8 días, lo que resulta en una población TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta primera expansión con sensibilización se produce durante un período de 5 a 7 días, lo que resulta en una población TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta primera expansión con sensibilización se produce durante un período de aproximadamente de 6 a 8 días, lo que resulta en una población TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta primera expansión con sensibilización se produce durante un período de aproximadamente de 6 a 7 días, lo que resulta en una población TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta primera expansión con sensibilización se produce durante un período de aproximadamente de 7 a 8 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta primera expansión con sensibilización se produce durante un período de aproximadamente 7 días, lo que resulta en una población TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta primera expansión con sensibilización se produce durante un período de aproximadamente de 8 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias.

En una modalidad preferida, la expansión de TIL puede realizarse mediante el uso de una etapa de primera expansión con sensibilización (por ejemplo, como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o Figura 1C), que puede incluir procesos referidos como pre-REP o REP con sensibilización y que contiene células alimentadoras desde el Día 0 y/o desde el inicio del cultivo) como se describe más abajo y en la presente descripción, seguido de una segunda expansión rápida (Etapa D, que incluye los procesos denominados etapas del protocolo de expansión rápida (REP)) como se describe más abajo en la Etapa D y en la presente descripción, seguido de la crioconservación opcional, y seguido de una segunda Etapa D (que incluye los procesos denominados como etapas de nueva estimulación del REP) como se describe más abajo y en la presente descripción. Los TIL que se obtienen de este proceso pueden caracterizarse opcionalmente en base a características fenotípicas

y parámetros metabólicos como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el fragmento de tumor está entre aproximadamente 1 mm^3 y 10 mm^3.

En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión se denomina como "CM", una abreviatura para medios de cultivo. En algunas modalidades, el CM para la Etapa B consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, que se complementa con suero AB humano al 10 %, Hepes 25 mM, y gentamicina 10 mg/mL.

En algunas modalidades, hay menos de o igual a 240 fragmentos tumorales. En algunas modalidades, hay menos de o igual a 240 fragmentos tumorales dispuestos en menos de o igual a 4 recipientes. En algunas modalidades, los recipientes son frascos GREX100 MCS. En algunas modalidades, se disponen menos de o igual a 60 fragmentos tumorales en 1 recipiente. En algunas modalidades, cada recipiente comprende menos de o igual a 500 ml de medio por recipiente. En algunas modalidades, el medio comprende IL-2. En algunas modalidades, el medio comprende 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio comprende células presentadoras de antígeno alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno"). En algunas modalidades, el medio comprende $2,5 \times 10^8$ células presentadoras de antígeno alimentadoras por recipiente. En algunas modalidades, el medio comprende OKT-3. En algunas modalidades, el medio comprende 30 ng/ml de OKT-3 por recipiente. En algunas modalidades, el recipiente es un frasco GREX100 MCS. En algunas modalidades, el medio comprende IL-2 6000 UI/ml, OKT-3 30 ng, y células presentadoras de antígeno alimentadoras $2,5 \times 10^8$. En algunas modalidades, el medio comprende IL-2 6000 UI/ml, OKT-3 30 ng/ml, y células presentadoras de antígeno alimentadoras $2,5 \times 10^8$ por recipiente.

Después de la preparación de los fragmentos tumorales, las células resultantes (es decir, los fragmentos que son una población celular primaria) se cultivan en medio que contiene IL-2, células presentadoras de antígeno alimentadoras y OKT-3 en condiciones que favorecen el crecimiento de los TIL sobre el tumor y otras células y que permiten la sensibilización de los TIL y el crecimiento acelerado desde el inicio del cultivo en el día 0. En algunas modalidades, los digeridos tumorales y/o los fragmentos tumorales se incuban con IL-2 6000 UI/ml, así como también células presentadoras de antígeno alimentadoras y OKT-3. Esta población de células primarias se cultiva durante un período de días, generalmente de 1 a 8 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, el medio de crecimiento durante la primera expansión con

sensibilización comprende IL-2 o una variante de esta, así como también células presentadoras de antígeno alimentadoras y OKT-3. En algunas modalidades, esta población de células primarias se cultiva durante un período de días, generalmente de 1 a 7 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, el medio de crecimiento durante la primera expansión con sensibilización comprende IL-2 o una variante de esta, así como también células presentadoras de antígeno alimentadoras y OKT-3. En algunas modalidades, la IL-2 es IL-2 humana recombinante (rhIL-2). En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de $20\text{-}30\text{x}10^6$ UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de $20\text{x}10^6$ UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de $25\text{x}10^6$ UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de $30\text{x}10^6$ UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una concentración final de $4\text{-}8\text{x}10^6$ UI/mg de IL-2. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una concentración final de $5\text{-}7\text{x}10^6$ UI/mg de IL-2. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una concentración final de $6\text{x}10^6$ UI/mg de IL-2. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 se prepara como se describe en el Ejemplo C. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 9 000 UI/ml de IL-2, aproximadamente 8 000 UI/ml de IL-2, aproximadamente 7 000 UI/ml de IL-2, aproximadamente 6000 UI/ml de IL-2 o aproximadamente 5000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 9 000 UI/ml de IL-2 a aproximadamente 5000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 8 000 UI/ml de IL-2 a aproximadamente 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 7 000 UI/ml de IL-2 a aproximadamente 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 6000 UI/ml de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 3000 UI/ml de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende, además, IL-2. En una modalidad preferida, el medio de cultivo de la primera

expansión con sensibilización comprende aproximadamente 3000 UI/ml de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 1000 UI/ml, aproximadamente 1500 UI/ml, aproximadamente 2000 UI/ml, aproximadamente 2500 UI/ml, aproximadamente 3000 UI/ml, aproximadamente 3500 UI/ml, aproximadamente 4000 UI/mL, aproximadamente 4500 UI/mL, aproximadamente 5000 UI/mL, aproximadamente 5500 UI/mL, aproximadamente 6000 UI/mL, aproximadamente 6500 UI/mL, aproximadamente 7000 UI/mL, aproximadamente 7500 UI/mL o aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende entre 1000 y 2000 UI/mL, entre 2000 y 3000 UI/mL, entre 3000 y 4000 UI/mL, entre 4000 y 5000 UI/mL, entre 5000 y 6000 UI/mL, entre 6000 y 7000 UI/mL, entre 7000 y 8000 UI/mL, o aproximadamente de 8000 UI/mL, de IL-2.

En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15, aproximadamente 400 UI/mL de IL-15, aproximadamente 300 UI/mL de IL-15, aproximadamente 200 UI/mL de IL-15, aproximadamente 180 UI/mL de IL-15, aproximadamente 160 UI/mL de IL-15, aproximadamente 140 UI/mL de IL-15, aproximadamente 120 UI/mL de IL-15 o aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende de aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende de aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. En una modalidad, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende además IL-15. En una modalidad preferida, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15.

En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 20 UI/ml de IL-21, aproximadamente 15 UI/ml de IL-21, aproximadamente 12 UI/ml de IL-21, aproximadamente 10 UI/ml de IL-21,

aproximadamente 5 UI/ml de IL-21, aproximadamente 4 UI/ml de IL-21, aproximadamente 3 UI/ml de IL-21, aproximadamente 2 UI/ml de IL-21, aproximadamente 1 UI/ml de IL-21, o aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 20 UI/ml de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 15 UI/ml de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 12 UI/ml de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 10 UI/ml de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 5 UI/ml de IL-21 a aproximadamente 1 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 2 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 1 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende adicionalmente IL-21. En una modalidad preferida, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 1 UI/ml de IL-21.

En una modalidad, el primer medio de cultivo celular de la primera expansión con sensibilización comprende el anticuerpo OKT-3. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 30 ng/ml del anticuerpo OKT-3. En una modalidad, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende aproximadamente 0,1 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 2,5 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 7,5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 15 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 35 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml y aproximadamente 1 µg/mL del anticuerpo OKT-3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende entre 0,1 ng/ml y 1 ng/ml, entre 1 ng/ml y 5 ng/ml, entre 5 ng/ml y 10 ng/ml, entre 10 ng/ml y

20 ng/ml, entre 20 ng/ml y 30 ng/ml, entre 30 ng/ml y 40 ng/ml, entre 40 ng/ml y 50 ng/ml, y entre 50 ng/ml y 100 ng/ml del anticuerpo OKT-3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende entre 15 ng/ml y 30 ng/ml del anticuerpo OKT-3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende 30 ng/ml del anticuerpo OKT-3. En algunas modalidades, el anticuerpo OKT-3 es muromonab.

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:1 Cadena pesada de muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Cadena ligera de muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende uno o más agonistas de TNFRSF en un medio de cultivo celular. En algunas modalidades, el agonista de TNFRSF comprende un agonista de 4-1BB. En algunas modalidades, el agonista de TNFRSF es un agonista de 4-1BB y el agonista de 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en urelumab, utomilumab, EU-101, una proteína de fusión y fragmentos, derivados, variantes, biosimilares y las combinaciones de estos. En algunas modalidades, el agonista de TNFRSF se añade a una concentración suficiente para lograr una concentración en el medio de cultivo celular entre 0,1 µg/ml y 100 µg/ml. En algunas modalidades, el agonista de TNFRSF se añade a una

concentración suficiente para lograr una concentración en el medio de cultivo celular entre 20 µg/ml y 40 µg/ml.

En algunas modalidades, además de uno o más agonistas de TNFRSF, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende, además, IL-2 a una concentración inicial de aproximadamente 3000 UI/ml y anticuerpo OKT-3 a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/ml, y en donde uno o más agonistas de TNFRSF comprenden un agonista de 4-1BB. En algunas modalidades, además de uno o más agonistas de TNFRSF, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización comprende, además, IL-2 a una concentración inicial de aproximadamente 6000 UI/ml y anticuerpo OKT-3 a una concentración inicial de aproximadamente 30 ng/ml, y en donde uno o más agonistas de TNFRSF comprenden un agonista de 4-1BB.

En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización se denomina "CM", una abreviatura de medio de cultivo. En algunas modalidades, se denomina CM1 (medio de cultivo 1). En algunas modalidades, el CM consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con suero AB humano al 10 %, Hepes 25 mM y gentamicina 10 mg/ml. En algunas modalidades, el CM es el CM1 descrito en los Ejemplos, ver Ejemplo A. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización ocurre en un medio de cultivo celular inicial o en un primer medio de cultivo celular. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la primera expansión con sensibilización o el medio de cultivo celular inicial o el primer medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno alimentadoras (también denominadas en la presente descripción como células alimentadoras).

En algunas modalidades, el medio de cultivo que se usa en los procesos de expansión que se describen en la presente descripción es un medio libre de suero o un medio definido. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o un sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido se usa para prevenir y/o disminuir la variación experimental debido en parte a la variación de lote a lote de los medios que contienen suero.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio de células basales incluye, pero no se limita al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™

OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, el suplemento de suero o sustituto del suero incluye, pero no se limita a uno o más del Suplemento de Suero de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™, una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos, y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o 2-mercaptoetanol.

En algunas modalidades, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias de Células T CTS™ OpTmizer™ se usa con medios de crecimiento convencionales, que incluyen pero no se limitan al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración total de sustituto de suero (% en volumen) en el medio libre de suero o definido es de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % en volumen del medio total libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 3 % del volumen total

del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 5 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 10 % del volumen total del medio libre de suero o definido.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente un 3 % del Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific). En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM. En algunas modalidades, el SFM para expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente un 3 % de sustituto de suero para células inmunitarias CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) y la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es 55 µM.

En algunas modalidades, el medio definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina. En algunas modalidades, el SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente el 3 % del sustituto de suero de células inmunitarias (SR) CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina, y comprende además de

aproximadamente 1000 UI/ml a aproximadamente 8000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM para expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente un 3 % de sustituto de suero

para células inmunitarias CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) y la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es 55 µM.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, de 0,5 mM a aproximadamente 9 mM, de 1 mM a aproximadamente 8 mM, de 2 mM a aproximadamente 7 mM, de 3 mM a aproximadamente 6 mM, o de 4 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de 10 mM a aproximadamente 140 mM, de 15 mM a aproximadamente 130 mM, de 20 mM a aproximadamente 120 mM, de 25 mM a aproximadamente 110 mM, de 30 mM a aproximadamente 100 mM, de 35 mM a aproximadamente 95 mM, de 40 mM a aproximadamente 90 mM, de 45 mM a aproximadamente 85 mM, de 50 mM a aproximadamente 80 mM, de 55 mM a aproximadamente 75 mM, de 60 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 65 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55 mM. En algunas modalidades, la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es 55 µM.

En algunas modalidades, los medios definidos que se describen en la Publicación del PCT Internacional Número WO/1998/030679, que se incorpora en la presente descripción como referencia, son útiles en la presente invención. En esa publicación, se describen medios de cultivo de células eucariotas sin suero. El medio de cultivo para células eucariotas sin suero incluye un medio de cultivo de células basales suplementado con un suplemento sin suero capaz de apoyar el crecimiento de las células en un cultivo sin suero. El suplemento del medio de cultivo de células eucariotas libre de suero comprende o se obtiene mediante la combinación de uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más oligoelementos, y uno o más antibióticos. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o beta-mercaptoetanol. En algunas modalidades, el

medio definido comprende una albúmina o un sustituto de albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio de células basales se selecciona del grupo que consiste en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

[0002] En algunas modalidades, la concentración de glicina en el medio definido se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-histidina se encuentra de aproximadamente 5-250 mg/L, la concentración de L-isoleucina se encuentra de aproximadamente 5-300 mg/L, la concentración de L-metionina se encuentra de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-fenilalanina se encuentra de aproximadamente 5-400 mg/L, la concentración de L-prolina se encuentra de aproximadamente 1-1000 mg/L, la concentración de L-hidroxiprolina se encuentra de aproximadamente 1-45 mg/L, la concentración de L-serina se encuentra de aproximadamente 1-250 mg/L, la concentración de L-treonina se encuentra de aproximadamente 10-500 mg/L, la concentración de L-triptófano se encuentra de aproximadamente 2-110 mg/L, la concentración de L-tirosina se encuentra de aproximadamente 3-175 mg/L, la concentración de L-valina se encuentra de aproximadamente 5-500 mg/L, la concentración de tiamina se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de glutatión reducido se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de ácido L-ascórbico-2-fosfato se encuentra de aproximadamente 1-200 mg/L, la concentración de transferrina saturada de hierro se encuentra de aproximadamente 1-50 mg/L, la concentración de insulina se encuentra de aproximadamente 1-100 mg/L, la concentración de selenito de sodio se encuentra de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y la concentración de albúmina (por ejemplo, AlbuMAX®I) se encuentra de aproximadamente 5000-50 000 mg/L.

[0003] En algunas modalidades, los ingredientes sin porción de oligoelementos en el medio definido se encuentran presentes en los intervalos de concentración que se enumeran en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en el Medio 1X" en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, los ingredientes de las porciones que no son oligoelementos en el medio definido están presentes en las concentraciones finales enumeradas en la columna bajo el título “Una Modalidad Preferida del Medio 1X” en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, el medio definido es un medio de células basales que comprende un suplemento libre de suero. En algunas de estas modalidades, el suplemento libre de suero comprende ingredientes de las porciones que no son oligoelementos del tipo y en las concentraciones enumeradas en la columna bajo el título “Una modalidad preferida en el suplemento” en la Tabla A más abajo.

Tabla A: Concentraciones de Ingredientes Sin Porción de Oligoelementos

Ingrediente	Una modalidad preferida en suplemento (mg/L) (aproximadamente)	Intervalo de concentración en el medio 1X (mg/l) (aproximadamente)	Una modalidad preferida en el medio 1X (mg/L) (aproximadamente)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-Isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-Fenilalanina	1800	5-400	336
L-prolina	4000	1-1000	600
L-Hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-Treonina	2200	10-500	425
L-triptófano	440	2-110	82
L-Tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454

Tiamina	33	1-20	9
Glutatión Reducido	10	1-20	1,5
Ácido Ascórbico-2-PO_4 (mg de sal)	330	1-200	50
Transferrina (saturado de hierro)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenito de Sodio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50 000	12,500

En algunas modalidades, la osmolaridad del medio definido se encuentra entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol. En algunas modalidades, la osmolaridad se encuentra entre aproximadamente 280 y 310 mOsmol. En algunas modalidades, el medio definido se complementa con hasta aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio. El medio definido puede suplementarse además con L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM), 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

En algunas modalidades, el medio definido que se describe en Smith, y otros, “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” *Clin Transl Immunology*, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) son útiles en la presente invención. Brevemente, se usa RPMI o CTS™ OpTmizer™ como medio de células basales y se complementa ya sea con 0, 2 %, 5 %, o 10 % de Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™.

En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los

procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 1 a 8 días, como se explica en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 2 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 3 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 4 a 8 días, como se explica en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 1 a 7 días, como se explica en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 2 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 2 a 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en

particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 3 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 3 a 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 4 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 4 a 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 5 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 5 a 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 6 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 6 a 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los proporcionados en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 7 a 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con

sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los proporcionados en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización (que incluye procesos tales como, por ejemplo, los proporcionados en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que pueden incluir aquellos a los que a veces se hace referencia como pre-REP o REP con sensibilización) es un proceso de 7 días.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 1 día hasta 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 1 día hasta 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 2 días hasta 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 2 días hasta 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 3 días hasta 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 3 días hasta 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 4 días hasta 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 4 días hasta 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 5 días hasta 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 5 días hasta 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con

sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 6 días hasta 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 6 días hasta 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 7 hasta 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 8 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 7 días desde que se produce la fragmentación y/o cuando se inicia la etapa de la primera expansión con sensibilización.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 1 día hasta 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 1 día hasta 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 2 días hasta 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 2 días hasta 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 3 días hasta 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 3 días hasta 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 4 días hasta 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 4 días hasta 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 5 días hasta 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 5 días hasta 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 6 hasta 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 6 días hasta 7 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 7 hasta 8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante

8 días. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización de TIL puede continuar durante 7 días.

En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21 como una combinación durante la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21, así como también cualquier combinación de estas, pueden incluirse durante la primera expansión con sensibilización, que incluye, por ejemplo, durante los procesos de la Etapa B de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o Figura 1C), así como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-15 e IL-21 como una combinación durante la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21, así como también cualquier combinación de estas, pueden incluirse durante los procesos de la Etapa B de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) y como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización, por ejemplo, la Etapa B de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o Figura 1C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un biorreactor. En algunas modalidades, se emplea un biorreactor como recipiente. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX-10 o un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es un G-REX-10.

1. Células alimentadoras y células presentadoras de antígeno

En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como

también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante los días 4-8. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante los días 4-7. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante los días 5-8. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante los días 5-7. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante los días 6-8. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C),

así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante los días 6-7. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante el día 7 u 8. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante el día 7. En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) no requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL, sino que se añaden durante la primera expansión con sensibilización en cualquier momento durante el día 8.

En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa B de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados pre REP o REP con sensibilización) requieren células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción "células presentadoras de antígeno") al inicio de la expansión de TIL y durante la primera expansión con sensibilización. En muchas modalidades, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se obtienen de unidades de sangre completa estándar de donantes de sangre alogénicos sanos. Las PBMC se obtienen mediante el uso de métodos estándar tales como la separación por gradiente

Ficoll-Paque. En algunas modalidades, se usan 2,5 × 10^8 células alimentadoras durante la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, se usan 2,5 x 10^8 células alimentadoras por recipiente durante la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, se usan 2,5 x 10^8 células alimentadoras por GREX-10 durante la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, se usan 2,5 x 10^8 células alimentadoras por GREX-100 durante la primera expansión con sensibilización.

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

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para usar en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción si el número total de células viables el día 14 es menor que el número de células viables inicial que se puso en cultivo el día 0 de la primera expansión con sensibilización.

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para usar en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 no ha aumentado del número de células viables iniciales puesto en cultivo el día 0 de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2.

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para usar en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 no ha aumentado del número de células viables iniciales puesto en cultivo el día 0 de la primera expansión con sensibilización. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia del anticuerpo OKT3 5-60 ng/ml e IL-2 1000-6000 UI/ml. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia del anticuerpo OKT3 10-50 ng/ml e IL-2 2000-5000 UI/ml. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia del anticuerpo OKT3 20-40 ng/ml e IL-2 2000-4000 UI/ml. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia del anticuerpo OKT3 25-35 ng/ml e IL-2 2500-3500 UI/ml. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia del

anticuerpo OKT3 30 ng/ml e IL-2 6000 UI/ml. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia del anticuerpo OKT3 15 ng/ml e IL-2 3000 UI/ml. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia del anticuerpo OKT3 15 ng/ml e IL-2 6000 UI/ml.

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno alimentadoras son PBMC. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno alimentadoras son células presentadoras de antígenos alimentadoras artificiales. En una modalidad, la relación de TIL con respecto a las células presentadoras de antígenos alimentadoras en la segunda expansión es aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400 o aproximadamente 1 a 500. En una modalidad, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión se encuentra de entre 1 a 50 y 1 a 300. En una modalidad, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión se encuentra de entre 1 a 100 y 1 a 200.

En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción requieren una relación de aproximadamente 2,5 × 10^8 células alimentadoras a aproximadamente 100 × 10^6 TIL. En otra modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción requieren una relación de aproximadamente 2,5 × 10^8 células alimentadoras a aproximadamente 50 × 10^6 TIL. Aun en otra modalidad adicional, la primera expansión con sensibilización descrita en la presente descripción requiere de aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras a aproximadamente 25 x 10^6 TIL. Aun en otra modalidad, la primera expansión con sensibilización descrita en la presente descripción requiere de aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras. Aun en otra modalidad, la primera expansión con sensibilización requiere un cuarto, un tercio, cinco doceavos o la mitad del número de células de alimentación usadas en la segunda expansión rápida.

En algunas modalidades, el medio en la primera expansión con sensibilización comprende IL-2. En algunas modalidades, el medio en la primera expansión con sensibilización comprende 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio en la primera expansión con sensibilización comprende células presentadoras de antígeno

alimentadoras. En algunas modalidades, el medio en la primera expansión con sensibilización comprende 2,5 × 10^8 células presentadoras de antígeno alimentadoras por recipiente. En algunas modalidades, el medio en la primera expansión con sensibilización comprende OKT-3. En algunas modalidades, el medio comprende OKT-3 30 ng por recipiente. En algunas modalidades, el recipiente es un frasco GREX100 MCS. En algunas modalidades, el medio comprende IL-2 6000 UI/ml, OKT-3 30 ng/ml, y células presentadoras de antígeno alimentadoras 2,5 × 10^8. En algunas modalidades, el medio comprende IL-2 6000 UI/ml, OKT-3 30 ng/ml, y células presentadoras de antígeno alimentadoras 2,5 × 10^8 por recipiente. En algunas modalidades, el medio comprende 500 ml de medio de cultivo y OKT-3 15 µg, por 2,5 × 10^8 células presentadoras de antígeno alimentadoras. En algunas modalidades, el medio comprende 500 ml de medio de cultivo y OKT-3 15 µg por recipiente. En algunas modalidades, el recipiente es un frasco GREX100 MCS. En algunas modalidades, el medio comprende 500 ml de medio de cultivo e IL-2 6000 UI/ml, OKT-3 30 ng/mL, y 2,5 × 10^8 células presentadoras de antígeno alimentadoras. En algunas modalidades, el medio comprende 500 ml de medio de cultivo e IL-2 6000 UI/ml, OKT-3 15 µg, y 2,5 × 10^8 células presentadoras de antígeno alimentadoras por recipiente. En algunas modalidades, el medio comprende 500 ml de medio de cultivo y OKT-3 15 µg, por 2,5 × 10^8 células presentadoras de antígeno alimentadoras.

En una modalidad, los procedimientos de la primera expansión con sensibilización descritos en la presente descripción requieren un exceso de células alimentadoras sobre TIL durante la segunda expansión. En muchas modalidades, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se obtienen de unidades de sangre completa estándar de donantes de sangre alogénicos sanos. Las PBMC se obtienen mediante el uso de métodos estándar tales como la separación por gradiente Ficoll-Paque. En una modalidad, se usan células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) en lugar de PBMC.

En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se usan en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción, que incluyen los procedimientos ilustrativos descritos en las figuras y los ejemplos.

En una modalidad, las células presentadoras de antígenos artificiales se usan en la primera expansión con sensibilización como un sustituto de, o en combinación con, las PBMC.

2. Citocinas

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

Alternativamente, el uso de combinaciones de citocinas para la primera expansión con sensibilización de los TIL es adicionalmente posible, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe generalmente en las Publicaciones Internacionales Núms. WO 2015/189356 y WO 2015/189357, incorporados expresamente en la presente como referencia en su totalidad. Por lo tanto, las posibles combinaciones incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21, e IL-2, IL-15 e IL-21, y esta última encuentra un uso particular en muchas modalidades. El uso de combinaciones de citocinas favorece específicamente la generación de linfocitos, y en particular de células T como se describe allí.

TABLA 4: Secuencias de aminoácidos de interleucinas.

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:3 IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Aldesleucina	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60

IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	115
SEQ ID NO:8 IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG	60
	NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ	120
	HLSSRTHGSE DS	132

C. ETAPA C: Primera expansión con sensibilización para la transición de la segunda expansión rápida

En algunos casos, la población de TIL mayoritaria que se obtiene de la primera expansión con sensibilización (que puede incluir expansiones a veces denominadas pre-REP), que incluye, por ejemplo, la población de TIL que se obtiene, por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), puede someterse a una segunda expansión rápida (que puede incluir expansiones a las que a veces se hace referencia como Protocolo de Expansión Rápida (REP)) y después criopreservarse como se describe más abajo. De manera similar, en el caso de que se usen TIL modificados genéticamente en la terapia, la población de TIL expandida de la primera expansión con sensibilización o la población de TIL expandida de la segunda expansión rápida puede someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados antes de la etapa de la expansión o después de la primera expansión con sensibilización y antes de la segunda expansión rápida.

En algunas modalidades, los TIL que se obtienen de la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) se almacenan hasta que se caracterizan en base al fenotipo para la selección. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen de la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) no se almacenan y pasan directamente a la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen de la primera expansión con sensibilización no se criopreservan después de la primera expansión con sensibilización y antes de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre aproximadamente a los 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días desde que se produce la fragmentación del tumor

y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de aproximadamente 3 días a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de aproximadamente 3 días a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de aproximadamente 4 días a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de aproximadamente 4 días a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de aproximadamente 5 días a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de aproximadamente 5 días a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de aproximadamente 6 días a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de aproximadamente 6 días a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de aproximadamente 7 días a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre aproximadamente a los 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre aproximadamente a los 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización.

En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 1 día a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 1 día a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de 2 a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de 2 a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de 3 a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión ocurre de 3 a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 4 a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 4 a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 5 días a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 5 a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 6 a 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. . En algunas

modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 6 a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre de 7 a 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre 7 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida ocurre 8 días desde que ocurre la fragmentación y/o cuando se inicia la primera etapa de expansión con sensibilización.

En algunas modalidades, los TIL no se almacenan después de la primera expansión primaria y antes de la segunda expansión rápida, y los TIL pasan directamente a la segunda expansión rápida (por ejemplo, en algunas modalidades, no hay almacenamiento durante la transición desde la Etapa B a la Etapa D como se muestra en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la transición ocurre en un sistema cerrado, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL desde la primera expansión con sensibilización, la segunda población de TIL, pasan directamente a la segunda expansión rápida sin período de transición.

En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida, por ejemplo, la Etapa C de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un único biorreactor. En algunas modalidades, el único biorreactor empleado es, por ejemplo, un GREX-10 o un GREX-100. En algunas modalidades, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor. En algunas modalidades, la transición desde la primera expansión con sensibilización a la segunda expansión rápida implica un escalado en el tamaño del recipiente. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización se realiza en un recipiente más pequeño que la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la primera expansión con sensibilización se realiza en un GREX-100 y la segunda expansión rápida se realiza en un GREX-500.

D. ETAPA D: Segunda Expansión Rápida

En algunas modalidades, la población de células TIL se expande aún más en número después de la cosecha y la primera expansión con sensibilización, después de la Etapa A y la Etapa B, y la transición se denomina Etapa C, como se indica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). Esta expansión adicional se denomina en la presente descripción como la segunda expansión rápida, que puede incluir procesos de expansión generalmente denominados en la técnica como un proceso de expansión rápida (Protocolo de Expansión Rápida o REP; así como también los procesos indicados en la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). La segunda expansión rápida se logra generalmente mediante el uso de un medio de cultivo que comprende varios componentes, que incluyen células alimentadoras, una fuente de citocinas y un anticuerpo anti-CD3, en un recipiente permeable a los gases. En algunas modalidades, 1 día, 2 días, 3 días o 4 días después del inicio de la segunda expansión rápida (es decir, en los días 8, 9, 10 u 11 del proceso general de Gen 3), los TIL se transfieren a un recipiente de mayor volumen.

En algunas modalidades, puede realizarse la segunda expansión rápida (que puede incluir expansiones a veces denominadas como REP; así como también los procesos indicados en la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) de TIL mediante el uso de cualquier frasco o recipiente conocido por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días o 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión

rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 4 días hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 4 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 5 días hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 5 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 6 días hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 6 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 7 días hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 7 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 8 días hasta aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 8 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 9 días hasta aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 1 día después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 2 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 3 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 4 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 5 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede

continuar durante aproximadamente 6 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 7 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 8 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 9 días después del inicio de la segunda expansión rápida. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar durante aproximadamente 10 días después del inicio de la segunda expansión rápida.

En una modalidad, la segunda expansión rápida puede realizarse en un recipiente permeable a los gases mediante el uso de los métodos de la presente descripción (que incluyen, por ejemplo, expansiones denominadas como REP; así como también los procesos indicados en la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, los TIL se expanden en la segunda expansión rápida en presencia de IL-2, OKT-3 y células alimentadoras (también denominadas en la presente descripción “células presentadoras de antígeno”). En algunas modalidades, los TIL se expanden en la segunda expansión rápida en presencia de IL-2, OKT-3 y células alimentadoras, en donde las células alimentadoras se añaden a una concentración final que es dos veces, 2,4 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces o 4 veces la concentración de células alimentadoras presentes en la primera expansión con sensibilización. Por ejemplo, los TIL pueden expandirse rápidamente mediante el uso de la estimulación inespecífica del receptor de células T en presencia de interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15). La estimulación inespecífica del receptor de células T puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, tal como aproximadamente 30 ng/ml de OKT3, un anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA) o UHCT-1 (disponible comercialmente en BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.). Los TIL pueden expandirse para inducir una estimulación adicional de los TIL *in vitro* mediante la inclusión de uno o más antígenos durante la segunda expansión, que incluyen porciones antigénicas de estos, tales como epítopo(s) del cáncer, que pueden expresarse opcionalmente a partir de un vector, tal como el péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), por ejemplo, 0,3 µM MART-1: 26-35 (27 L) o gpl 00:209-217 (210 M), opcionalmente en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como 300 UI/ml de IL-2 o IL-15. Otros antígenos adecuados pueden incluir, por ejemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno de cáncer de tirosinasa, MAGE-A3, SSX-2

y VEGFR2, o las porciones antigénicas de estos. Los TIL también pueden expandirse rápidamente mediante una nueva estimulación con el mismo antígeno(s) del cáncer que se pulsan sobre células presentadoras de antígeno que expresan HLA-A2. Alternativamente, los TIL pueden estimularse nuevamente con, por ejemplo, linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. En algunas modalidades, la nueva estimulación ocurre como parte de la segunda expansión. En algunas modalidades, la segunda expansión ocurre en presencia de linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ e IL-2 irradiados.

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

En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende el anticuerpo OKT-3. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 30 ng/ml de anticuerpo OKT-3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,1 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 2,5 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 7,5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 15 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 35 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml y aproximadamente 1 µg/ml de anticuerpo OKT-3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende entre 0,1 ng/ml y 1 ng/ml, entre 1 ng/ml y 5 ng/ml, entre 5 ng/ml y 10 ng/ml, entre 10 ng/ml y 20 ng/ml, entre 20 ng/ml y 30 ng/ml, entre 30 ng/ml y 40 ng/ml, entre 40 ng/ml y 50 ng/ml, y entre 50 ng/ml y 100 ng/ml del anticuerpo OKT-3. En una

modalidad, el medio de cultivo celular comprende entre 30 ng/ml y 60 ng/ml de anticuerpo OKT-3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 60 ng/ml de OKT-3. En algunas modalidades, el anticuerpo OKT-3 es muromonab.

En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende IL-2. En algunas modalidades, el medio comprende 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende células presentadoras de antígeno alimentadoras. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende $7,5\times10^8$ células presentadoras de antígeno alimentadoras por recipiente. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende OKT-3. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende 500 ml de medio de cultivo y 30 µg de OKT-3 por recipiente. En algunas modalidades, el recipiente es un frasco GREX100 MCS. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende 6000 UI/ml de IL-2, 60 ng/ml de OKT-3 y $7,5\times10^8$ células presentadoras de antígeno alimentadoras. En algunas modalidades, el medio comprende 500 ml de medio de cultivo y 6000 UI/ml de IL-2, 30 µg de OKT-3 y $7,5\times10^8$ células presentadoras de antígeno alimentadoras por recipiente.

En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende IL-2. En algunas modalidades, el medio comprende 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende células presentadoras de antígeno alimentadoras. En algunas modalidades, el medio comprende entre 5×10^8 y $7,5\times10^8$ células presentadoras de antígeno alimentadoras por recipiente. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende OKT-3. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende 500 ml de medio de cultivo y 30 µg de OKT-3 por recipiente. En algunas modalidades, el recipiente es un frasco GREX100 MCS. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende 6000 UI/ml de IL-2, 60 ng/ml de OKT-3, y entre 5×10^8 y $7,5\times10^8$ células presentadoras de antígeno alimentadoras. En algunas modalidades, el medio en la segunda expansión rápida comprende 500 ml de medio de cultivo y 6000 UI/ml de IL-2, 30 µg de OKT-3 y entre 5×10^8 y $7,5\times10^8$ células presentadoras de antígeno alimentadoras por recipiente.

En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende uno o más agonistas de TNFRSF en un medio de cultivo celular. En algunas modalidades, el agonista de TNFRSF comprende un agonista de 4-1BB. En algunas modalidades, el agonista de

TNFRSF es un agonista de 4-1BB y el agonista de 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en urelumab, utomilumab, EU-101, una proteína de fusión y fragmentos, derivados, variantes, biosimilares y las combinaciones de estos. En algunas modalidades, el agonista de TNFRSF se añade a una concentración suficiente para lograr una concentración en el medio de cultivo celular entre 0,1 µg/ml y 100 µg/ml. En algunas modalidades, el agonista de TNFRSF se añade a una concentración suficiente para lograr una concentración en el medio de cultivo celular entre 20 µg/ml y 40 µg/ml.

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

En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21 como una combinación durante la segunda expansión. En algunas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21, así como también cualquier combinación de estas, pueden incluirse durante la segunda expansión, que incluyen, por ejemplo, durante un proceso de la Etapa D de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 como una combinación durante la segunda expansión. En algunas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21, así como también cualquier combinación de estas, pueden incluirse durante los procesos de la Etapa D de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) y como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, la segunda expansión puede realizarse en un medio de cultivo celular suplementado que comprende IL-2, OKT-3, células presentadoras de antígeno alimentadoras y, opcionalmente, un agonista de TNFRSF. En algunas modalidades, la segunda expansión ocurre en un medio de cultivo celular suplementado. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular suplementado comprende IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3, y células presentadoras de antígenos (APC; también denominadas como células alimentadoras presentadoras de antígeno). En algunas modalidades, la segunda expansión ocurre en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno (es decir, células presentadoras de antígeno).

En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15, aproximadamente 400 UI/mL de IL-15, aproximadamente 300 UI/mL de IL-15, aproximadamente 200 UI/mL de IL-15, aproximadamente 180 UI/mL de IL-15, aproximadamente 160 UI/mL de IL-15, aproximadamente 140 UI/mL de IL-15, aproximadamente 120 UI/mL de IL-15, o aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende adicionalmente IL-15. En una modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/ml de IL-15.

En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 20 UI/ml de IL-21, aproximadamente 15 UI/ml de IL-21, aproximadamente 12 UI/ml de IL-21, aproximadamente 10 UI/ml de IL-21, aproximadamente 5 UI/ml de IL-21, aproximadamente 4 UI/ml de IL-21, aproximadamente 3 UI/ml de IL-21, aproximadamente 2 UI/ml de IL-21, aproximadamente 1 UI/ml de IL-21, o aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende

aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende adicionalmente IL-21. En una modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno (APC) alimentadoras son PBMC. En una modalidad, la relación entre TIL y PBMC y/o células presentadoras de antígeno en la expansión rápida y/o la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 10, de aproximadamente 1 a 15, aproximadamente 1 a 20, de aproximadamente 1 a 25, de aproximadamente 1 a 30, de aproximadamente 1 a 35, de aproximadamente 1 a 40, de aproximadamente 1 a 45, de aproximadamente 1 a 50, de aproximadamente 1 a 75, de aproximadamente 1 a 100, de aproximadamente 1 a 125, de aproximadamente 1 a 150, de aproximadamente 1 a 175, de aproximadamente 1 a 200, de aproximadamente 1 a 225, de aproximadamente 1 a 250, de aproximadamente 1 a 275, de aproximadamente 1 a 300, de aproximadamente 1 a 325, de aproximadamente 1 a 350, de aproximadamente 1 a 375, de aproximadamente 1 a 400, o de aproximadamente 1 a 500. En una modalidad, la relación entre TIL y PBMC en la expansión rápida y/o la segunda expansión está entre 1 a 50 y 1 a 300. En una modalidad, la proporción de TIL a PBMC en la expansión rápida y/o la segunda expansión se encuentra entre 1 a 100 y 1 a 200.

En una modalidad, el REP y/o la segunda expansión rápida se realiza en frascos con los TIL mayoritarios que se mezclan con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, en donde la concentración de células alimentadoras es al menos 1,1 veces (1,1X), 1,2X, 1,3X, 1,4X, 1,5X, 1,6X, 1,7X, 1,8X, 1,8X, 2X, 2,1X 2,2X, 2,3X, 2,4X, 2,5X, 2,6X, 2,7X, 2,8X, 2,9X, 3,0X, 3,1X, 3,2X, 3,3X, 3,4X, 3,5X, 3,6X, 3,7X, 3,8X, 3,9X o 4,0X la concentración de las células alimentadoras en la primera expansión con sensibilización, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2 en 150 ml de medio. El cambio del medio se realiza (generalmente 2/3 de cambio del medio mediante la aspiración de 2/3 de medio metabolizado y sustituyendo con un volumen igual de medio recién preparado) hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. Las cámaras de crecimiento alternativas incluyen frascos G-REX y recipientes permeables a los gases, como se describe con más detalle más abajo.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida (que puede incluir los procesos denominados como el proceso REP) es de 7 a 9 días, como se describe en los ejemplos y las figuras. En algunas modalidades, la segunda expansión es de 7 días. En algunas

modalidades, la segunda expansión es de 8 días. En algunas modalidades, la segunda expansión es de 9 días.

En una modalidad, la segunda expansión (que puede incluir expansiones denominadas como REP, así como también las referidas en la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) puede realizarse en frascos permeables a los gases con capacidad de 500 ml con fondos de silicona permeables a los gases de 100 cm (G-Rex 100, disponible comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EE.UU.), 5×10^6 o 10×10^6 TIL pueden cultivarse con PBMC en 400 ml de medio 50/50, suplementado con suero AB humano al 5 %, 3000 UI por ml de IL-2 y 30 ng por ml de anti-CD3 (OKT3). Los frascos G-Rex 100 pueden incubarse a 37 °C en CO_2 al 5 %. El día 5, pueden retirarse 250 ml de sobrenadante y colocarse en botellas de centrífuga y centrifugarse a 1500 rpm (491 × g) durante 10 minutos. Los sedimentos de TIL pueden suspenderse nuevamente con 150 ml de medio recién preparado con suero AB humano al 5 %, 6000 UI por ml de IL-2 y pueden volverse a añadir a los frascos GREX-100 originales. Cuando los TIL se expanden en serie en frascos GREX-100, el día 10 u 11 los TIL pueden moverse a un frasco más grande, tal como un GREX-500. Las células pueden cosecharse el día 14 de cultivo. Las células pueden cosecharse el día 15 de cultivo. Las células pueden cosecharse el día 16 de cultivo. En algunas modalidades, el cambio del medio se realiza hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. En algunas modalidades, 2/3 del medio se cambia mediante aspiración del medio metabolizado y se sustituye con un volumen igual de medio recién preparado. En algunas modalidades, las cámaras de crecimiento alternativas incluyen frascos GREX y recipientes permeables a los gases, como se describe detalladamente más abajo.

En algunas modalidades, el medio de cultivo que se usa en los procesos de expansión que se describen en la presente descripción es un medio libre de suero o un medio definido. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o un sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido se usa para prevenir y/o disminuir la variación experimental debido en parte a la variación de lote a lote de los medios que contienen suero.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio de células basales incluye, pero no se limita al Medio Basal de

Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, el suplemento de suero o sustituto del suero incluye, pero no se limita a uno o más del Suplemento de Suero de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™, una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos, y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o 2-mercaptoetanol.

En algunas modalidades, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias de Células T CTS™ OpTmizer™ se usa con medios de crecimiento convencionales, que incluyen pero no se limitan al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración total de sustituto de suero (% en volumen) en el medio libre de suero o definido es de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % en volumen del medio total libre de suero o definido. En algunas modalidades, la

concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 3 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 5 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 10 % del volumen total del medio libre de suero o definido.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente un 3 % del Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific). En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM. En algunas modalidades, el SFM para expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente un 3 % de sustituto de suero para células inmunitarias CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) y la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es 55 µM.

En algunas modalidades, el medio definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina. En algunas modalidades, el SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente el 3 % del sustituto de suero de células inmunitarias (SR) CTS™ (ThermoFisher Scientific),

55 mM de 2-mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina, y comprende además de aproximadamente 1000 UI/ml a aproximadamente 8000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM para expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente un 3 % de sustituto de suero

para células inmunitarias CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) y la concentración final de 2-mercaptoetanol en el medio es 55 µM.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, de 0,5 mM a aproximadamente 9 mM, de 1 mM a aproximadamente 8 mM, de 2 mM a aproximadamente 7 mM, de 3 mM a aproximadamente 6 mM, o de 4 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de 10 mM a aproximadamente 140 mM, de 15 mM a aproximadamente 130 mM, de 20 mM a aproximadamente 120 mM, de 25 mM a aproximadamente 110 mM, de 30 mM a aproximadamente 100 mM, de 35 mM a aproximadamente 95 mM, de 40 mM a aproximadamente 90 mM, de 45 mM a aproximadamente 85 mM, de 50 mM a aproximadamente 80 mM, de 55 mM a aproximadamente 75 mM, de 60 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 65 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55 mM.

En algunas modalidades, los medios definidos que se describen en la Publicación del PCT Internacional Número WO/1998/030679, que se incorpora en la presente descripción como referencia, son útiles en la presente invención. En esa publicación, se describen medios de cultivo de células eucariotas sin suero. El medio de cultivo para células eucariotas sin suero incluye un medio de cultivo de células basales suplementado con un suplemento sin suero capaz de apoyar el crecimiento de las células en un cultivo sin suero. El suplemento del medio de cultivo de células eucariotas libre de suero comprende o se obtiene mediante la combinación de uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más oligoelementos, y uno o más antibióticos. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o beta-mercaptoetanol. En algunas modalidades, el medio definido comprende una albúmina o un sustituto de albúmina y uno o más

ingredientes seleccionados del grupo que consiste en uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio de células basales se selecciona del grupo que consiste en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración de glicina en el medio definido se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-histidina se encuentra de aproximadamente 5-250 mg/L, la concentración de L-isoleucina se encuentra de aproximadamente 5-300 mg/L, la concentración de L-metionina se encuentra de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-fenilalanina se encuentra de aproximadamente 5-400 mg/L, la concentración de L-prolina se encuentra de aproximadamente 1-1000 mg/L, la concentración de L-hidroxiprolina se encuentra de aproximadamente 1-45 mg/L, la concentración de L-serina se encuentra de aproximadamente 1-250 mg/L, la concentración de L-treonina se encuentra de aproximadamente 10-500 mg/L, la concentración de L-triptófano se encuentra de aproximadamente 2-110 mg/L, la concentración de L-tirosina se encuentra de aproximadamente 3-175 mg/L, la concentración de L-valina se encuentra de aproximadamente 5-500 mg/L, la concentración de tiamina se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de glutatión reducido se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de ácido L-ascórbico-2-fosfato se encuentra de aproximadamente 1-200 mg/L, la concentración de transferrina saturada de hierro se encuentra de aproximadamente 1-50 mg/L, la concentración de insulina se encuentra de aproximadamente 1-100 mg/L, la concentración de selenito de sodio se encuentra de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y la concentración de albúmina (por ejemplo, AlbuMAX®I) se encuentra de aproximadamente 5000-50 000 mg/L.

En algunas modalidades, los ingredientes sin porción de oligoelementos en el medio definido se encuentran presentes en los intervalos de concentración que se enumeran en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en el Medio 1X" en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, los ingredientes de las porciones que no son oligoelementos en el medio definido están presentes en las concentraciones finales enumeradas en la columna bajo el título “Una Modalidad Preferida del Medio 1X” en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, el medio definido es un medio de células basales que comprende un suplemento libre de suero. En algunas de estas modalidades, el suplemento libre de suero comprende ingredientes de las porciones que no son oligoelementos del tipo y en las concentraciones enumeradas en la columna bajo el título “Una modalidad preferida en el suplemento” en la Tabla A más abajo.

Tabla A: Concentraciones de Ingredientes Sin Porción de Oligoelementos

Ingrediente	Una modalidad preferida en suplemento (mg/L) (aproximadamente)	Intervalo de concentración en el medio 1X (mg/l) (aproximadamente)	Una modalidad preferida en el medio 1X (mg/L) (aproximadamente)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-Isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-Fenilalanina	1800	5-400	336
L-prolina	4000	1-1000	600
L-Hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-Treonina	2200	10-500	425
L-triptófano	440	2-110	82
L-Tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454

Tiamina	33	1-20	9
Glutatión Reducido	10	1-20	1,5
Ácido Ascórbico-2-PO_4 (mg de sal)	330	1-200	50
Transferrina (saturado de hierro)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenito de Sodio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50 000	12,500

En algunas modalidades, la osmolaridad del medio definido se encuentra entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol. En algunas modalidades, la osmolaridad se encuentra entre aproximadamente 280 y 310 mOsmol. En algunas modalidades, el medio definido se complementa con hasta aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio. El medio definido puede suplementarse además con L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM), 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

En algunas modalidades, el medio definido que se describe en Smith, y otros, “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” *Clin Transl Immunology*, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) son útiles en la presente invención. Brevemente, se usa RPMI o CTS™ OpTmizer™ como medio de células basales y se complementa ya sea con 0, 2 %, 5 %, o 10 % de Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™.

En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los

procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

En una modalidad, se realiza la segunda expansión rápida (que incluye las expansiones denominadas REP) y comprende además una etapa en donde los TIL se seleccionan para una reactividad tumoral superior. Puede usarse cualquier método de selección conocido en la técnica. Por ejemplo, los métodos descritos en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU núm. 2016/0010058 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia, pueden usarse para la selección de TIL para una reactividad tumoral superior.

Opcionalmente, puede realizarse un ensayo de viabilidad celular después de la segunda expansión rápida (que incluye las expansiones denominadas como la expansión REP), mediante el uso de ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL mayoritaria, que marca selectivamente las células muertas y permite una evaluación de la viabilidad. En algunas modalidades, las muestras de TIL pueden contarse y determinar la viabilidad mediante el uso de un contador celular automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). En algunas modalidades, la viabilidad se determina de acuerdo con el protocolo estándar del contador de células automático del citómetro de imagen Cellometer K2.

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

modalidades, la diversidad se encuentra en el receptor de células T. En algunas modalidades, la diversidad se encuentra en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión de TCRab (es decir, TCRα/β).

En algunas modalidades, el medio de cultivo de la segunda expansión rápida (por ejemplo, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular), comprende IL-2, OKT-3, así como también las células presentadoras de antígeno (APC) alimentadoras, como se discute con más detalle más abajo. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la segunda expansión rápida (por ejemplo, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular) comprende 6000 UI/ml de IL-2, 30 ug/frasco de OKT-3, así como también $7,5 \times 10^8$ células presentadoras de antígeno (APC) alimentadoras, como se discute con más detalle más abajo. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la segunda expansión rápida (por ejemplo, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular), comprende IL-2, OKT-3, así como también las células presentadoras de antígeno (APC) alimentadoras, como se discute con más detalle más abajo. En algunas modalidades, el medio de cultivo de la segunda expansión rápida (por ejemplo, a veces denominado CM2 o el segundo medio de cultivo celular) comprende 6000 UI/ml de IL-2, 30 ug/frasco de OKT-3, así como también 5×10^8 células presentadoras de antígeno (APC) alimentadoras, como se discute con más detalle más abajo.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida, por ejemplo, la Etapa D de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un biorreactor. En algunas modalidades, se emplea un biorreactor como recipiente. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX-100 o un G-REX-500. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es un G-REX-500.

1. Células alimentadoras y células presentadoras de antígeno

En una modalidad, los procedimientos de la segunda expansión rápida descritos en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como los descritos en la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), así como también los denominados como REP) requieren un exceso de células alimentadoras durante la expansión REP TIL y/o durante la segunda expansión rápida. En muchas modalidades, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se obtienen de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se obtienen mediante el uso de métodos estándar tales como la separación por gradiente Ficoll-Paque.

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

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para usar en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción si el número total de células viables en el día 7 o 14 es menor que el número de células viables inicial que se puso en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión).

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para usar en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número de células viables inicial que se puso en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión). En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2.

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y aceptables para usar en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción si el número total de células viables, cultivadas en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número de células viables inicial que se puso en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (es

decir, el día de inicio de la segunda expansión). En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 1000-6000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2000-5000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2000-4000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 2500-3500 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30-60 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 6000 UI/ml de IL-2.

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno alimentadoras son PBMC. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno alimentadoras son células presentadoras de antígenos alimentadoras artificiales. En una modalidad, la relación entre TIL y células presentadoras de antígenos alimentadoras en la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 10, de aproximadamente 1 a 25, de aproximadamente 1 a 50, de aproximadamente 1 a 100, de aproximadamente 1 a 125, de aproximadamente 1 a 150, de aproximadamente 1 a 175, de aproximadamente 1 a 200, de aproximadamente 1 a 225, de aproximadamente 1 a 250, de aproximadamente 1 a 275, de aproximadamente 1 a 300, de aproximadamente 1 a 325, de aproximadamente 1 a 350, de aproximadamente 1 a 375, de aproximadamente 1 a 400 o de aproximadamente 1 a 500. En una modalidad, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión se encuentra de entre 1 a 50 y 1 a 300. En una modalidad, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión se encuentra de entre 1 a 100 y 1 a 200.

En una modalidad, los procedimientos de la segunda expansión descritos en la presente descripción requieren una relación entre aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras y aproximadamente 100×10^6 TIL. En una modalidad, los procedimientos de la segunda expansión descritos en la presente descripción requieren una relación entre aproximadamente $7{,}5\times10^8$ células alimentadoras y aproximadamente 100×10^6 TIL. En otra modalidad, los procedimientos de la segunda expansión descritos en la presente descripción requieren una relación entre aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras y aproximadamente 50×10^6 TIL. En otra modalidad, los procedimientos de la segunda expansión descritos en la presente descripción requieren una relación entre aproximadamente $7{,}5\times10^8$ células alimentadoras y aproximadamente 50×10^6 TIL. Aun en otra modalidad, los procedimientos de la segunda expansión descritos en la presente

descripción requieren aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras y aproximadamente 25×10^6 TIL. Aun en otra modalidad, los procedimientos de la segunda expansión descritos en la presente descripción requieren aproximadamente $7,5\times10^8$ células alimentadoras y aproximadamente 25×10^6 TIL. Aun en otra modalidad, la segunda expansión rápida requiere dos veces el número de células alimentadoras que la segunda expansión rápida. Aun en otra modalidad, cuando la primera expansión con sensibilización descrita en la presente descripción requiere aproximadamente $2,5\times10^8$ células alimentadoras, la segunda expansión rápida requiere aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras. Aun en otra modalidad, cuando la primera expansión con sensibilización descrita en la presente descripción requiere aproximadamente $2,5\times10^8$ células alimentadoras, la segunda expansión rápida requiere aproximadamente $7,5\times10^8$ células alimentadoras. Aun en otra modalidad, la segunda expansión rápida requiere dos veces (2,0X), 2,5X, 3,0X, 3,5X o 4,0X el número de células alimentadoras como la primera expansión con sensibilización.

En una modalidad, los procedimientos de la segunda expansión rápida descritos en la presente descripción requieren un exceso de células alimentadoras durante la segunda expansión rápida. En muchas modalidades, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se obtienen de unidades de sangre completa estándar de donantes de sangre alogénicos sanos. Las PBMC se obtienen mediante el uso de métodos estándar tales como la separación por gradiente Ficoll-Paque. En una modalidad, se usan células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) en lugar de PBMC. En algunas modalidades, las PBMC se añaden a la segunda expansión rápida al doble de la concentración de PBMC que se añadieron a la primera expansión con sensibilización.

En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se usan en los procedimientos de expansión de TIL descritos en la presente descripción, que incluyen los procedimientos ilustrativos descritos en las figuras y los ejemplos.

En una modalidad, las células presentadoras de antígenos artificiales se usan en la segunda expansión rápida como un sustituto o en combinación con las PBMC.

2. Citocinas

Los métodos de la segunda expansión rápida descritos en la presente descripción generalmente usan medios de cultivo con altas dosis de una citocina, en particular IL-2, como se conoce en la técnica.

Alternativamente, también es posible usar combinaciones de citocinas para la segunda expansión rápida de TIL, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe generalmente en los documentos núms. WO 2015/189356 y WO 2015/189357, que se incorporan por la presente expresamente como referencia en su totalidad. Por lo tanto, las posibles combinaciones incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21, e IL-2, IL-15 e IL-21, y esta última encuentra un uso particular en muchas modalidades. El uso de combinaciones de citocinas favorece específicamente la generación de linfocitos, y en particular de células T como se describe allí.

E. ETAPA E: Cosecha de TILS

Después de la etapa de la segunda expansión rápida, pueden cosecharse las células. En algunas modalidades, los TIL se cosechan después de una, dos, tres, cuatro o más etapas de expansión, por ejemplo, como se proporciona en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, los TIL se cosechan después de dos etapas de expansión, por ejemplo, como se proporciona en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, los TIL se cosechan después de dos etapas de expansión, una primera expansión con sensibilización y una segunda expansión rápida, por ejemplo, como se proporciona en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

Los TIL pueden cosecharse de cualquier manera apropiada y estéril, que incluye, por ejemplo, mediante la centrifugación. Los métodos para la cosecha de TIL se conocen bien en la técnica y puede emplearse cualquiera de tales métodos conocidos con el presente proceso. En algunas modalidades, los TILS se cosechan mediante el uso de un sistema automatizado.

Los cosechadores de células y/o los sistemas de procesamiento de células se encuentran disponibles comercialmente a partir de una variedad de fuentes, que incluyen, por ejemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer e Inotech Biosystems International, Inc. Puede emplearse cualquier cosechador en base a células con los presentes métodos. En algunas modalidades, el cosechador de células y/o el sistema de procesamiento de células es un cosechador de células a base de membranas. En algunas modalidades, la cosecha de células se realiza mediante un sistema de procesamiento de células, tal como el sistema LOVO (fabricado por Fresenius Kabi). El término "sistema de procesamiento de células LOVO" también se refiere a cualquier instrumento o dispositivo fabricado mediante cualquier proveedor que pueda bombear una solución que comprenda células a través de una membrana o filtro

tal como una membrana giratoria o un filtro giratorio en un entorno de sistema estéril y/o cerrado, lo que permite flujo continuo y procesamiento celular para eliminar el sobrenadante o el medio de cultivo celular sin peletización. En algunas modalidades, el cosechador de células y/o el sistema de procesamiento de células puede realizar la separación de células, el lavado, el intercambio de fluidos, la concentración y/u otras etapas de procesamiento de células en un sistema estéril cerrado.

En algunas modalidades, la segunda expansión rápida, por ejemplo, la Etapa D de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un biorreactor. En algunas modalidades, se emplea un biorreactor como recipiente. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es, por ejemplo, un G-REX-100 o un G-REX-500. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor empleado es un G-REX-500.

En algunas modalidades, la Etapa E de acuerdo con la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), se realiza de acuerdo con los procesos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, se accede al sistema cerrado mediante jeringas en condiciones estériles para mantener la esterilidad y la naturaleza cerrada del sistema. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, los TIL se cosechan de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL se cosechan entre los días 14 y 16 mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL se cosechan a los 14 días mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL se cosechan a los 15 días mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL se cosechan a los 16 días mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción.

F. ETAPA F: Formulación Final/Transferencia a la Bolsa de Infusión

Después de completadas las Etapas A a E según se proporciona en un orden ilustrativo en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) y como se describe en detalle anteriormente y en la presente descripción, las células se transfieren a un recipiente para usar en la administración a un paciente. En algunas modalidades,

una vez que se obtiene un número terapéuticamente suficiente de TIL mediante el uso de los métodos de expansión descritos anteriormente, se transfieren a un recipiente para usar en la administración a un paciente.

En una modalidad, los TIL expandidos mediante el uso de los métodos de la presente descripción se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una modalidad, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL expandidos como se describe en la presente descripción pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada como se conoce en la técnica. En algunas modalidades, los TIL se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferentemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras rutas de administración adecuadas incluyen intraperitoneal, intratecal, e intralinfática.

G. Relaciones de Células Alimentadoras y PBMC

En algunas modalidades, los medios de cultivo usados en los métodos de expansión descritos en la presente descripción (ver, por ejemplo, la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) incluyen un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, OKT-3. Un anticuerpo anti-CD3 en combinación con IL-2 induce la activación de las células T y la división celular en la población TIL. Este efecto puede observarse con anticuerpos de longitud completa así como también con fragmentos Fab y F(ab')2, generalmente se prefiere el primero; ver, por ejemplo, Tsoukas y otros, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En una modalidad, el número de capas de PBMC alimentadoras se calcula de la siguiente manera:

A. Volumen de una célula T (10 µm de diámetro): $V = (4/3)\ \pi r^3 = 523{,}6\ \mu m^3$

B. Columna de G-Rex 100 (M) con una altura de 40 µm (4 células): $V = (4/3)\ \pi r^3 = 4\times10^{12}\ \mu m^3$

C. Número de células necesaria para llenar la columna B: $4\times10^{12}\ \mu m^3\ /523{,}6\ \mu m^3 = 7{,}6\times10^8\ \mu m^3 * 0{,}64 = 4{,}86\times10^8$

D. Número de células que pueden activarse de manera óptima en el espacio 4D: $4{,}86\times10^{8}/24 = 20{,}25\times10^6$

E. Número de alimentadoras y TIL extrapolados a G-Rex 500: TIL: 100×10^6 y alimentadoras: $2{,}5\times10^9$

En este cálculo, se usa una aproximación del número de células mononucleares necesarias para proporcionar una geometría icosaédrica para la activación de los TIL en un cilindro con una base de 100 cm^2. El cálculo deriva el resultado experimental de ~5×10^8 para la activación umbral de las células T que refleja fielmente los datos experimentales del NCI.(1) (C) El multiplicador (0,64) es la densidad de empaquetamiento aleatorio para esferas equivalentes calculada por Jaeger y Nagel en 1992 (2). (D) El divisor 24 es el número de esferas equivalentes que podrían entrar en contacto con un objeto similar en un espacio de 4 dimensiones “el número de Newton”(3).

(1)Jin, Jianjian y otros, 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.

En una modalidad, el número de células presentadoras de antígeno alimentadoras suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización es aproximadamente la mitad del número de células presentadoras de antígeno alimentadoras suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida. En determinadas modalidades, el método comprende realizar la primera expansión con sensibilización en un medio de cultivo celular que comprende aproximadamente un 50 % menos de células presentadoras de antígeno en comparación con el medio de cultivo celular de la segunda expansión rápida.

En otra modalidad, el número de células presentadoras de antígeno (APC) alimentadoras suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida es mayor que el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 20:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 10:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 9:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 8:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 7:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 6:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,9:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,8:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,7:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,6:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,1:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,9:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,8:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,7:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,6:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,1:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización es de, o aproximadamente, 2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida y el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización es de, o aproximadamente, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3,1:1, 3,2:1, 3,3:1, 3,4:1, 3,5:1, 3,6:1, 3,7:1, 3,8:1, 3,9:1, 4:1, 4,1:1, 4,2:1, 4,3:1, 4,4:1, 4,5:1, 4,6:1, 4,7:1, 4,8:1, 4,9:1 o 5:1.

En otra modalidad, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización es de, o aproximadamente, 1×10^8, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, 2×10^8, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, 3×10^8, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$ o $3,5\times10^8$ APC, y el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida es de, o aproximadamente, $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 4×10^8, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, 5×10^8, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$, 6×10^8, $6,1\times10^8$, $6,2\times10^8$, $6,3\times10^8$, $6,4\times10^8$, $6,5\times10^8$, $6,6\times10^8$, $6,7\times10^8$, $6,8\times10^8$, $6,9\times10^8$, 7×10^8, $7,1\times10^8$, $7,2\times10^8$, $7,3\times10^8$, $7,4\times10^8$, $7,5\times10^8$, $7,6\times10^8$, $7,7\times10^8$, $7,8\times10^8$, $7,9\times10^8$, 8×10^8, $8,1\times10^8$, $8,2\times10^8$, $8,3\times10^8$, $8,4\times10^8$, $8,5\times10^8$, $8,6\times10^8$, $8,7\times10^8$, $8,8\times10^8$, $8,9\times10^8$, 9×10^8, $9,1\times10^8$, $9,2\times10^8$, $9,3\times10^8$, $9,4\times10^8$, $9,5\times10^8$, $9,6\times10^8$, $9,7\times10^8$, $9,8\times10^8$, $9,9\times10^8$ o 1×10^9 APC.

En otra modalidad, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente, $1,5\times10^8$ APC a aproximadamente 3×10^8 APC, y el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente 4×10^8 APC a aproximadamente, $7,5\times10^8$ APC.

En otra modalidad, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente 2×10^8 APC a aproximadamente $2,5\times10^8$ APC, y el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $4,5\times10^8$ APC a aproximadamente $5,5\times10^8$ APC.

En otra modalidad, el número de APC suministradas exógenamente durante la primera expansión con sensibilización es de aproximadamente $2,5\times10^8$ APC, y el número de APC suministradas exógenamente durante la segunda expansión rápida es de aproximadamente 5×10^8 APC.

En una modalidad, el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) añadidas en el día 0 de la primera expansión con sensibilización es aproximadamente la mitad del número de PBMC añadidas en el día 7 de la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, el día 7 del método). En determinadas modalidades, el método comprende añadir las células presentadoras de antígeno en el día 0 de la primera expansión con sensibilización a la primera población de TIL y añadir las células presentadoras de antígeno el día 7 a la segunda población de TIL, en donde el número de células presentadoras de antígeno añadidas en el día 0 es aproximadamente 50 % del número de células presentadoras de antígeno añadidas en el día 7 de la primera expansión con sensibilización (por ejemplo, el día 7 del método).

En otra modalidad, el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 7 de la segunda expansión rápida es mayor que el número de PBMC suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $1,0\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $4,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $1,5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $3,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente 2×10^6 APC/cm^2 a aproximadamente 3×10^6 APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad de aproximadamente 2×10^6 APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad de aproximadamente $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, 2×10^6, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$, $2,5\times10^6$, $2,6\times10^6$, $2,7\times10^6$, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$ o $4,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $2,5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $7,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $3,5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $6,0\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $4,0\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $5,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $4,0\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad de aproximadamente $2,5\times10^6$ APC/cm^2, $2,6\times10^6$ APC/cm^2, $2,7\times10^6$ APC/cm^2, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$, $4,5\times10^6$, $4,6\times10^6$, $4,7\times10^6$, $4,8\times10^6$, $4,9\times10^6$, 5×10^6, $5,1\times10^6$, $5,2\times10^6$, $5,3\times10^6$, $5,4\times10^6$, $5,5\times10^6$, $5,6\times10^6$, $5,7\times10^6$, $5,8\times10^6$, $5,9\times10^6$, 6×10^6, $6,1\times10^6$, $6,2\times10^6$, $6,3\times10^6$, $6,4\times10^6$, $6,5\times10^6$, $6,6\times10^6$, $6,7\times10^6$, $6,8\times10^6$, $6,9\times10^6$, 7×10^6, $7,1\times10^6$, $7,2\times10^6$, $7,3\times10^6$, $7,4\times10^6$ o $7,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad de aproximadamente $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, 2×10^6, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$, $2,5\times10^6$, $2,6\times10^6$, $2,7\times10^6$, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$ o $4,5\times10^6$ APC/cm^2 y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad de aproximadamente $2,5\times10^6$ APC/cm^2, $2,6\times10^6$ APC/cm^2, $2,7\times10^6$ APC/cm^2, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$, $4,5\times10^6$, $4,6\times10^6$, $4,7\times10^6$, $4,8\times10^6$, $4,9\times10^6$, 5×10^6, $5,1\times10^6$, $5,2\times10^6$, $5,3\times10^6$, $5,4\times10^6$, $5,5\times10^6$, $5,6\times10^6$, $5,7\times10^6$, $5,8\times10^6$, $5,9\times10^6$, 6×10^6, $6,1\times10^6$, $6,2\times10^6$, $6,3\times10^6$, $6,4\times10^6$, $6,5\times10^6$,

$6{,}6\times10^6$, $6{,}7\times10^6$, $6{,}8\times10^6$, $6{,}9\times10^6$, 7×10^6, $7{,}1\times10^6$, $7{,}2\times10^6$, $7{,}3\times10^6$, $7{,}4\times10^6$ o $7{,}5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $1{,}0\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $4{,}5\times10^6$ APC/cm^2, y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $2{,}5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $7{,}5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $1{,}5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $3{,}5\times10^6$ APC/cm^2, y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente $3{,}5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente 6×10^6 APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente 2×10^6 APC/cm^2 a aproximadamente 3×10^6 APC/cm^2, y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad en un intervalo de aproximadamente 4×10^6 APC/cm^2 a aproximadamente $5{,}5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, las APC suministradas exógenamente en la primera expansión con sensibilización se siembran en el frasco de cultivo a una densidad de aproximadamente 2×10^6 APC/cm^2 y las APC suministradas exógenamente en la segunda expansión rápida se siembran en el frasco de cultivo a una densidad de aproximadamente 4×10^6 APC/cm^2.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de PBMC suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 20:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de PBMC suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 10:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de PBMC suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 9:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 8:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 7:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 6:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la

primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,9:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,8:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,7:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,6:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,1:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la

primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,9:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,8:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,7:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,6:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,5:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,4:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,3:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,1:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización es de aproximadamente 2:1.

En otra modalidad, la relación entre el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización es de aproximadamente 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3,1:1, 3,2:1, 3,3:1, 3,4:1, 3,5:1, 3,6:1, 3,7:1, 3,8:1, 3,9:1, 4:1, 4,1:1, 4,2:1, 4,3:1, 4,4:1, 4,5:1, 4,6:1, 4,7:1, 4,8:1, 4,9:1 o 5:1.

En otra modalidad, el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión con sensibilización es de

aproximadamente 1×10^8, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, 2×10^8, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, 3×10^8, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$ o $3,5\times10^8$ APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida es de aproximadamente $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 4×10^8, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, 5×10^8, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$, 6×10^8, $6,1\times10^8$, $6,2\times10^8$, $6,3\times10^8$, $6,4\times10^8$, $6,5\times10^8$, $6,6\times10^8$, $6,7\times10^8$, $6,8\times10^8$, $6,9\times10^8$, 7×10^8, $7,1\times10^8$, $7,2\times10^8$, $7,3\times10^8$, $7,4\times10^8$, $7,5\times10^8$, $7,6\times10^8$, $7,7\times10^8$, $7,8\times10^8$, $7,9\times10^8$, 8×10^8, $8,1\times10^8$, $8,2\times10^8$, $8,3\times10^8$, $8,4\times10^8$, $8,5\times10^8$, $8,6\times10^8$, $8,7\times10^8$, $8,8\times10^8$, $8,9\times10^8$, 9×10^8, $9,1\times10^8$, $9,2\times10^8$, $9,3\times10^8$, $9,4\times10^8$, $9,5\times10^8$, $9,6\times10^8$, $9,7\times10^8$, $9,8\times10^8$, $9,9\times10^8$ o 1×10^9 APC (que incluye, por ejemplo, PBMC).

En otra modalidad, el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente 1×10^8 APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) a aproximadamente $3,5\times10^8$ APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $3,5\times10^8$ APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) a aproximadamente 1×10^9 APC (que incluye, por ejemplo, PBMC).

En otra modalidad, el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente $1,5\times10^8$ APC a aproximadamente 3×10^8 APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente 4×10^8 APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) a aproximadamente $7,5\times10^8$ APC (que incluye, por ejemplo, PBMC).

En otra modalidad, el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente 2×10^8 APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) a aproximadamente $2,5\times10^8$ APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $4,5\times10^8$ APC (que

incluye, por ejemplo, PBMC) a aproximadamente $5,5\times10^8$ APC (que incluye, por ejemplo, PBMC).

En otra modalidad, el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 0 de la primera expansión con sensibilización es aproximadamente $2,5\times10^8$ APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el número de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente en el día 7 de la segunda expansión rápida es aproximadamente 5×10^8 APC (que incluye, por ejemplo, PBMC).

En una modalidad, el número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) añadidas en el día 0 de la primera expansión con sensibilización es aproximadamente la mitad del número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) añadidas en el día 7 de la segunda expansión rápida. En determinadas modalidades, el método comprende añadir capas de células presentadoras de antígeno en el día 0 de la primera expansión con sensibilización a la primera población de TIL y añadir capas de células presentadoras de antígeno el día 7 a la segunda población de TIL, en donde el número de capas de células presentadoras de antígeno añadido el día 0 es aproximadamente el 50 % del número de capas de células presentadoras de antígeno añadidas el día 7.

En otra modalidad, el número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 7 de la segunda expansión rápida es mayor que el número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) suministradas exógenamente el día 0 de la primera expansión con sensibilización.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas de células y el día 7 de la segunda expansión rápida ocurre en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente una capa de células y el día 7 de la segunda expansión rápida ocurre en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor

promedio de aproximadamente 1,5 capas de células a aproximadamente 2,5 capas de células y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente una capa de células y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3 capas de células y el día 7 de la segunda expansión rápida ocurre en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 1 capa de células a aproximadamente 2 capas de células y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas de células a aproximadamente 10 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas de células a aproximadamente 3 capas de células y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas de células a aproximadamente 8 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas de células y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo,

PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas de células a aproximadamente 8 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 1, 2 o 3 capas de células y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un grosor promedio de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas de células.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:10.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:8.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el

segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:7.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:6.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:5.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:4.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio

igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:3.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:2.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,2 a aproximadamente 1:8.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,3 a aproximadamente 1:7.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo,

PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,4 a aproximadamente 1:6.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:5.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,6 a aproximadamente 1:4.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,7 a aproximadamente 1:3,5.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,8 a aproximadamente 1:3.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,9 a aproximadamente 1:2,5.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) es de aproximadamente 1:2.

En otra modalidad, el día 0 de la primera expansión con sensibilización se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un primer grosor promedio igual a un primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) y el día 7 de la segunda expansión rápida se produce en presencia de APC dispuestas en capas (que incluye, por ejemplo, PBMC) con un segundo grosor promedio igual a un segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC), en donde la relación entre el primer número de capas de APC (que incluye, por ejemplo,

PBMC) y el segundo número de capas de APC (que incluye, por ejemplo, PBMC) es de aproximadamente 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,1, 1:2,2, 1:2,3, 1:2,4, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9, 1:3, 1:3,1, 1:3,2, 1:3,3, 1:3,4, 1:3,5, 1:3,6, 1:3,7, 1:3,8, 1:3,9, 1:4, 1:4,1, 1:4,2, 1:4,3, 1:4,4, 1:4,5, 1:4,6, 1:4,7, 1:4,8, 1:4,9, 1:5, 1:5,1, 1:5,2, 1:5,3, 1:5,4, 1:5,5, 1:5,6, 1:5,7, 1:5,8, 1:5,9, 1:6, 1:6,1, 1:6,2, 1:6,3, 1:6,4, 1:6,5, 1:6,6, 1:6,7, 1:6,8, 1:6,9, 1:7, 1:7,1, 1:7,2, 1:7,3, 1:7,4, 1:7,5, 1:7,6, 1:7,7, 1:7,8, 1:7,9, 1:8, 1:8,1, 1:8,2, 1:8,3, 1:8,4, 1:8,5, 1:8,6, 1:8,7, 1:8,8, 1:8,9, 1:9, 1:9,1, 1:9,2, 1:9,3, 1:9,4, 1:9,5, 1:9,6, 1:9,7, 1:9,8, 1:9,9 o 1:10.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente $1,0\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $4,5\times10^6$ APC/cm^2, y el número de APC en la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $2,5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $7,5\times10^6$ APC/cm^2.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente $1,5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $3,5\times10^6$ APC/cm^2, y el número de APC en la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $3,5\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $6,0\times10^6$ APC/cm^2.

En algunas modalidades, el número de APC en la primera expansión con sensibilización está en el intervalo de aproximadamente $2,0\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $3,0\times10^6$ APC/cm^2, y el número de APC en la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $4,0\times10^6$ APC/cm^2 a aproximadamente $5,5\times10^6$ APC/cm^2.

H. Componentes del Medio Celular Opcionales

1. Anticuerpos anti-CD3

En algunas modalidades, los medios de cultivo que se usan en los métodos de expansión descritos en la presente descripción (ver, por ejemplo, la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) incluyen un anticuerpo anti-CD3. Un anticuerpo anti-CD3 en combinación con IL-2 induce la activación de las células T y la división celular en la población TIL. Este efecto puede observarse con anticuerpos de longitud completa así como también con fragmentos Fab y F(ab')2, generalmente se prefiere el primero; ver, por ejemplo, Tsoukas y otros, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Como apreciarán los expertos en la técnica, hay varios anticuerpos anti-CD3 humanos adecuados que encuentran uso en la invención, que incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales anti-CD3 humano de varios mamíferos, que incluyen, entre otros,

anticuerpos murinos, humanos, de primates, ratas y caninos. En modalidades particulares, se usa el anticuerpo anti-CD3 OKT3 (disponible comercialmente de Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

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

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:1 Cadena pesada de muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Cadena ligera de muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

2. AGONISTAS DE 4-1BB (CD137)

En una modalidad, el medio de cultivo celular de la primera expansión con sensibilización y/o la segunda expansión rápida comprende un agonista de TNFRSF. En una modalidad, el agonista de TNFRSF es un agonista de 4-1BB (CD137). El agonista de 4-1BB puede ser cualquier molécula de unión a 4-1BB conocida en la técnica. La molécula de unión a 4-1BB puede ser un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión que puede unirse a 4-1BB humano o de mamífero. Los agonistas de 4-1BB o las moléculas de unión a 4-1BB pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. El agonista de 4-1BB o la molécula de unión a 4-1BB pueden tener tanto una cadena pesada como una ligera. Como se usa en la presente descripción, el término molécula de unión también incluye anticuerpos (que incluye anticuerpos de

longitud completa), anticuerpos monoclonales (que incluye anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab′), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores, y formas diseñadas por ingeniería genética de anticuerpos, por ejemplo, moléculas scFv, que se unen a 4-1BB. En una modalidad, el agonista de 4-1BB es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo completamente humano. En una modalidad, el agonista de 4-1BB es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, los agonistas de 4-1BB para usar en los métodos y las composiciones descritos actualmente incluyen anticuerpos anti-4-1BB, anticuerpos anti-4-1BB humanos, anticuerpos anti-4-1BB de ratón, anticuerpos anti-4-1BB de mamífero, anticuerpos monoclonales anti-4-1BB, anticuerpos policlonales anti-4-1BB, anticuerpos quiméricos anti-4-1BB, adnectinas anti-4-1BB, anticuerpos con dominio anti-4-1BB, fragmentos anti-4-1BB monocatenarios, fragmentos anti-4-1BB de cadena pesada, fragmentos anti-4-1BB de cadena ligera, proteínas de fusión anti-4-1BB y fragmentos, derivados, conjugados, variantes o biosimilares de estos. Se conoce que los anticuerpos anti-4-1BB agonistas inducen fuertes respuestas inmunitarias. Lee y otros, *PLOS One* **2013**, *8,* e69677. En una modalidad preferida, el agonista de 4-1BB es un anticuerpo monoclonal anti-4-1BB humanizado o completamente humano agonista (es decir, un anticuerpo derivado de una única línea celular). En una modalidad, el agonista de 4-1BB es EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), utomilumab o urelumab, o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar de estos. En una modalidad preferida, el agonista de 4-1BB es utomilumab o urelumab, o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar de estos.

En una modalidad preferida, el agonista de 4-1BB o la molécula de unión a 4-1BB también puede ser una proteína de fusión. En una modalidad preferida, un agonista de 4-1BB multimérico, tal como un agonista de 4-1BB trimérico o hexámero (con tres o seis dominios de unión a ligando), puede inducir una agrupación del receptor superior (4-1BBL) y la formación de un complejo de señalización celular interna en comparación con un anticuerpo monoclonal agonista, que normalmente posee dos dominios de unión a ligando. Se describen proteínas de fusión triméricas (trivalentes) o hexámeras (o hexavalentes) o mayores que comprenden tres dominios de unión a TNFRSF e IgG1-

Fc y que unen además opcionalmente dos o más de estas proteínas de fusión, por ejemplo, en Gieffers, y otros, *Mol. Cancer Therapeutics* **2013,** *12,* 2735-47.

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

En algunas modalidades, los agonistas de 4-1BB se caracterizan por unirse a 4-1BB humano (SEQ ID NO:9) con alta afinidad y actividad agonista. En una modalidad, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión que se une a 4-1BB humano (SEQ ID NO:9). En una modalidad, el agonista de 4-1BB es una molécula de unión que se une a 4-1BB murino (SEQ ID NO:10). Las secuencias de aminoácidos del antígeno 4-1BB al que se une un agonista o molécula de unión de 4-1BB se resumen en la Tabla 6.

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:9 4-1BB humano, superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (Homo sapiens)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255

SEQ ID NO:10 4-1BB murino, Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 9 (Mus musculus)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

En algunas modalidades, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista de 4-1BB que se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor, se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 90 pM o menor, se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 80 pM o menor, se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 70 pM o menor, se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 60 pM o menor, se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 50 pM o menor, se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 40 pM o menor, o se une a 4-1BB humano o murino con una K_D de aproximadamente 30 pM o menor.

En algunas modalidades, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista de 4-1BB que se une a 4-1BB humano o murino con una k_{asoc} de aproximadamente $7,5\times10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{asoc} de aproximadamente $7,5\times10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{asoc} de aproximadamente 8×10^5 l/M·s o más rápido, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{asoc} de aproximadamente $8,5\times10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{asoc} de aproximadamente 9×10^5 1/M·s o más rápido, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{asoc} de aproximadamente $9,5\times10^5$ 1/M·s o más rápido, o se une a 4-1BB humano o murino con una k_{asoc} de aproximadamente 1×10^6 1/M·s o más rápido.

En algunas modalidades, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista de 4-1BB que se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lento, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,1\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a 4-1BB humano o murino

con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,2\times10^{-5}$ 1/s o más lenta, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,3\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,4\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,5\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,6\times10^{-5}$ 1/s o más lento o se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,7\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,8\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,9\times10^{-5}$ 1/s o más lento, o se une a 4-1BB humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lento.

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

En una modalidad preferida, el agonista de 4-1BB es utomilumab, también conocido como PF-05082566 o MOR-7480, o un fragmento, derivado, variante o biosimilar de este. Utomilumab está disponible en Pfizer, Inc. Utomilumab es una inmunoglobulina G2-lambda, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF9 (miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), 4-1BB, antígeno ILA de células T, CD137)], *Homo sapiens* (anticuerpo monoclonal completamente humano). Las secuencias de aminoácidos de utomilumab se muestran en la Tabla 7. Utomilumab comprende sitios de glicosilación en Asn59 y Asn292; puentes disulfuro intracatenarios en la cadena pesada en las posiciones 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) y 362-420 (C_H3); puentes disulfuro intracatenarios en la cadena ligera en las posiciones 22'-87' (V_H-V_L) y 136'-195' (C_H1-C_L); puentes disulfuro intercatenarios en la cadena pesada-cadena pesada en las posiciones de las isoformas de IgG2A 218-218, 219-219, 222-

222 y 225-225, en las posiciones de las isoformas de IgG2A/B 218-130, 219-219, 222-222 y 225- 225, y en las posiciones de la isoforma de IgG2B 219-130 (2), 222-222 y 225-225; y puentes disulfuro intercatenarios en cadena pesada-cadena ligera en las posiciones de la isoforma IgG2A 130-213' (2), las posiciones de la isoforma IgG2A/B 218-213' y 130-213', y en las posiciones de la isoforma IgG2B 218-213' (2). La preparación y las propiedades de utomilumab y sus variantes y fragmentos se describen en las patentes de los EE.UU. núms. 8,821,867; 8,337,850; y 9,468,678, y la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 2012/032433 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las características preclínicas del utomilumab se describen en Fisher y otros, *Cancer Immunolog. & Immunother.* **2012,** *61,* 1721-33. Los ensayos clínicos actuales de utomilumab en una variedad de indicaciones de tumores sólidos y hematológicos incluyen los identificadores de Clinicaltrials.gov NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 y NCT02554812 de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU.

En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende una cadena pesada proporcionada por la SEQ ID NO:11 y una cadena ligera proporcionada por la SEQ ID NO: 12. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), variantes o conjugados de estos. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:12, respectivamente.

En una modalidad, el agonista de 4-1BB comprende las CDR de la cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR) de utomilumab. En una modalidad, la región variable

de la cadena pesada del agonista de 4-1BB (V_H) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:13, y la región variable de la cadena ligera del agonista de 4-1BB (V_L) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:14, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende un anticuerpo scFv que comprende las regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14.

En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 y la SEQ ID NO:17, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:18, la SEQ ID NO:19 y la SEQ ID NO:20, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas.

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

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

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:11 cadena pesada para utomilumab	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
SEQ ID NO:12 cadena ligera para utomilumab	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180

	SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	214
SEQ ID NO:13 región variable de la cadena pesada para utomilumab	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:14 región variable de la cadena ligera para utomilumab	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO:15 CDR1 de la cadena pesada para utomilumab	STYWIS	6
SEQ ID NO:16 CDR2 de la cadena pesada para utomilumab	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:17 CDR3 de la cadena pesada para utomilumab	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO:18 CDR1 de la cadena ligera para utomilumab	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:19 CDR2 de la cadena ligera para utomilumab	QDKNRPS	7

SEQ ID NO:20 CDR3 de la cadena ligera para utomilumab	ATYTGFGSLA V	11

En una modalidad preferida, el agonista de 4-1BB es el anticuerpo monoclonal urelumab, también conocido como BMS-663513 y 20H4.9.h4a, o un fragmento, derivado, variante o biosimilar de este. Urelumab está disponible en Bristol-Myers Squibb, Inc., y Creative Biolabs, Inc. Urelumab es una inmunoglobulina G4-kappa, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF9 (miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, 4-1BB, antígeno ILA de células T, CD137)], anticuerpo monoclonal de *Homo sapiens* (completamente humano). Las secuencias de aminoácidos de urelumab se exponen en la Tabla EE. Urelumab comprende sitios de N-glicosilación en las posiciones 298 (y 298'); puentes disulfuro intracatenarios en la cadena pesada en las posiciones 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 262-322 (C_H2) y 368-426 (C_H3) (y en las posiciones 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' y 368''-426''); puentes disulfuro intracatenarios en la cadena ligera en las posiciones 23'-88' (V_H-V_L) y 136'-196' (C_H1-C_L) (y en las posiciones 23'''-88''' y 136'''-196'''); puentes disulfuro intercatenarios cadena pesada-pesada en las posiciones 227-227'' y 230-230''; y puentes disulfuro intercatenarios cadena pesada-cadena ligera en 135-216' y 135''-216'''. La preparación y las propiedades de urelumab y sus variantes y fragmentos se describen en las patentes de los EE.UU. núms. 7,288,638 y 8,962,804, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las características preclínicas y clínicas de urelumab se describen en Segal y otros, *Clin. Cancer Res.* **2016,** disponible en http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272. Los ensayos clínicos actuales de urelumab en una variedad de indicaciones de tumores sólidos y hematológicos incluyen los identificadores de Clinicaltrials.gov NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 y NCT01471210 de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU.

En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende una cadena pesada proporcionada por la SEQ ID NO:21 y una cadena ligera proporcionada por la SEQ ID NO:22. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), variantes o conjugados de estos. En una modalidad, un agonista de 4-1BB

comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:21 y la SEQ ID NO:22, respectivamente.

En una modalidad, el agonista de 4-1BB comprende las CDR de la cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR) de urelumab. En una modalidad, la región variable de la cadena pesada del agonista de 4-1BB (V_H) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:23, y la región variable de la cadena ligera del agonista de 4-1BB (V_L) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:24, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:24, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:24, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:24, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:24, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:24, respectivamente. En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende un anticuerpo scFv que comprende las regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:24.

En una modalidad, un agonista de 4-1BB comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:25, la

SEQ ID NO:26 y la SEQ ID NO:27, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:28, la SEQ ID NO:29 y la SEQ ID NO:30, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas.

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

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

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:21 cadena pesada para urelumab	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO:22 cadena ligera para urelumab	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO:23 cadena pesada variable para urelumab	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 cadena ligera variable para urelumab	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO:25 CDR1 de la cadena pesada para urelumab	GYYWS 5
SEQ ID NO:26 CDR2 de la cadena pesada para urelumab	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO:27 CDR3 de la cadena pesada para urelumab	DYGPGNYDWY FDL 13

SEQ ID NO:28 CDR1 de la cadena ligera para urelumab	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:29 CDR2 de la cadena ligera para urelumab	DASNRAT	7
SEQ ID NO:30 CDR3 de la cadena ligera para urelumab	QQRSDWPPAL T	11

En una modalidad, el agonista de 4-1BB se selecciona del grupo que consiste en 1D8, 3Elor, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), el anticuerpo producido por la línea celular depositada como ATCC No. HB-11248 y descrita en la patente de los EE.UU. núm. 6,974,863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), los anticuerpos descritos en la publicación de la solicitud de patente de los EE.UU. núm. US 2005/0095244, los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 7,288,638 (tal como 20H4.9-IgGl (BMS-663031)), los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,887,673 (tal como 4E9 o BMS-554271), los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 7,214,493, los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,303,121, los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,569,997, los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,905,685 (tal como 4E9 o BMS-554271), los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,362,325 (tales como 1D8 o BMS-469492; 3H3 o BMS-469497; o 3El), los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,974,863 (tal como 53A2); los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,210,669 (tales como 1D8, 3B8 o 3El), los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 5,928,893, los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,303,121, los anticuerpos descritos en la patente de los EE.UU. núm. 6,569,997, los anticuerpos descritos en las publicaciones de solicitud de patente internacional núms. WO 2012/177788, WO 2015/119923 y WO 2010/042433, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes o biosimilares de estos, en donde la descripción de cada una de

las patentes o publicaciones de solicitud de patente anteriores se incorpora como referencia en la presente descripción.

En una modalidad, el agonista de 4-1BB es una proteína de fusión agonista de 4-1BB descrita en las publicaciones de solicitud de patente internacional núms. WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1 y WO 2010/078966 A1; las publicaciones de solicitud de patente de los EE.UU. núms. US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 y US 2015/0126710 A1; y las patentes de los EE.UU. núms. 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia.

En una modalidad, el agonista de 4-1BB es una proteína de fusión agonista de 4-1BB como se representa en la Estructura IA (proteína de fusión de fragmento de anticuerpo Fc extremo C) o Estructura IB (proteína de fusión de fragmento de anticuerpo Fc extremo N), o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar de esta, como se muestra en la **Figura 110**:

En las estructuras I-A e I-B, los cilindros se refieren a dominios de unión a polipéptidos individuales. Las estructuras I-A e I-B comprenden tres dominios de unión a TNFRSF unidos linealmente derivados de, por ejemplo, 4-1BBL (ligando 4-1BB, ligando CD137 (CD137L) o miembro 9 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF9)) o un anticuerpo que se une a 4-1BB, que se pliega para formar una proteína trivalente, que después se une a una segunda proteína trivalente a través de IgG1-Fc (que incluye los dominios C_H3 y C_H2) y después se usa para unir dos de las proteínas trivalentes juntas a través de enlaces disulfuro (pequeños óvalos), lo que estabiliza la estructura y proporciona un agonista que puede unir los dominios de señalización intracelular de los seis receptores y las proteínas de señalización para formar un complejo de señalización. Los dominios de unión a TNFRSF indicados como cilindros pueden ser dominios scFv que comprenden, por ejemplo, una cadena V_H y V_L conectada por un enlazador que puede comprender residuos hidrófilos y secuencias Gly y Ser para la flexibilidad, así como también Glu y Lys para la solubilidad. Puede usarse cualquier diseño de dominio scFv, tal como los descritos en de Marco, *Microbial Cell Factories*, **2011,** *10*, 44; Ahmad y otros, *Clin. & Dev. Immunol.* **2012,** 980250; Monnier y otros, *Antibodies,* **2013,** *2,* 193-208; o en referencias incorporadas en otra parte en la presente descripción. Las estructuras de la proteína de fusión de esta forma se describen en las patentes de los

EE.UU. núms. 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519 y 8,450,460, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia.

Las secuencias de aminoácidos para los otros dominios polipeptídicos de la estructura I-A se proporcionan en la Tabla 9. El dominio Fc comprende preferentemente un dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO:31), el dominio bisagra completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID NO:31) o una porción del dominio bisagra (por ejemplo, aminoácidos 4-16 de SEQ ID NO:31). Los enlazadores preferidos para conectar un anticuerpo Fc extremo C pueden seleccionarse de las modalidades proporcionadas en la SEQ ID NO:32 a SEQ ID NO:41, que incluyen los enlazadores adecuados para la fusión de polipéptidos adicionales.

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:31 Dominio Fc	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO:32 enlazador	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 enlazador	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:34 enlazador	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:35 enlazador	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:36 enlazador	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:37 enlazador	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:38 enlazador	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24

SEQ ID NO:39 enlazador	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID NO:40 enlazador	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID NO:41 enlazador	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

Las secuencias de aminoácidos para los otros dominios polipeptídicos de la estructura I-B se proporcionan en la Tabla 10. Si un fragmento de anticuerpo Fc se fusiona con el extremo N de una proteína de fusión agonista de TNRFSF como en la estructura I-B, la secuencia del módulo Fc es, preferentemente, la que se muestra en la SEQ ID NO:42, y las secuencias enlazadoras se seleccionan, preferentemente, de esas modalidades establecidas en las SEQ ID NO:43 hasta la SEQ ID NO:45.

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:42 Dominio Fc	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
SEQ ID NO:43 enlazador	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO:44 enlazador	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO:45 enlazador	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que se seleccionan del grupo que consiste en una cadena pesada variable y una cadena ligera

variable de utomilumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de urelumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de utomilumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable que se seleccionan de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables descritas en la Tabla 10, cualquier combinación de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de lo anterior, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes y biosimilares de estas.

En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que comprenden una secuencia 4-1BBL. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:46. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que comprenden una secuencia 4-1BBL soluble. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:47.

En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:13 y la SEQ ID NO:14, respectivamente, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:23 y la SEQ ID NO:24, respectivamente, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de 4-1BB de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a 4-1BB que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias V_H y V_L proporcionadas en la Tabla 11, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador.

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**

SEQ ID NO:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
SEQ ID NO:47 Dominio soluble de 4-1BBL	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
SEQ ID NO:48 cadena pesada variable para 4B4-1-1 versión 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
SEQ ID NO:49 cadena ligera variable para 4B4-1-1 versión 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:50 cadena pesada variable para 4B4-1-1 versión 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
SEQ ID NO:51 cadena ligera variable para 4B4-1-1 versión 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:52 cadena pesada variable para H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
SEQ ID NO:53 variable	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

light chain for H39E3-2	

En una modalidad, el agonista de 4-1BB es un polipéptido de fusión monocatenario agonista de 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de unión a 4-1BB soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión a 4-1BB soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico y (v) un tercer dominio de unión a 4-1BB soluble, que comprende, además, un dominio adicional en el extremo N y/o extremo C, y en donde el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc. En una modalidad, el agonista de 4-1BB es un polipéptido de fusión monocatenario agonista de 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de unión a 4-1BB soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión a 4-1BB soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico y (v) un tercer dominio de unión a 4-1BB soluble, que comprende, además, un dominio adicional en el extremo N y/o extremo C, en donde el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc, en donde cada uno de los dominios 4-1BB solubles carece de una región de tallo (que contribuye a la trimerización y proporciona una determinada distancia a la membrana celular, pero no es parte del dominio de unión a 4-1BB) y el primer y segundo enlazadores peptídicos tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos.

En una modalidad, el agonista de 4-1BB es un polipéptido de fusión monocatenario agonista de 4-1BB que comprende (i) un primer dominio de citocinas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral soluble (TNF), (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de citocinas de la superfamilia del TNF soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico y (v) un tercer dominio de citocinas de la superfamilia de TNF soluble, en donde cada uno de los dominios de citocinas de la superfamilia de TNF soluble carece de una región de tallo y el primer y segundo enlazadores peptídicos tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, y en donde cada dominio de citocinas de la superfamilia de TNF es un dominio de unión a 4-1BB.

En una modalidad, el agonista de 4-1BB es un anticuerpo scFv agonista de 4-1BB que comprende cualquiera de los dominios V_H anteriores unidos a cualquiera de los dominios V_L anteriores.

En una modalidad, el agonista de 4-1BB es el anticuerpo agonista de 4-1BB BPS Bioscience catálogo núm. 79097-2, disponible comercialmente en BPS Bioscience, San

Diego, CA, EE.UU. En una modalidad, el agonista de 4-1BB es el anticuerpo agonista de 4-1BB Creative Biolabs catálogo núm. MOM-18179, disponible comercialmente en Creative Biolabs, Shirley, NY, EE.UU.

3. Agonistas de OX40 (CD134)

En una modalidad, el agonista de TNFRSF es un agonista de OX40 (CD134). El agonista de OX40 puede ser cualquier molécula de unión a OX40 conocida en la técnica. La molécula de unión a OX40 puede ser un anticuerpo monoclonal o una proteína de fusión que puede unirse a OX40 humano o de mamífero. Los agonistas de OX40 o las moléculas de unión a OX40 pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. El agonista de OX40 o la molécula de unión a OX40 pueden tener tanto una cadena pesada como una ligera. Como se usa en la presente descripción, el término molécula de unión también incluye anticuerpos (que incluye los anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (que incluye los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab′), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores, y formas de anticuerpos diseñadas por ingeniería genética, por ejemplo, moléculas scFv, que se unen a OX40. En una modalidad, el agonista de OX40 es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo completamente humano. En una modalidad, el agonista de OX40 es una proteína de unión a antígeno que es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, los agonistas de OX40 para usar en los métodos y las composiciones descritos actualmente incluyen anticuerpos anti-OX40, anticuerpos anti-OX40 humanos, anticuerpos anti-OX40 de ratón, anticuerpos anti-OX40 de mamífero, anticuerpos anti-OX40 monoclonales, anticuerpos anti-OX40 policlonales, anticuerpos anti-OX40 quiméricos, adnectinas anti-OX40, anticuerpos con dominio anti-OX40, fragmentos anti-OX40 monocatenarios, fragmentos anti-OX40 de cadena pesada, fragmentos anti-OX40 de cadena ligera, proteínas de fusión anti-OX40 y fragmentos, derivados, conjugados, variantes o biosimilares de estos. En una modalidad preferida, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal anti-OX40 humanizado o completamente humano agonista (es decir, un anticuerpo derivado de una única línea celular).

En una modalidad preferida, el agonista de OX40 o la molécula de unión a OX40 también puede ser una proteína de fusión. Las proteínas de fusión a OX40 que comprenden un dominio Fc fusionado a OX40L se describen, por ejemplo, en Sadun y otros, *J. Immunother.* **2009,** *182,* 1481-89. En una modalidad preferida, un agonista de OX40 multimérico, tal como un agonista de OX40 trimérico o hexámero (con tres o seis dominios de unión a ligando), puede inducir una agrupación del receptor superior (OX40L) y la formación de un complejo de señalización celular interna en comparación con un anticuerpo monoclonal agonista, que normalmente posee dos dominios de unión a ligando. Se describen proteínas de fusión triméricas (trivalentes) o hexámeras (o hexavalentes) o mayores que comprenden tres dominios de unión a TNFRSF e IgG1-Fc y que unen además opcionalmente dos o más de estas proteínas de fusión, por ejemplo, en Gieffers, y otros, *Mol. Cancer Therapeutics* **2013,** *12,* 2735-47.

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

En algunas modalidades, los agonistas de OX40 se caracterizan por unirse a OX40 humano (SEQ ID NO:54) con alta afinidad y actividad agonista. En una modalidad, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une a OX40 humano (SEQ ID NO:54). En una modalidad, el agonista de OX40 es una molécula de unión que se une a OX40 murino (SEQ ID NO:55). Las secuencias de aminoácidos del antígeno OX40 al que se une un agonista o una molécula de unión a OX40 se resumen en la Tabla 12.

TABLA 12: Secuencias de aminoácidos de los antígenos OX40.

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:54 OX40 humano (Homo sapiens)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO:55 OX40 murino (Mus musculus)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

En algunas modalidades, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 90 pM o menor, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 80 pM o menor, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 70 pM o menor, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 60 pM o menor, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 50 pM o menor, se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 40 pM o menor, o se une a OX40 humano o murino con una K_D de aproximadamente 30 pM o menor.

En algunas modalidades, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una k_{assoc} de aproximadamente $7,5\times10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con una k_{assoc} de aproximadamente $7,5\times10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con una k_{assoc} de aproximadamente 8×10^5 1/M·s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con una k_{assoc} de aproximadamente $8,5\times10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con una k_{assoc} de aproximadamente 9×10^5 1/M·s o más rápido, se une a OX40 humano o murino con una k_{assoc} de aproximadamente $9,5\times10^5$

1/M·s o más rápido, o se une a OX40 humano o murino con una k_{assoc} de aproximadamente 1×10^{6} 1/M·s o más rápido.

En algunas modalidades, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con k_{dissoc} de aproximadamente $2,1\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,2\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,3\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,4\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,5\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,6\times10^{-5}$ 1/s o más lento o se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,7\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,8\times10^{-5}$ 1/s o más lento, se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente $2,9\times10^{-5}$ 1/s o más lento, o se une a OX40 humano o murino con una k_{dissoc} de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lento.

En algunas modalidades, las composiciones, los procesos y los métodos descritos incluyen un agonista de OX40 que se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o menor, se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o menor, o se une a OX40 humano o murino con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o menor.

En algunas modalidades, el agonista de OX40 es tavolixizumab, también conocido como MEDI0562 o MEDI-0562. Tavolixizumab está disponible en MedImmune subsidiaria de AstraZeneca, Inc. Tavolixizumab es una inmunoglobulina G1-kappa, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF4 (miembro 4 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), OX40, CD134)], anticuerpo monoclonal humanizado y quimérico. Las secuencias de aminoácidos de tavolixizumab se muestran en la Tabla 13. Tavolixizumab

comprende sitios de N-glicosilación en las posiciones 301 y 301", con glucanos de tipo CHO biantenarios complejos fucosilados; puentes disulfuro intracatenarios en la cadena pesada en las posiciones 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 265-325 (C_H2) y 371-429 (C_H3) (y en las posiciones 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'' y 371''-429''); puentes disulfuro intracatenarios en la cadena ligera en las posiciones 23'-88' (V_H-V_L) y 134'-194' (C_H1-C_L) (y en las posiciones 23'''-88''' y 134'''-194'''); puentes disulfuro intercatenarios cadena pesada-cadena pesada en las posiciones 230-230'' y 233-233''; y puentes disulfuro intercatenarios cadena pesada-cadena ligera en 224-214' y 224''-214'''. Los ensayos clínicos actuales de tavolixizumab en una variedad de indicaciones de tumores sólidos incluyen los identificadores de Clinicaltrials.gov NCT02318394 y NCT02705482 de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende una cadena pesada proporcionada por la SEQ ID NO:56 y una cadena ligera proporcionada por la SEQ ID NO:57. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:56 y la SEQ ID NO:57, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), variantes o conjugados de estos. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:56 y la SEQ ID NO:57, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:56 y la SEQ ID NO:57, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:56 y la SEQ ID NO:57, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:56 y la SEQ ID NO:57, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:56 y la SEQ ID NO:57, respectivamente.

En una modalidad, el agonista de OX40 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR) de tavolixizumab. En una modalidad, la región variable de la cadena pesada del agonista de OX40 (V_H) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:58, y la región variable de la cadena ligera del agonista OX40 (V_L) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:59, y las sustituciones

conservadoras de aminoácidos de estas. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:58 y la SEQ ID NO:59, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:58 y la SEQ ID NO:59, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos un 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:58 y la SEQ ID NO:59, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:58 y la SEQ ID NO:59, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:58 y la SEQ ID NO:59, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende un anticuerpo scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:58 y la SEQ ID NO:59.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 y la SEQ ID NO:62, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en la SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 y la SEQ ID NO:65, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas.

En una modalidad, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal biosimilar agonista de OX40 aprobado por las autoridades reguladoras de fármacos con referencia a tavolixizumab. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal biosimilar comprende un anticuerpo de OX40 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97 % de identidad de secuencia, por ejemplo, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia y que comprende una o más modificaciones postraduccionales en comparación con el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es tavolixizumab. En algunas modalidades, una o más modificaciones postraduccionales se seleccionan de una o más de: glicosilación, oxidación, desamidación y truncamiento. En algunas modalidades, el biosimilar es un anticuerpo agonista de OX40 autorizado o presentado para autorización, en donde el anticuerpo

agonista de OX40 se proporciona en una formulación que difiere de las formulaciones de un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es tavolixizumab. El anticuerpo agonista de OX40 puede estar autorizado por una autoridad reguladora de fármacos tal como la FDA de los EE.UU. y/o la EMA de la Unión Europea. En algunas modalidades, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende, además, uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es tavolixizumab. En algunas modalidades, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende, además, uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es tavolixizumab.

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

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:56 cadena pesada para tavolixizumab	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:57 cadena ligera para tavolixizumab	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:58 región	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60

variable de la cadena pesada para tavolixizumab	PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	118
SEQ ID NO:59 región variable de la cadena ligera para tavolixizumab	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:60 CDR1 de la cadena pesada para tavolixizumab	GSFSSGYWN	9
SEQ ID NO:61 CDR2 de la cadena pesada para tavolixizumab	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID NO:62 CDR3 de la cadena pesada para tavolixizumab	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID NO:63 CDR1 de la cadena ligera para tavolixizumab	QDISNYLN	8
SEQ ID NO:64 CDR2 de la cadena ligera para tavolixizumab	LLIYYTSKLH S	11
SEQ ID NO:65 CDR3 de la cadena ligera	QQGSALPW	8

para tavolixizumab	

En algunas modalidades, el agonista de OX40 es 11D4, que es un anticuerpo completamente humano disponible en Pfizer, Inc. La preparación y las propiedades de 11D4 se describen en las patentes de los EE.UU. núms. 7,960,515, 8,236,930 y 9,028,824, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las secuencias de aminoácidos de 11D4 se muestran en la Tabla 14.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende una cadena pesada proporcionada por la SEQ ID NO:66 y una cadena ligera proporcionada por la SEQ ID NO:67. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:66 y la SEQ ID NO:67, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), variantes o conjugados de estos. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:66 y la SEQ ID NO:67, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:66 y la SEQ ID NO:67, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:66 y la SEQ ID NO:67, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:66 y la SEQ ID NO:67, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:66 y la SEQ ID NO:67, respectivamente.

En una modalidad, el agonista de OX40 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR) de 11D4. En una modalidad, la región variable de la cadena pesada del agonista de OX40 (V_H) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:68, y la región variable de la cadena ligera del agonista OX40 (V_L) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:69, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:68 y la SEQ ID NO:69, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40

comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:68 y la SEQ ID NO:69, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:68 y la SEQ ID NO:69, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:68 y la SEQ ID NO:69, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:68 y la SEQ ID NO:69, respectivamente.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 y la SEQ ID NO:72, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en la SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74 y la SEQ ID NO:75, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas.

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

excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o un producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referenciao el producto biológico de referencia es 11D4. En algunas modalidades, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende, además, uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es 11D4.

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:66 cadena pesada para 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
SEQ ID NO:67 cadena ligera para 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:68 región variable de la cadena pesada para 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:69 región variable de la cadena	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107

ligera para 11D4		
SEQ ID NO:70 CDR1 de la cadena pesada para 11D4	SYSMN	5
SEQ ID NO:71 CDR2 de la cadena pesada para 11D4	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID NO:72 CDR3 de la cadena pesada para 11D4	ESGWYLFDY	9
SEQ ID NO:73 CDR1 de la cadena ligera para 11D4	RASQGISSWL A	11
SEQ ID NO:74 CDR2 de la cadena ligera para 11D4	AASSLQS	7
SEQ ID NO:75 CDR3 de la cadena ligera para 11D4	QQYNSYPPT	9

En algunas modalidades, el agonista de OX40 es 18D8, que es un anticuerpo completamente humano disponible en Pfizer, Inc. La preparación y las propiedades de 18D8 se describen en las patentes de los EE.UU. núms. 7,960,515; 8,236,930; y 9,028,824, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las secuencias de aminoácidos de 18D8 se muestran en la Tabla 15.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende una cadena pesada proporcionada por la SEQ ID NO:76 y una cadena ligera proporcionada por la SEQ ID NO:77. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:76 y la SEQ ID NO:77, respectivamente, o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), variantes o conjugados de estos. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:76 y la SEQ ID NO:77, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:76 y la SEQ ID NO:77, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:76 y la SEQ ID NO:77, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:76 y la SEQ ID NO:77, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende cadenas pesadas y ligeras que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:76 y la SEQ ID NO:77, respectivamente.

En una modalidad, el agonista de OX40 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR) de 18D8. En una modalidad, la región variable de la cadena pesada del agonista de OX40 (V_H) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:78, y la región variable de la cadena ligera del agonista de OX40 (V_L) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:79, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:78 y la SEQ ID NO:79, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:78 y la SEQ ID NO:79, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:78 y la SEQ ID NO:79, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:78 y la SEQ ID NO:79, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:78 y la SEQ ID NO:79, respectivamente.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:80, la SEQ ID NO:81 y la SEQ ID NO:82, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:83, la SEQ ID NO:84 y la SEQ ID NO:85, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas.

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

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

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:76 cadena pesada para 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:77 cadena ligera para 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO:78 región variable de la cadena pesada para 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO:79 región variable de la cadena ligera para 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO:80 CDR1 de la cadena pesada para 18D8	DYAMH 5
SEQ ID NO:81 CDR2 de la	GISWNSGSIG YADSVKG 17

cadena pesada para 18D8		
SEQ ID NO:82 CDR3 de la cadena pesada para 18D8	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:83 CDR1 de la cadena ligera para 18D8	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:84 CDR2 de la cadena ligera para 18D8	DASNRAT	7
SEQ ID NO:85 CDR3 de la cadena ligera para 18D8	QQRSNWPT	8

En algunas modalidades, el agonista de OX40 es Hu119-122, que es un anticuerpo humanizado disponible en GlaxoSmithKline plc. La preparación y las propiedades de Hu119-122 se describen en las patentes de los EE.UU. núms. 9,006,399 y 9,163,085, y en la publicación de patente internacional núm. WO 2012/027328, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las secuencias de aminoácidos de Hu119-122 se muestran en la Tabla 16.

En una modalidad, el agonista de OX40 comprende las CDR de la cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR) de Hu119-122. En una modalidad, la región variable de la cadena pesada del agonista de OX40 (V_H) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:86, y la región variable de la cadena ligera del agonista de OX40 (V_L) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:87, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:86 y la SEQ ID NO:87, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:86 y la SEQ ID NO:87, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L

que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:86 y la SEQ ID NO:87, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:86 y la SEQ ID NO:87, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:86 y la SEQ ID NO:87, respectivamente.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:88, la SEQ ID NO:89 y la SEQ ID NO:90, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en la SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 y la SEQ ID NO:93, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas.

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

producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es Hu119-122. En algunas modalidades, el biosimilar se proporciona como una composición que comprende, además, uno o más excipientes, en donde uno o más excipientes son iguales o diferentes a los excipientes comprendidos en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es Hu119-122.

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

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:86 región variable de la cadena pesada para Hu119-122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:87 región variable de la cadena ligera para Hu119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 CDR1 de la cadena pesada para Hu119-122	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 CDR2 de la cadena pesada para Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO:CDR3 de la cadena pesada 90 para Hu119-122	HYDDYYAWFA Y 11

SEQ ID NO:91 CDR1 de la cadena ligera para Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID NO:92 CDR2 de la cadena ligera para Hu119-122	LASNLES	7
SEQ ID NO:93 CDR3 de la cadena ligera para Hu119-122	QHSRELPLT	9

En algunas modalidades, el agonista de OX40 es Hu106-222, que es un anticuerpo humanizado disponible en GlaxoSmithKline plc. La preparación y las propiedades de Hu106-222 se describen en las patentes de los EE.UU. núms. 9,006,399 y 9,163,085, y en la publicación de patente internacional núm. WO 2012/027328, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las secuencias de aminoácidos de Hu106-222 se muestran en la Tabla 17.

En una modalidad, el agonista de OX40 comprende las CDR de cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR) de Hu106-222. En una modalidad, la región variable de la cadena pesada del agonista de OX40 (V_H) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:94, y la región variable de la cadena ligera del agonista de OX40 (V_L) comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:95, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 99 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:94 y la SEQ ID NO:95, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 98 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:94 y la SEQ ID NO:95, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 97 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:94 y la SEQ ID NO:95, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 96 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID

NO:94 y la SEQ ID NO:95, respectivamente. En una modalidad, un agonista de OX40 comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:94 y la SEQ ID NO:95, respectivamente.

En una modalidad, un agonista de OX40 comprende dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97 y la SEQ ID NO:98, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas, y dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen las secuencias expuestas en la SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100 y la SEQ ID NO:101, respectivamente, y las sustituciones conservadoras de aminoácidos de estas.

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

en un medicamento de referencia o producto biológico de referencia, en donde el medicamento de referencia o el producto biológico de referencia es Hu106-222.

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

Identificador	Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)
SEQ ID NO:94 región variable de la cadena pesada para Hu106-222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:95 región variable de la cadena ligera para Hu106-222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO:96 CDR1 de la cadena pesada para Hu106-222	DYSMH 5
SEQ ID NO:97 CDR2 de la cadena pesada para Hu106-222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO:98 CDR3 de la cadena pesada para Hu106-222	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO:99 CDR1 de la cadena ligera para Hu106-222	KASQDVSTAV A 11

SEQ ID NO:100 CDR2 de la cadena ligera para Hu106-222	SASYLYT	7
SEQ ID NO:101 CDR3 de la cadena ligera para Hu106-222	QQHYSTPRT	9

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista de OX40 es MEDI6469 (también denominado 9B12). MEDI6469 es un anticuerpo monoclonal murino. Weinberg y otros, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575-585. En algunas modalidades, el agonista de OX40 es un anticuerpo producido por el hibridoma 9B12, depositado en Biovest Inc. (Malvern, MA, EE.UU.), como se describe en Weinberg y otros, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575-585, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las secuencias CDR de MEDI6469. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o una secuencia de la región variable de cadena ligera de MEDI6469.

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

En una modalidad, el agonista de OX40 se selecciona de los agonistas de OX40 descritos en las publicaciones de solicitud de patente internacional núms. WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 y WO 2014/148895; la solicitud de patente europea núm. EP 0672141; las publicaciones de solicitud de patente de los EE.UU. núms. US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 y US 2015/132288 (que incluye los clones 20E5 y 12H3); y las patentes de los EE.UU. núms. 7,504,101, 7,550,140, 7,622,444, 7,696,175, 7,960,515, 7,961,515, 8,133,983, 9,006,399, y 9,163,085, cuyas descripciones se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En una modalidad, el agonista de OX40 es una proteína de fusión agonista de OX40 como se representa en la Estructura I-A (proteína de fusión de fragmento de anticuerpo Fc extremo C) o Estructura I-B (proteína de fusión de fragmento de anticuerpo Fc extremo N), o un fragmento, derivado, conjugado, variante o biosimilar de esta. Las propiedades de las estructuras I-A e I-B se describen anteriormente y en las patentes de los EE.UU. núms. 9,359,420, 9,340,599, 8,921,519, y 8,450,460, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Las secuencias de aminoácidos para los dominios polipeptídicos de la estructura I-A se proporcionan en la Tabla 9. El dominio Fc comprende preferentemente un dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO:31), el dominio bisagra completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID NO:31) o una porción del dominio bisagra (por ejemplo, aminoácidos 4-16 de SEQ ID NO:31). Los enlazadores preferidos para conectar un anticuerpo Fc extremo C pueden seleccionarse de las modalidades proporcionadas en la SEQ ID NO:32 a SEQ ID NO:41, que incluyen los enlazadores adecuados para la fusión de polipéptidos adicionales. Asimismo, las secuencias de aminoácidos para los dominios polipeptídicos de la estructura I-B se proporcionan en la Tabla 10. Si un fragmento de anticuerpo Fc se fusiona con el extremo N de una proteína de fusión TNRFSF como en la estructura I-B, la secuencia del módulo Fc es, preferentemente, la que se muestra en la SEQ ID NO:42, y las secuencias enlazadoras se seleccionan, preferentemente, del conjunto de las modalidades establecidas en las SEQ ID NO:43 hasta la SEQ ID NO:45.

En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que se seleccionan del grupo que consiste en una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de tavolixizumab, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de 11D4, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de 18D8, una cadena

pesada variable y una cadena ligera variable de Hu119-122, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de Hu106-222, una cadena pesada variable y una cadena ligera variable que se selecciona de las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables descritas en la Tabla 17, cualquier combinación de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de las anteriores, y fragmentos, derivados, conjugados, variantes y biosimilares de estas.

En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia de OX40L. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:102. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia de OX40L soluble. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:103. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que comprenden una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:104.

En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:58 y la SEQ ID NO:59, respectivamente, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:68 y la SEQ ID NO:69, respectivamente, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:78 y la SEQ ID NO:79, respectivamente, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con

las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:86 y la SEQ ID NO:87, respectivamente, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias mostradas en la SEQ ID NO:94 y la SEQ ID NO:95, respectivamente, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador. En una modalidad, una proteína de fusión agonista de OX40 de acuerdo con las estructuras I-A o I-B comprende uno o más dominios de unión a OX40 que es un dominio scFv que comprende regiones V_H y V_L que son cada una al menos 95 % idénticas a las secuencias V_H y V_L proporcionadas en la Tabla 14, en donde los dominios V_H y V_L están conectados por un enlazador.

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

Identificador	**Secuencia (Símbolos de Aminoácidos de Una Letra)**
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 dominio soluble de OX40L	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 dominio soluble de OX40L (alternativa)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128

SEQ ID NO:105 cadena pesada variable para 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:106 cadena ligera variable para 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 cadena pesada variable para 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:108 cadena ligera variable para 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 cadena pesada variable para 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 cadena ligera variable para 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 cadena pesada	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120

variable para 023	
SEQ ID NO:112 cadena ligera variable para 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 región variable de la cadena pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 región variable de la cadena ligera	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 región variable de la cadena pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:116 región variable de la cadena ligera	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:117 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60

región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	120 122
SEQ ID NO:119 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:120 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:121 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
SEQ ID NO:122 región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:123 región variable de la cadena	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111

ligera del anticuerpo humanizado	
SEQ ID NO:124 región variable de la cadena ligera del anticuerpo humanizado	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 región variable de la cadena pesada	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:126 región variable de la cadena ligera	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

En una modalidad, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión monocatenario agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio de unión a OX40 soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión a OX40 soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico y (v) un tercer dominio de unión a OX40 soluble, que comprende, además, un dominio adicional en el extremo N y/o extremo C, y en donde el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc. En una modalidad, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión monocatenario agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio de unión a OX40 soluble, (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de unión a OX40 soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico y (v) un tercer dominio de unión a OX40 soluble, que comprende, además, un dominio adicional en el extremo N y/o extremo C, en donde el dominio adicional es un dominio de fragmento Fab o Fc en donde cada uno de los dominios de unión a OX40 soluble carece de una región de tallo (que contribuye a la trimerización y proporciona una determinada distancia a la membrana celular, pero no es parte del dominio de unión a OX40) y el

primero y el segundo enlazadores peptídicos tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos.

En una modalidad, el agonista de OX40 es un polipéptido de fusión monocatenario agonista de OX40 que comprende (i) un primer dominio de citocinas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral soluble (TNF), (ii) un primer enlazador peptídico, (iii) un segundo dominio de citocinas de la superfamilia del TNF soluble, (iv) un segundo enlazador peptídico y (v) un tercer dominio de citocinas de la superfamilia del TNF soluble, en donde cada uno de los dominios de citocinas de la superfamilia de TNF soluble carece de una región de tallo y el primer y segundo enlazadores peptídicos tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, y en donde el dominio de citocina de la superfamilia del TNF es un dominio de unión a OX40.

En algunas modalidades, el agonista de OX40 es MEDI6383. MEDI6383 es una proteína de fusión agonista de OX40 y puede prepararse como se describe en la patente de los EE.UU. núm. 6,312,700, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia.

En una modalidad, el agonista de OX40 es un anticuerpo scFv agonista de OX40 que comprende cualquiera de los dominios V_H anteriores unidos a cualquiera de los dominios V_L anteriores.

En una modalidad, el agonista de OX40 es un anticuerpo monoclonal agonista de OX40 MOM-18455 de Creative Biolabs, disponible comercialmente en Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, EE.UU.

En una modalidad, el agonista de OX40 es un clon de anticuerpo agonista de OX40 Ber-ACT35 disponible comercialmente de BioLegend, Inc., San Diego, CA, EE.UU.

I. Análisis de viabilidad celular

Opcionalmente, puede realizarse un ensayo de viabilidad celular después de la primera expansión con sensibilización (a veces denominada como la expansión inicial mayoritaria), mediante el uso de ensayos estándar conocidos en la técnica. Por tanto, en determinadas modalidades, el método comprende realizar un ensayo de viabilidad celular después de la primera expansión con sensibilización. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL mayoritaria, que marca selectivamente las células muertas y permite una evaluación de la viabilidad. Otros ensayos para usar en las pruebas de viabilidad pueden incluir, entre otros, el ensayo de azul de Alamar; y el ensayo MTT.

1. Recuentos de células, viabilidad, citometría de flujo

En algunas modalidades, se miden los recuentos y/o la viabilidad de las células. La expresión de marcadores tales como, pero no limitados a, CD3, CD4, CD8 y CD56, así como también cualquier otro descrito en la presente descripción, puede medirse mediante citometría de flujo con anticuerpos, por ejemplo, pero sin limitarse a los disponibles comercialmente en BD Bio-sciences (BD Biosciences, San José, CA) mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCanto™ (BD Biosciences). Las células pueden contarse manualmente mediante el uso de un hemocitómetro de chip c desechable (VWR, Batavia, IL) y la viabilidad puede evaluarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica, que incluye, entre otros, la tinción con azul tripán. La viabilidad celular también puede analizarse basándose en el documento núm. USSN 15/863,634, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. La viabilidad celular también puede analizarse en base a la publicación de patente de los EE.UU. núm. 2018/0280436 o la publicación de patente internacional núm. WO/2018/081473, las cuales se incorporan en la presente descripción en su totalidad para todos los propósitos.

En algunos casos, la población de TIL mayoritaria puede criopreservarse inmediatamente, mediante el uso de los protocolos que se describen más abajo. Alternativamente, la población de TIL mayoritaria puede someterse a REP y después criopreservarse como se describe más abajo. De manera similar, en el caso de que se usen TIL modificados genéticamente en la terapia, las poblaciones de TIL mayoritarias o REP pueden someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados.

2. Cultivos celulares

En una modalidad, un método para expandir TIL, que incluyen los discutidos anteriormente así como también los ejemplificados en la Figura 1, en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C, puede incluir el uso de aproximadamente 5000 ml a aproximadamente 25 000 ml de medio celular, de aproximadamente 5000 ml a aproximadamente 10 000 ml de medio celular, o de aproximadamente 5800 ml a aproximadamente 8700 ml de medio celular. En algunas modalidades, el medio es un medio sin suero. En algunas modalidades, el medio de la primera expansión con sensibilización es sin suero. En algunas modalidades, el medio en la segunda es sin suero. En algunas modalidades, los medios en la primera expansión con sensibilización y la segunda expansión (también denominada segunda expansión rápida) son sin suero. En una modalidad, expandir el número de TIL no usa más de un tipo de medio de cultivo

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

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

En una modalidad, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células presentadoras de antígeno alimentadoras 1X y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 1 a 8 días, por ejemplo, aproximadamente 8 días como primera expansión con sensibilización; transferir los TIL a un segundo recipiente permeable a los gases y expandir el número de TIL en el segundo recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células presentadoras de antígeno alimentadoras 2X y OKT-3 por una duración de aproximadamente 7 a 9 días, por ejemplo, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días o aproximadamente 9 días.

En una modalidad, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células presentadoras de antígeno alimentadoras 1X y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 1 a 7 días, por ejemplo, aproximadamente 7 días como una primera expansión con sensibilización; transferir los TIL a un segundo recipiente permeable a los gases y expandir el número de TIL en el segundo recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células presentadoras de antígeno alimentadoras 2X y OKT-3 por una duración de aproximadamente 7 a 9 días, por ejemplo, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días o aproximadamente 9 días.

En una modalidad, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células presentadoras de antígeno alimentadoras 1X y OKT-3 durante una duración de aproximadamente 1 a 7 días, por ejemplo, aproximadamente 7 días como una primera expansión con sensibilización; transferir los TIL a un segundo recipiente permeable a los gases y expandir el número de TIL en el segundo recipiente permeable a los gases que contiene medio celular que incluye IL-2, células presentadoras de antígeno alimentadoras 2X y OKT-3 por una duración de aproximadamente 7 a 10 días, por ejemplo, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días o aproximadamente 10 días.

En una modalidad, los TIL se expanden en recipientes permeables a los gases. Se han usado recipientes permeables a los gases para expandir TIL que usan PBMC mediante el uso de métodos, composiciones y dispositivos conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. 2005/0106717 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, los TIL se expanden en bolsas permeables a los gases. En una modalidad, los TIL se expanden mediante el uso de un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables a los gases, tales como el Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). En una modalidad, los TIL se expanden mediante el uso de un sistema de expansión celular que expande los TIL en bolsas permeables a los gases, tales como el WAVE Bioreactor System, también conocido como Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). En una modalidad, el sistema de expansión celular incluye una bolsa celular permeable a los gases con un volumen que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 100 ml, aproximadamente 200 ml, aproximadamente 300 ml, aproximadamente 400 ml, aproximadamente 500 ml, aproximadamente 600 ml, aproximadamente 700 ml, aproximadamente 800 ml, aproximadamente 900 ml, aproximadamente 1 l, aproximadamente 2 l, aproximadamente 3 l, aproximadamente 4 l, aproximadamente 5 l, aproximadamente 6 l, aproximadamente 7 l, aproximadamente 8 l, aproximadamente 9 l y aproximadamente 10 l.

En una modalidad, los TIL pueden expandirse en frascos G-Rex (disponibles comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing). Tales modalidades permiten que las poblaciones de células se expandan desde aproximadamente 5×10^5 células/cm^2 hasta

entre 10×10^6 y 30×10^6 células/cm^2. En una modalidad, esto es sin alimentación. En una modalidad, esto es sin alimentación siempre que el medio resida a una altura de aproximadamente 10 cm en el frasco G-Rex. En una modalidad, esto es sin alimentación pero con la adición de una o más citocinas. En una modalidad, la citocina puede añadirse como un bolo sin necesidad de mezclar la citocina con el medio. Dichos contenedores, dispositivos y métodos se conocen en la técnica y se han usado para expandir los TIL, e incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. US 2014/0377739A1, la publicación internacional núm. WO 2014/210036 A1, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. US 2013/0115617 A1, la publicación internacional núm. WO 2013/188427 A1, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. US 2011/0136228 A1, la patente de los EE.UU. núm. US 8,809,050 B2, la publicación internacional núm. WO 2011/072088 A2, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. US 2016/0208216 A1, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. US 2012/0244133 A1, la publicación internacional núm. WO 2012/129201 A1, la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núm. US 2013/0102075 A1, la patente de los EE.UU. núm. US 8,956,860 B2, la publicación internacional núm. WO 2013/173835 A1, la publicación de solicitud de patente los EE.UU. núm. US 2015/0175966 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Estos procesos también se describen en Jin y otros, *J. Immunotherapy,* **2012**, 35:283-292.

J. Ingeniería genética opcional de TIL

En algunas modalidades, los TIL expandidos de la presente invención se manipulan adicionalmente antes, durante o después de una etapa de expansión, incluso durante los procesos de producción estériles cerrados, cada uno como se proporciona en la presente descripción, para alterar la expresión de proteínas de manera transitoria. En algunas modalidades, la expresión de la proteína alterada transitoriamente se debe a la edición transitoria de genes. En algunas modalidades, los TIL expandidos de la presente invención se tratan con factores de transcripción (TF) y/u otras moléculas capaces de alterar transitoriamente la expresión de proteínas en los TIL. En algunas modalidades, los TF y/u otras moléculas que son capaces de alterar transitoriamente la expresión de proteínas proporcionan una expresión alterada de antígenos tumorales y/o una alteración en el número de células T específicos de antígeno tumoral en una población de TIL.

En determinadas modalidades, el método comprende editar genéticamente una población de TIL. En determinadas modalidades, el método comprende editar genéticamente la primera población de TIL, la segunda población de TIL y/o la tercera población de TIL.

En algunas modalidades, la presente invención incluye la edición genética a través de la inserción de nucleótidos, tales como la inserción de ácido ribonucleico (ARN), que incluye la inserción de ARN mensajero (ARNm) o ARN de interferencia pequeño (o corto) (ARNip), en una población de TIL para la potenciación de la expresión de una o más proteínas o la inhibición de la expresión de una o más proteínas, así como también las combinaciones simultáneas de ambas potenciaciones de un conjunto de proteínas con inhibición de otro conjunto de proteínas.

En algunas modalidades, los TIL expandidos de la presente invención sufren una alteración transitoria de la expresión de proteínas. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se produce en la población de TIL mayoritaria antes de la primera expansión, que incluye, por ejemplo, la población de TIL que se obtiene, por ejemplo, de la Etapa A como se indica en la Figura 1 (en particular, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas ocurre durante la primera expansión, que incluye, por ejemplo, en la población de TIL expandida, por ejemplo, en la Etapa B como se indica en la Figura 1 (por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas ocurre después de la primera expansión, incluida, por ejemplo, en la población de TIL en transición entre la primera y la segunda expansión (por ejemplo, la segunda población de TIL como se describe en la presente descripción), la población de TIL que se obtiene de, por ejemplo, la Etapa B e incluido en la Etapa C como se indica en la Figura 1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas ocurre en la población de TIL mayoritaria antes de la segunda expansión, incluida, por ejemplo, en la población de TIL que se obtiene de, por ejemplo, la Etapa C y antes de su expansión en la Etapa D como se indica en la Figura 1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas ocurre durante la segunda expansión, incluida, por ejemplo, en la población de TIL expandida, por ejemplo, en la Etapa D como se indica en la Figura 1 (por ejemplo, la tercera población de TIL). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se produce después de la segunda expansión, incluida, por

ejemplo, en la población de TIL que se obtiene de la expansión en, por ejemplo, la Etapa D como se indica en la Figura 1.

En una modalidad, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TIL incluye la etapa de electroporación. Los métodos de electroporación son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Tsong, *Biophys. J.* **1991,** *60,* 297-306 y en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2014/0227237 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TIL incluye la etapa de transfección con fosfato de calcio. Los métodos de transfección con fosfato de calcio (precipitación del ADN con fosfato de calcio, revestimiento de la superficie celular y endocitosis) se conocen en la técnica y se describen en Graham y van der Eb, *Virology* **1973,** *52,* 456-467; Wigler y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979,** *76,* 1373-1376; y Chen y Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* **1987,** *7,* 2745-2752; y en la Patente de EE.UU. núm. 5,593,875, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TIL incluye la etapa de transfección liposomal. Los métodos de transfección liposomal, tales como los métodos que emplean una formulación de liposomas 1:1 (p/p) del lípido catiónico cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*n*,*n*,*n*-trimetilamonio (DOTMA) y dioleoilfotidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada, son conocidos en la técnica y se describen en Rose, y otros, *Biotechniques* **1991,** *10,* 520-525 y Felgner, y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987,** *84,* 7413-7417 y en las Patentes de EE.UU. núm. 5,279,833; 5,908,635; 6,056,938; 6,110,490; 6,534,484; y 7,687,070, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para alterar transitoriamente la expresión de proteínas en una población de TIL incluye la etapa de transfección mediante el uso de métodos descritos en las patentes de los EE.UU. núm. 5,766,902, 6,025,337, 6,410,517, 6,475,994 y 7,189,705, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento de las células madre T de memoria (TSCM). Las TSCM son progenitores tempranos de las células T de memoria central que experimentan antígenos. Las TSCM generalmente muestran las capacidades de supervivencia a largo plazo, autorrenovación y multipotencia que definen las células madre, y generalmente son

convenientes para la generación de productos TIL efectivos. Las TSCM han mostrado una actividad antitumoral mejorada en comparación con otros subconjuntos de células T en modelos de ratón de transferencia de células adoptiva (Gattinoni y otros, Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri y otros, Blood 2013). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una población de TIL con una composición que comprende una alta proporción de TSCM. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de aumento en el porcentaje de TSCM. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 10 veces en las TSCM en la población de TIL. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una población de TIL con al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de TSCM. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una población de TIL terapéutica con al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de TSCM.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en el rejuvenecimiento de las células T que han contactado con antígenos. En algunas modalidades, el rejuvenecimiento incluye, por ejemplo, mayor proliferación, mayor activación de células T y/o mayor reconocimiento de antígenos.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas altera la expresión en una gran fracción de las células T para preservar el repertorio de TCR derivado de tumores. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas no altera el repertorio de TCR derivado de tumores. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas mantiene el repertorio de TCR derivado de tumores.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la proteína resulta en la expresión alterada de un gen particular. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a un gen que incluye, entre otros, PD-1 (también denominado PDCD1 o CC279), TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (receptores coestimuladores quiméricos), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGFβ, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP -1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 y/o proteína quinasa A de AMPc (PKA). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a un gen que se selecciona del grupo que consiste en PD-1, TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (receptores coestimuladores quiméricos), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGFβ, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP- 1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 y/o proteína quinasa A de AMPc (PKA). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a PD-1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a TGFBR2. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCR4/5. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CBLB. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CISH. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a los CCR (receptores coestimuladores quiméricos). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a IL-2. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a IL-12. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a IL-15. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a IL-21. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a NOTCH 1/2 ICD. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a TIM3. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a LAG3. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a TIGIT. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige al TGFβ. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCR1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCR2. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de

proteínas se dirige a CCR4. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCR5. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CXCR1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CXCR2. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CSCR3. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCL2 (MCP-1). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCL3 (MIP-1α). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCL4 (MIP1-β). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCL5 (RANTES). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CXCL1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CXCL8. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCL22. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CCL17. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a VHL. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a CD44. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a PIK3CD. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a SOCS1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se dirige a la proteína quinasa A de AMPc (PKA).

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de un receptor de quimiocina. En algunas modalidades, el receptor de quimiocina que se sobreexpresa por la expresión transitoria de proteínas incluye un receptor con un ligando que incluye, entre otros, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22 y/o CCL17.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una disminución y/o una expresión reducida de PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβR2 y/o TGFβ (que incluye el resultado en, por ejemplo, el bloqueo de la vía TGFβ). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una disminución y/o una expresión reducida de CBLB (CBL-B). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una disminución y/o una expresión reducida de CISH.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de los receptores de quimiocinas para, por ejemplo, mejorar el tráfico o el movimiento de TIL hacia el sitio del tumor. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de un CCR (receptor coestimulador quimérico). En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de un receptor de quimiocina que se selecciona del grupo que consiste en CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 y/o CSCR3.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de una interleucina. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de una interleucina que se seleccionan del grupo que consiste en IL-2, IL-12, IL-15 y/o IL-21.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de NOTCH 1/2 ICD. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de VHL. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de CD44. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de PIK3CD. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en un aumento y/o una sobreexpresión de SOCS1,

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de la proteína quinasa A de AMPc (PKA).

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de una molécula que se selecciona del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) y las combinaciones de estas. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de dos moléculas que se seleccionan del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) y las combinaciones de estas. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y una molécula que se selecciona del grupo que consiste en LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF

(BR3) y las combinaciones de estas. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3 y las combinaciones de estas. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y uno de LAG3, CISH, CBLB, TIM3 y las combinaciones de estas. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y LAG3. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y CISH. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de PD-1 y CBLB. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de LAG3 y CISH. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de LAG3 y CBLB. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de CISH y CBLB. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y PD-1. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y LAG3. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y CISH. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de TIM3 y CBLB.

En algunas modalidades, una molécula de adhesión que se selecciona del grupo que consiste en CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 y las combinaciones de estas, se inserta mediante un método gammaretroviral o lentiviral en la primera población de TIL, segunda población de TIL, o la población cosechada de TIL (por ejemplo, aumenta la expresión de la molécula de adhesión).

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una expresión disminuida y/o reducida de una molécula que se selecciona del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) y las combinaciones de estas, y la expresión aumentada y/o mejorada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 y las combinaciones de estas. En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas resulta en una

expresión disminuida y/o reducida de una molécula que se selecciona del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CISH, CBLB y las combinaciones de estas, y la expresión aumentada y/o mejorada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 y las combinaciones de estas.

En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 85 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 99 %.

En algunas modalidades, hay una disminución en la expresión de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %,

aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 85 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay un aumento en la expresión de al menos aproximadamente 99 %.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de proteínas se induce mediante el tratamiento de los TIL con factores de transcripción (TF) y/u otras moléculas capaces de alterar transitoriamente la expresión de proteínas en los TIL. En algunas modalidades, la plataforma microfluídica libre de vector SQZ se emplea para el suministro intracelular de los factores de transcripción (TF) y/u otras moléculas capaces de alterar transitoriamente la expresión de proteínas. Se ha descrito estos métodos que demuestran la capacidad de suministrar las proteínas, que incluyen los factores de transcripción, a una variedad de células humanas primarias, que incluyen las células T (Sharei y otros, PNAS 2013, así como también Sharei y otros, PLOS ONE 2015 y Greisbeck y otros, J. Immunology vol. 195, 2015); ver, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional núms. WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 y WO 2017/123663A1, las cuales se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad. Los métodos descritos en las publicaciones de patente internacional núms. WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 y WO 2017/123663A1 pueden emplearse con la presente invención para exponer una población de TIL a factores de transcripción (TF) y/u otras moléculas capaces de inducir la expresión transitoria de proteínas, en donde dichos TF y/u otras moléculas capaces de inducir la expresión transitoria de proteínas proporcionan una mayor expresión de antígenos tumorales y/o un aumento en el número de células T específicas de antígenos tumorales en la población de TIL, lo que resulta en la reprogramación de la población de TIL y un aumento en la eficacia terapéutica de la población de TIL reprogramada en comparación

con una población de TIL no reprogramada. En algunas modalidades, la reprogramación resulta en una subpoblación aumentada de células T efectoras y/o células T de memoria central con respecto a la población inicial o anterior (es decir, antes de la reprogramación) de la población de TIL, como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el factor de transcripción (TF) incluye pero no se limita a TCF-1, NOTCH 1/2 ICD y/o MYB. En algunas modalidades, el factor de transcripción (TF) es TCF-1. En algunas modalidades, el factor de transcripción (TF) es NOTCH 1/2 ICD. En algunas modalidades, el factor de transcripción (TF) es MYB. En algunas modalidades, el factor de transcripción (TF) se administra con cultivo de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), tales como el sustituto de suero KNOCKOUT disponible comercialmente (Gibco/ThermoFisher), para inducir una reprogramación adicional de TIL. En algunas modalidades, el factor de transcripción (TF) se administra con un cóctel de iPSC para inducir una reprogramación adicional de TIL. En algunas modalidades, el factor de transcripción (TF) se administra sin un cóctel de iPSC. En algunas modalidades, la reprogramación resulta en un aumento en el porcentaje de TSCM. En algunas modalidades, la reprogramación resulta en un aumento en el porcentaje de TSCM de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % de TSCM.

En algunas modalidades, un método de alteración transitoria de la expresión de proteínas, como se describe anteriormente, puede combinarse con un método de modificación genética de una población de TIL que incluye la etapa de incorporación estable de genes para la producción de una o más proteínas. En determinadas modalidades, el método comprende una etapa de modificar genéticamente una población de TIL. En determinadas modalidades, el método comprende modificar genéticamente la primera población de TIL, la segunda población de TIL y/o la tercera población de TIL. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transducción retroviral. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transducción lentiviral. Los sistemas de transducción lentivirales son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Levine, y otros*, Proc. Nat'l Acad. Sci.* **2006,** *103,*

17372-77; Zufferey, y otros*, Nat. Biotechnol.* **1997,** *15,* 871-75; Dull, y otros, *J. Virology* **1998,** *72*, 8463-71, y la Patente de EE.UU. núm. 6,627,442, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transducción gamma-retroviral. Los sistemas de transducción gamma-retrovirales son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Cepko y Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* **1996,** 9.9.1-9.9.16, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transferencia de genes mediada por transposones. Los sistemas de transferencia de genes mediados por transposones son conocidos en la técnica e incluyen sistemas en los que la transposasa se proporciona como vector de expresión de ADN o como un ARN expresable o una proteína de tal manera que la expresión a largo plazo de la transposasa no ocurre en las células transgénicas, por ejemplo, una transposasa proporcionada como un ARNm (por ejemplo, un ARNm que comprende una caperuza y una cola poli-A). Los sistemas adecuados de transferencia de genes mediados por transposones, que incluye la transposasa tipo Tel de tipo salmónido (SB o transposasa de la Bella Durmiente), tal como SB10, SB11 y SB100x, y enzimas modificadas genéticamente con actividad enzimática aumentada, se describen en, por ejemplo, Hackett, y otros, *Mol. Therapy* **2010,** *18,* 674-83 y en la Patente de EE.UU. núm. 6,489,458, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, la alteración transitoria de la expresión de la proteína es una reducción en la expresión inducida por la interferencia de ARN autoadministrable (sdARN), que es un dúplex de ARNip asimétrico sintetizado químicamente con un alto porcentaje de sustituciones 2'-OH (típicamente flúor o -OCH_3) que comprende una hebra antisentido (guía) de 20 nucleótidos y una hebra con sentido (pasajero) de 13 a 15 bases conjugada con colesterol en su extremo 3' mediante el uso de un enlazador de tetraetilenglicol (TEG). En algunas modalidades, el método comprende la alteración transitoria de la expresión de proteínas en una población de TIL, que comprende el uso de interferencia de ARN autoadministrable (sdARN), que es un dúplex de ARNip asimétrico sintetizado químicamente con un alto porcentaje de sustituciones 2'-OH (típicamente flúor o -$OCH_{3)}$ que comprende una hebra antisentido (guía) de 20 nucleótidos y una hebra con sentido (pasajero) de 13 a 15 bases conjugada con colesterol en su extremo 3' mediante el uso de un enlazador de tetraetilenglicol (TEG). Los métodos que usan sdARN se han descrito en Khvorova y Watts, *Nat. Biotechnol.*

2017, *35,* 238–248; Byrne y otros, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2013,** *29,* 855-864; y Ligtenberg y otros, *Mol. Therapy,* **2018,** en prensa, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, la administración de sdARN a una población de TIL se logra sin el uso de la electroporación, SQZ u otros métodos, en su lugar se usa un período de 1 a 3 días en el que una población de TIL se expone a sdARN a una concentración de 1 µM/10 000 TIL en el medio. En determinadas modalidades, el método comprende administrar sdARN a una población de TIL que comprende exponer la población de TIL a sdARN a una concentración de 1 µM/10 000 TIL en el medio durante un período de entre 1 y 3 días. En una modalidad, la administración de sdARN a una población de TIL se logra mediante el uso de un período de 1 a 3 días en el que una población de TIL se expone a sdARN a una concentración de 10 µM/10 000 TIL en el medio. En una modalidad, la administración de sdARN a una población de TIL se logra mediante el uso de un período de 1 a 3 días en el que una población de TIL se expone a sdARN a una concentración de 50 µM/10 000 TIL en el medio. En una modalidad, la administración de sdARN a una población de TIL se logra mediante el uso de un período de 1 a 3 días en el que una población de TIL se expone a sdARN a una concentración de entre 0,1 µM/10 000 TIL y 50 µM/10 000 TIL en el medio. En una modalidad, la administración de sdARN a una población de TIL se logra mediante el uso de un período de 1 a 3 días en el que una población de TIL se expone a sdARN a una concentración de entre 0,1 µM/10 000 TIL y 50 µM/10 000 TIL en el medio, en donde la exposición al sdARN se realiza dos, tres, cuatro o cinco veces mediante la adición de sdARN recién preparado al medio. Otros procesos adecuados se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. núms. US 2011/0039914 A1, US 2013/0131141 A1 y US 2013/0131142 A1, y la patente de los EE.UU. núm. 9,080,171, cuyas descripciones se incorporan como referencia en la presente descripción.

En algunas modalidades, el sdARN se inserta en una población de TIL durante la producción. En algunas modalidades, el sdARN codifica el ARN que interfiere con NOTCH 1/2 ICD, PD-1, CTLA-4 TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβ, TGFBR2, proteína quinasa A de AMPc (PKA), BAFF BR3, CISH y/o CBLB. En algunas modalidades, la reducción en la expresión se determina en función de un porcentaje de silenciamiento génico, por ejemplo, según se evalúa mediante citometría de flujo y/o qPCR. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %,

aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 85 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 90 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, hay una reducción en la expresión de al menos aproximadamente 99 %.

La tecnología de ARNi autoadministrable basada en la modificación química de ARNip puede emplearse con los métodos de la presente invención para administrar con éxito los sdARN a los TIL como se describe en la presente descripción. La combinación de las modificaciones de la cadena principal con estructura asimétrica de ARNip y un ligando hidrófobo (ver, por ejemplo, Ligtenberg y otros, *Mol. Therapy,* **2018** y el documento núm. US20160304873) permite que los sdARN penetren en células de mamíferos cultivadas sin formulaciones y métodos adicionales mediante una simple adición a los medios de cultivo, que aprovecha la estabilidad nucleasa de los sdARN. Esta estabilidad permite el apoyo de niveles constantes de la reducción de la actividad del gen diana mediada por ARNi simplemente al mantener la concentración activa de sdARN en el medio. Aunque no está limitado por la teoría, la estabilización de la cadena principal del sdARN proporciona una reducción prolongada en los efectos de la expresión génica que pueden durar meses en las células que no se dividen.

En algunas modalidades, se produce una eficacia de transfección de más del 95 % de los TIL y una reducción en la expresión de la diana por varios sdARN específicos. En

algunas modalidades, los sdARN que contienen varios residuos de ribosa sin modificar se sustituyeron con secuencias completamente modificadas para aumentar la potencia y/o la longevidad del efecto de ARNi. En algunas modalidades, se mantiene una reducción en el efecto de la expresión durante 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 5 días, 6 días, 7 días u 8 días o más. En algunas modalidades, la reducción en el efecto de la expresión disminuye a los 10 días o más después del tratamiento con sdARN de los TIL. En algunas modalidades, se mantiene una reducción de más del 70 % en la expresión de la expresión diana. En algunas modalidades, en los TIL se mantiene una reducción de más del 70 % en la expresión de la expresión diana. En algunas modalidades, una reducción en la expresión en la vía PD-1/PD-L1 permite que los TIL exhiban un efecto *in vivo* más potente, que en algunas modalidades, debido a que se evitan los efectos supresores de la vía PD-1/PD-L1. En algunas modalidades, una reducción en la expresión de PD-1 por sdARN resulta en un aumento de la proliferación de los TIL.

El ARN de interferencia pequeño (ARNip), a veces conocido como ARN interferente corto o ARN silenciador, es una molécula de ARN bicatenaria, generalmente de 19-25 pares de bases de longitud. El ARNip se usa en la interferencia de ARN (ARNi), donde interfiere con la expresión de genes específicos con secuencias de nucleótidos complementarias.

El ADN bicatenario (dsARN) puede usarse generalmente para definir cualquier molécula que comprenda un par de hebras complementarias de ARN, generalmente hebras con sentido (pasajera) y antisentido (guía), y puede incluir regiones salientes monocatenarias. El término dsARN, en contraste con siARN, generalmente se refiere a una molécula precursora que incluye la secuencia de una molécula de siARN que se libera de la molécula de dsARN más grande por la acción de sistemas enzimáticos de escisión, que incluyen Dicer.

Los sdARN (ARN autosuministrable) son una nueva clase de compuestos de ARNi modificados covalentemente que no requieren un vehículo de suministro para ingresar a las células y tienen una farmacología mejorada en comparación con los siARN tradicionales. El "ARN autosuministrable" o "sdARN" es un híbrido antisentido de ARN de interferencia modificado de forma hidrófoba, que ha demostrado ser altamente eficaz *in vitro* en células primarias e *in vivo* tras la administración local. Se ha demostrado una fuerte absorción y/o silenciamiento sin toxicidad. Los sdARN son generalmente moléculas asimétricas de ácido nucleico modificadas químicamente con regiones

bicatenarias mínimas. Las moléculas de sdARN contienen típicamente regiones monocatenarias y regiones bicatenarias, y pueden contener una variedad de modificaciones químicas dentro de las regiones monocatenarias y bicatenarias de la molécula. Además, las moléculas de sdARN pueden unirse a un conjugado hidrófobo tal como una molécula de tipo esterol avanzada y convencional, como se describe en la presente descripción. Los sdARN y los métodos asociados para producir tales sdARN también se han descrito ampliamente en, por ejemplo, los documentos US20160304873, WO2010033246, WO2017070151, WO2009102427, WO2011119887, WO2010033247A2, WO2009045457, WO2011119852, todos los cuales se incorporan en su totalidad como referencia en la presente descripción. Para optimizar la estructura del sdARN, la química, la posición de direccionamiento, las preferencias de secuencia y similares, se ha desarrollado y utilizado un algoritmo patentado para la predicción de la potencia del sdARN (véase, por ejemplo, el documento US 20160304873). Con base en estos análisis, las secuencias de sdARN funcionales se han definido generalmente como que tienen una reducción de la expresión de más del 70 % a una concentración de 1 µM, con una probabilidad de más del 40 %.

En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción del 70 % en la expresión del gen diana. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción del 75 % en la expresión del gen diana.

En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción del 80 % en la expresión del gen diana. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción del 85 % en la expresión del gen diana. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción del 90 % en la expresión del gen diana. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción del 95 % en la expresión del gen diana. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción del 99 % en la expresión del gen diana. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 0,25 µM a aproximadamente 4 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de

aproximadamente 0,25 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 0,5 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 0,75 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 1,0 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 1,25 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 1,5 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 1,75 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 2,0 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 2,25 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 2,5 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 2,75 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 3,0 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 3,25 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 3,5 µM. En algunas modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se suministran a una concentración de aproximadamente 3,75 µM. En algunas

modalidades, las secuencias de sdARN usadas en la invención exhiben una reducción en la expresión del gen diana cuando se administran a una concentración de aproximadamente 4,0 µM.

En algunas modalidades, los agentes oligonucleotídicos comprenden una o más modificaciones para aumentar la estabilidad y/o la efectividad del agente terapéutico y para efectuar el suministro eficaz del oligonucleótido a las células o tejido a tratar. Tales modificaciones pueden incluir una modificación 2'-O-metilo, una modificación 2'-O-fluro, una modificación difosforotioato, un nucleótido modificado 2 'F, un nucleótido modificado con 2'-O-metilo y/o un 2'desoxi. En algunas modalidades, el oligonucleótido se modifica para incluir una o más modificaciones hidrófobas, que incluyen, por ejemplo, esterol, colesterol, vitamina D, naftilo, isobutilo, bencilo, indol, triptófano y/o fenilo. En una modalidad particular adicional, los nucleótidos químicamente modificados son una combinación de fosforotioatos, 2'-O-metilo, 2'desoxi, modificaciones hidrófobas y fosforotioatos. En algunas modalidades, los azúcares pueden modificarse y los azúcares modificados pueden incluir, pero no se limitan a, D-ribosa, 2'-O-alquilo (que incluye el 2'-O-metilo y el 2'-O-etilo), es decir, 2'-alcoxi, 2'-amino, 2'-S-alquilo, 2'-halo (que incluye el 2'-fluoro), T-metoxietoxi, 2'-aliloxi ($-OCH_2CH=CH_2$), 2'-propargilo, 2'-propilo, etinilo, etenilo, propenilo y ciano y similares. En una modalidad, la porción de azúcar puede ser una hexosa e incorporarse en un oligonucleótido como se describe (Augustyns, K., y otros, Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)).

En algunas modalidades, el oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en toda su longitud, es decir, sin secuencia monocatenaria saliente en ninguno de los extremos de la molécula, es decir, tiene extremos romos. En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico individuales pueden tener diferentes longitudes. En otras palabras, un oligonucleótido bicatenario de la invención no es bicatenario en toda su longitud. Por ejemplo, cuando se usan dos moléculas de ácido nucleico separadas, una de las moléculas, por ejemplo, la primera molécula que comprende una secuencia antisentido, puede ser más larga que la segunda molécula que hibrida con ella (lo que deja una porción de la molécula monocatenaria). En algunas modalidades, cuando se usa una única molécula de ácido nucleico, una porción de la molécula en cada extremo puede permanecer monocatenaria.

En algunas modalidades, un oligonucleótido bicatenario de la invención contiene errores de apareamiento y/o bucles o protuberancias, pero es bicatenario en al menos aproximadamente el 70 % de la longitud del oligonucleótido. En algunas modalidades,

un oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en al menos aproximadamente el 80 % de la longitud del oligonucleótido. En otra modalidad, un oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en al menos aproximadamente 90 %-95 % de la longitud del oligonucleótido. En algunas modalidades, un oligonucleótido bicatenario de la invención es bicatenario en al menos aproximadamente el 96 %-98 % de la longitud del oligonucleótido. En algunas modalidades, el oligonucleótido bicatenario de la invención contiene al menos o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 errores de apareamiento.

En algunas modalidades, el oligonucleótido puede protegerse sustancialmente de nucleasas, por ejemplo, mediante la modificación de los enlaces 3' o 5' (por ejemplo, la Patente de EE.UU. núm. 5,849,902 y el documento WO 98/13526). Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden hacerse resistentes mediante la inclusión de un "grupo de bloqueo". El término "grupo de bloqueo", como se usa en la presente descripción, se refiere a sustituyentes (por ejemplo, distintos de los grupos OH) que pueden unirse a oligonucleótidos o nucleomonómeros, ya sea como grupos protectores o grupos de acoplamiento para síntesis (por ejemplo, FITC, propil (CH_2-CH_2-CH_3), glicol (-O-CH_2-CH_2-O-) fosfato (PO_3^{2-}), hidrogenofosfonato o fosforamidita). Los "grupos de bloqueo" también pueden incluir "grupos de bloqueo de extremos" o "grupos de bloqueo de exonucleasas" que protegen los extremos 5' y 3' del oligonucleótido, que incluyen los nucleótidos modificados y estructuras resistentes a exonucleasas no nucleotídicas.

En algunas modalidades, al menos una parte de los polinucleótidos contiguos dentro del sdARN están unidos por un enlace sustituto, por ejemplo, un enlace fosforotioato.

En algunas modalidades, la modificación química puede conducir a al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 mejoras en la captación celular. En algunas modalidades, al menos uno de los residuos C o U incluye una modificación hidrófoba. En algunas modalidades, una pluralidad de C y U contienen una modificación hidrófoba. En algunas modalidades, al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 % 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o al menos 95 % de C y U pueden contener una modificación hidrófoba. En algunas modalidades, todas las C y U contienen una modificación hidrófoba.

En algunas modalidades, el sdARN o los sd-rxARN exhiben una liberación endosómica mejorada de moléculas de sd-rxARN a través de la incorporación de aminas

protonables. En algunas modalidades, se incorporan aminas protonables en la hebra sentido (en la parte de la molécula que se descarta después de la carga de RISC). En algunas modalidades, los compuestos de sdARN de la invención comprenden un compuesto asimétrico que comprende una región dúplex (necesaria para la entrada eficiente del RISC de 10-15 bases de longitud) y una región monocatenaria de 4-12 nucleótidos de longitud; con un dúplex de 13 nucleótidos. En algunas modalidades, se emplea una región monocatenaria de 6 nucleótidos. En algunas modalidades, la región monocatenaria del sdARN comprende de 2-12 enlaces internucleotídicos de fosforotioato (a los que se hace referencia como modificaciones de fosforotioato). En algunas modalidades, se emplean de 6-8 enlaces internucleotídicos de fosforotioato. En algunas modalidades, los compuestos de sdARN de la invención también incluyen un patrón de modificación química único, que proporciona estabilidad y es compatible con la entrada del RISC.

La hebra guía, por ejemplo, también puede modificarse mediante cualquier modificación química que confirme la estabilidad sin interferir con la entrada del RISC. En algunas modalidades, el patrón de modificación química en la hebra guía incluye que la mayoría de los nucleótidos C y U están modificados en 2' F y el extremo 5' está fosforilado.

En algunas modalidades, al menos el 30 % de los nucleótidos en el sdARN o el sd-rxARN están modificados. En algunas modalidades, al menos 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de los nucleótidos en el sdARN o el sd-rxARN están modificados. En algunas modalidades, el 100% de los nucleótidos en el sdARN o el sd-rxARN están modificados.

En algunas modalidades, las moléculas de sdARN tienen regiones bicatenarias mínimas. En algunas modalidades, la región de la molécula que es bicatenaria varía en el intervalo de 8-15 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la región de la molécula que es bicatenaria tiene una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En algunas modalidades, la región bicatenaria tiene 13 nucleótidos de longitud. Puede haber una complementariedad del 100 % entre las hebras guía y pasajera, o puede haber uno o más desajustes entre las hebras guía y pasajera. En algunas modalidades, en un extremo de la molécula bicatenaria, la molécula tiene

extremos romos o tiene un saliente de un nucleótido. En algunas modalidades, la región monocatenaria de la molécula tiene entre 4-12 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la región monocatenaria puede tener una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos. En algunas modalidades, la región monocatenaria también puede tener menos de 4 o más de 12 nucleótidos de longitud. En determinadas modalidades, la región monocatenaria tiene una longitud de 6 o 7 nucleótidos.

En algunas modalidades, las moléculas de sdARN tienen mayor estabilidad. En algunos casos, una molécula de sdARN o de sd-rxARN químicamente modificada tiene una vida media en el medio que es más larga que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más de 24 horas, que incluyen los valores intermedios. En algunas modalidades, el sd-rxARN tiene una vida media en el medio superior a 12 horas.

En algunas modalidades, el sdARN se optimiza para una potencia aumentada y/o una toxicidad reducida. En algunas modalidades, la longitud de nucleótidos de la hebra guía y/o pasajera, y/o el número de modificaciones de fosforotioato en la hebra guía y/o pasajera, pueden en algunos aspectos influir en la potencia de la molécula de ARN, mientras que el reemplazo de las modificaciones de 2'-fluoro (2'F) con las modificaciones 2'-O-metil (2'OMe) puede influir en algunos aspectos en la toxicidad de la molécula. En algunas modalidades, se predice que la reducción en el contenido de 2'F de una molécula reduce la toxicidad de la molécula. En algunas modalidades, el número de modificaciones de fosforotioato en una molécula de ARN puede influir en la captación de la molécula en una célula, por ejemplo, en la eficacia de la captación pasiva de la molécula en una célula. En algunas modalidades, el sdARN no tiene modificación 2'F y, sin embargo, se caracteriza por la misma eficacia en la captación celular y la penetración en los tejidos.

En algunas modalidades, una hebra guía tiene aproximadamente 18-19 nucleótidos de longitud y tiene aproximadamente 2-14 modificaciones de fosfato. Por ejemplo, una hebra guía puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más de 14 nucleótidos que están modificados con fosfato. La hebra guía puede contener una o más modificaciones que confieren una mayor estabilidad sin interferir con la entrada del RISC. Los nucleótidos modificados con fosfato, tales como los nucleótidos modificados con fosforotioato, pueden estar en el extremo 3', en el extremo 5' o esparcidos por toda la hebra guía. En algunas modalidades, los 10 nucleótidos terminales 3' de la hebra guía contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos modificados con fosforotioato. La hebra

guía también puede contener modificaciones 2'F y/o 2'OMe, que pueden localizarse en toda la molécula. En algunas modalidades, el nucleótido en la posición uno de la hebra guía (el nucleótido en la posición más 5' de la hebra guía) está modificado con 2'OMe y/o fosforilado. Los nucleótidos C y U dentro de la hebra guía pueden modificarse con 2'F. Por ejemplo, los nucleótidos C y U en las posiciones 2-10 de una hebra guía de 19 nt (o posiciones correspondientes en una hebra guía de diferente longitud) pueden modificarse con 2'F. Los nucleótidos C y U dentro de la hebra guía también pueden modificarse con 2'OMe. Por ejemplo, los nucleótidos C y U en las posiciones 11-18 de una hebra guía de 19 nt (o posiciones correspondientes en una hebra guía de una longitud diferente) pueden modificarse con 2'OMe. En algunas modalidades, el nucleótido al final del extremo 3' de la hebra guía no está modificado. En determinadas modalidades, la mayoría de C y U dentro de la hebra guía están modificados con 2'F y el extremo 5' de la hebra guía está fosforilado. En otras modalidades, la posición 1 y las C o U en las posiciones 11-18 están modificadas con 2'OMe y el extremo 5' de la hebra guía está fosforilado. En otras modalidades, la posición 1 y las C o U en las posiciones 11-18 están modificadas con 2'OMe, el extremo 5' de la hebra guía está fosforilado y las C o U en la posición 2-10 están modificadas con 2'F.

La tecnología de ARNi autosuministrable proporciona un método de transfección directa de las células con el agente de ARNi, sin necesidad de formulaciones o técnicas adicionales. La capacidad de transfectar líneas celulares difíciles de transfectar, la alta actividad *in vivo* y la simplicidad de uso son características de las composiciones y métodos que presentan ventajas funcionales significativas sobre las técnicas tradicionales basadas en siARN y, como tal, se emplean los métodos de sdARN en varias modalidades relacionadas con los métodos de reducción de la expresión del gen diana en los TIL de la presente invención. Los métodos de sdARNi permiten el suministro directo de compuestos sintetizados químicamente a una amplia gama de células y tejidos primarios, tanto *ex vivo* como *in vivo*. Los sdARN descritos en algunas modalidades de la invención de la presente descripción están disponibles comercialmente en Advirna LLC, Worcester, MA, EE.UU.

Los sdARN se forman como estructuras híbridas de oligonucleótidos antisentido-siARN modificados de forma hidrófoba, y se describen, por ejemplo, en Byrne y otros, diciembre de 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10):855-864, incorporado como referencia en la presente descripción en su totalidad.

En algunas modalidades, los oligonucleótidos de sdARN pueden suministrarse a los TIL descritos en la presente descripción mediante el uso de electroporación estéril. En determinadas modalidades, el método comprende la electroporación estéril de una población de TIL para suministrar oligonucleótidos de sdARN.

En algunas modalidades, los oligonucleótidos pueden suministrarse a las células en combinación con un sistema de suministro transmembrana. En algunas modalidades, este sistema de suministro transmembrana comprende lípidos, vectores virales y similares. En algunas modalidades, el agente oligonucleotídico es un agente de ARNi autosuministrable, que no requiere ningún agente de suministro. En determinadas modalidades, el método comprende el uso de un sistema de suministro transmembrana para suministrar oligonucleótidos de sdARN a una población de TIL.

Los oligonucleótidos y las composiciones de oligonucleótidos se ponen en contacto con (por ejemplo, entran en contacto, también denominado en la presente descripción como se administran o suministran) y son absorbidos por los TIL descritos en la presente descripción, que incluye la captación pasiva por los TIL. El sdARN puede añadirse a los TIL como se describe en la presente descripción durante la primera expansión, por ejemplo, en la Etapa B, después de la primera expansión, por ejemplo, durante la Etapa C, antes o durante la segunda expansión, por ejemplo, antes o durante la Etapa D, después de la Etapa D y antes de la cosecha en la Etapa E, durante o después de la cosecha en la Etapa F, antes o durante la formulación final y/o transferencia a la bolsa de infusión en la Etapa F, así como también antes de cualquier etapa de crioconservación opcional en la Etapa F. Además, puede añadirse el sdARN después de descongelar de cualquier etapa de crioconservación en la Etapa F. En una modalidad, uno o más sdARN que se dirigen a genes como se describe en la presente descripción, que incluyen PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH y CBLB, pueden añadirse a los medios de cultivo celular que comprenden TIL y otros agentes a concentraciones seleccionadas del grupo que consiste en 100 nM a 20 mM, 200 nM a 10 mM, 500 nm a 1 mM, 1 µM a 100 µM y 1 µM a 100 µM. En una modalidad, uno o más sdARN que se dirigen a genes como se describe en la presente descripción, que incluyen PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH y CBLB, pueden añadirse a los medios de cultivo celular que comprenden TIL y otros agentes en cantidades seleccionadas del grupo que consiste en sdARN 0,1 µM/10 000 TIL/100 µl de medio, 0,5 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl de medio, 0,75 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl de medio, 1 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl de medio, 1,25 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl de medio, 1,5 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl

de medio, 2 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl de medio, 5 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl de medio o 10 µM sdARN/10 000 TIL/100 µl de medio. En una modalidad, uno o más sdARN que se dirigen a genes como se describe en la presente descripción, que incluyen PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH y CBLB, pueden añadirse a los cultivos de TIL durante las etapas pre-REP o REP dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días o cada siete días.

Las composiciones de oligonucleótidos de la invención, que incluyen el sdARN, pueden ponerse en contacto con TIL como se describe en la presente descripción durante el proceso de expansión, por ejemplo, mediante la disolución del sdARN a altas concentraciones en medios de cultivo celular y permitir tiempo suficiente para que se produzca la captación pasiva. En determinadas modalidades, el método de la presente invención comprende poner en contacto una población de TIL con una composición de oligonucleótidos como se describe en la presente descripción. En determinadas modalidades, el método comprende disolver un oligonucleótido, por ejemplo, sdARN en un medio de cultivo celular y poner en contacto el medio de cultivo celular con una población de TIL. Los TIL pueden ser una primera población, una segunda población y/o una tercera población como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el suministro de oligonucleótidos a las células puede mejorarse mediante métodos adecuados reconocidos en la técnica que incluyen fosfato de calcio, DMSO, glicerol o dextrano, electroporación o mediante transfección, por ejemplo, mediante el uso de las composiciones de lípidos catiónicos, aniónicos o neutros o liposomas mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; la Patente de EE.UU. núm. 4,897,355; Bergan y otros 1993. Nucleic Acids Research. 21:3567).

En algunas modalidades, se usa más de un sdARN para reducir la expresión de un gen diana. En algunas modalidades, uno o más de los sdARN dirigidos a PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 y/o CISH se usan juntos. En algunas modalidades, se usa un sdARN de PD-1 con uno o más de TIM-3, CBLB, LAG3 y/o CISH para reducir la expresión de más de un gen diana. En algunas modalidades, se usa un sdARN de LAG3 en combinación con un sdARN dirigido a CISH para reducir la expresión génica de ambas dianas. En algunas modalidades, los sdARN que se dirigen a uno o más de PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 y/o CISH en la presente descripción están disponibles comercialmente en Advirna LLC, Worcester, MA, EE.UU.

En algunas modalidades, el sdARN se dirige a un gen seleccionado del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) y combinaciones de estos. En algunas modalidades, el sdARN se dirige a un gen seleccionado del grupo que consiste en PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) y combinaciones de estos. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a PD-1 y otro sdARN se dirige a un gen seleccionado del grupo que consiste en LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) y combinaciones de estos. En algunas modalidades, el sdARN se dirige a un gen seleccionado de PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3 y combinaciones de estos. En algunas modalidades, el sdARN se dirige a un gen seleccionado de PD-1 y uno de LAG3, CISH, CBLB, TIM3 y combinaciones de estos. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a PD-1 y un sdARN se dirige a LAG3. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a PD-1 y un sdARN se dirige a CISH. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a PD-1 y un sdARN se dirige a CBLB. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a LAG3 y un sdARN se dirige a CISH. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a LAG3 y un sdARN se dirige a CBLB. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a CISH y un sdARN se dirige a CBLB. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a TIM3 y un sdARN se dirige a PD-1. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a TIM3 y un sdARN se dirige a LAG3. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a TIM3 y un sdARN se dirige a CISH. En algunas modalidades, un sdARN se dirige a TIM3 y un sdARN se dirige a CBLB.

Como se discutió anteriormente, las modalidades de la presente invención proporcionan linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que se han modificado genéticamente mediante edición de genes para mejorar su efecto terapéutico. Las modalidades de la presente invención abarcan la edición genética mediante la inserción de nucleótidos (ARN o ADN) en una población de TIL tanto para la promoción de la expresión de una o más proteínas como para la inhibición de la expresión de una o más proteínas, así como también combinaciones de estos. Las modalidades de la presente invención también proporcionan métodos para expandir los TIL en una población terapéutica, en donde los métodos comprenden la edición de genes de los TIL. Existen varias tecnologías de edición de genes que pueden usarse para modificar genéticamente una población de TIL, que son adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención.

En algunas modalidades, el método comprende un método para modificar genéticamente una población de TIL que incluye la etapa de incorporación estable de

genes para la producción de una o más proteínas. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transducción retroviral. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transducción lentiviral. Los sistemas de transducción lentivirales son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Levine, y otros*, Proc. Nat'l Acad. Sci.* **2006,** *103,* 17372-77; Zufferey, y otros*, Nat. Biotechnol.* **1997,** *15,* 871-75; Dull, y otros, *J. Virology* **1998,** *72*, 8463-71, y la Patente de EE.UU. núm. 6,627,442, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transducción gamma-retroviral. Los sistemas de transducción gamma-retrovirales son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Cepko y Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* **1996,** 9.9.1-9.9.16, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transferencia de genes mediada por transposones. Los sistemas de transferencia de genes mediados por transposones son conocidos en la técnica e incluyen sistemas en los que la transposasa se proporciona como vector de expresión de ADN o como un ARN expresable o una proteína de tal manera que la expresión a largo plazo de la transposasa no ocurre en las células transgénicas, por ejemplo, una transposasa proporcionada como un ARNm (por ejemplo, un ARNm que comprende una caperuza y una cola poli-A). Los sistemas adecuados de transferencia de genes mediados por transposones, que incluye la transposasa tipo Tel de tipo salmónido (SB o transposasa de la Bella Durmiente), tal como SB10, SB11 y SB100x, y enzimas modificadas genéticamente con actividad enzimática aumentada, se describen en, por ejemplo, Hackett, y otros, *Mol. Therapy* **2010,** *18,* 674-83 y en la Patente de EE.UU. núm. 6,489,458, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia.

En una modalidad, el método comprende un método para modificar genéticamente una población de TIL, por ejemplo, una primera población, una segunda población y/o una tercera población como se describe en la presente descripción. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de incorporación estable de genes para la producción o inhibición (por ejemplo, silenciamiento) de una o más proteínas. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de electroporación. Los métodos de electroporación son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Tsong, *Biophys. J.* **1991,** *60,* 297-306 y en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU.

núm. 2014/0227237 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Otros métodos de electroporación conocidos en la técnica, tales como los descritos en las Patentes de EE.UU. núm. 5,019,034; 5,128,257; 5,137,817; 5,173,158; 5,232,856; 5,273,525; 5,304,120; 5,318,514; 6,010,613 y 6,078,490, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, el método de electroporación es un método de electroporación estéril. En una modalidad, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada. En una modalidad, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar los TIL con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular o causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales en los TIL, que comprende la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de DC únicos, controlados por el operador y programados independientemente, que tienen intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TIL, en donde la secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de DC tiene una, dos o tres de las siguientes características: (1) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en la amplitud del pulso; (2) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en el ancho del pulso; y (3) un primer intervalo de pulsos para un primer conjunto de dos de los al menos tres pulsos es diferente de un segundo intervalo de pulsos para un segundo conjunto de dos de los al menos tres pulsos. En una modalidad, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar los TIL con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular o causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales en los TIL, que comprende la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de DC únicos, controlados por el operador, programados independientemente, con intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TIL, en donde al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en la amplitud de pulso. En una modalidad, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar los TIL con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular o causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales en los TIL, que comprende la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de DC únicos, controlados por el operador, programados independientemente, con intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TIL, en donde al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en el ancho de pulso. En una modalidad, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar los TIL con campos eléctricos pulsados para alterar, manipular o

causar cambios definidos y controlados, permanentes o temporales en los TIL, que comprende la etapa de aplicar una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de DC únicos, controlados por el operador, programados independientemente, con intensidades de campo iguales o superiores a 100 V/cm, a los TIL, en donde un primer intervalo de pulso para un primer conjunto de dos de los al menos tres pulsos es diferente de un segundo intervalo de pulso para un segundo conjunto de dos de los al menos tres pulsos. En una modalidad, el método de electroporación es un método de electroporación pulsada que comprende las etapas de tratar los TIL con campos eléctricos pulsados para inducir la formación de poros en los TIL, que comprende la etapa de aplicar a los TIL una secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de DC, con intensidades de campo iguales a o superior a 100 V/cm, en donde la secuencia de al menos tres pulsos eléctricos de DC tiene una, dos o tres de las siguientes características: (1) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en la amplitud de pulso; (2) al menos dos de los al menos tres pulsos difieren entre sí en el ancho del pulso; y (3) un primer intervalo de pulso para un primer conjunto de dos de los al menos tres pulsos es diferente de un segundo intervalo de pulso para un segundo conjunto de dos de los al menos tres pulsos, de manera que los poros inducidos se mantienen durante un período relativamente largo de tiempo, y de manera que se mantenga la viabilidad de los TIL. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transfección con fosfato de calcio. Los métodos de transfección con fosfato de calcio (precipitación del ADN con fosfato de calcio, revestimiento de la superficie celular y endocitosis) se conocen en la técnica y se describen en Graham y van der Eb, *Virology* **1973,** *52,* 456-467; Wigler y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979,** *76,* 1373-1376; y Chen y Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* **1987,** *7,* 2745-2752; y en la Patente de EE.UU. núm. 5,593,875, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una población de TIL incluye la etapa de transfección liposomal. Los métodos de transfección liposomal, tales como los métodos que emplean una formulación de liposomas 1:1 (p/p) del lípido catiónico cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*n*,*n*,*n*- trimetilamonio (DOTMA) y dioleoilfotidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada, son conocidos en la técnica y se describen en Rose, y otros, *Biotechniques* **1991,** *10,* 520-525 y Felgner, y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987,** *84,* 7413-7417 y en las Patentes de EE.UU. núm. 5,279,833; 5,908,635; 6,056,938; 6,110,490; 6,534,484; y 7,687,070, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un método para modificar genéticamente una

población de TIL incluye la etapa de transfección mediante el uso de los métodos descritos en las Patentes de EE.UU. núm. 5,766,902; 6,025,337; 6,410,517; 6,475,994; y 7,189,705; cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. Los TIL pueden ser una primera población, una segunda población y/o una tercera población de TIL como se describe en la presente descripción.

De acuerdo con una modalidad, el proceso de edición de genes puede comprender el uso de una nucleasa programable que media la generación de una ruptura monocatenaria o bicatenaria en uno o más genes de puntos de control inmunitarios. Tales nucleasas programables permiten la edición precisa del genoma mediante la introducción de rupturas en loci genómicos específicos, es decir, se basan en el reconocimiento de una secuencia de ADN específica dentro del genoma para dirigir un dominio de nucleasa a esta ubicación y mediar la generación de una ruptura bicatenaria en la secuencia de destino. Una ruptura bicatenaria en el ADN posteriormente recluta la maquinaria de reparación endógena en el sitio de ruptura para mediar en la edición del genoma mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR). Por tanto, la reparación de la ruptura puede dar como resultado la introducción de mutaciones de inserción/deleción que interrumpen (por ejemplo, silencian, reprimen o mejoran) el producto del gen diana.

Las principales clases de nucleasas que se han desarrollado para permitir la edición genómica específica de un sitio incluyen las nucleasas con dedos de zinc (ZFN), las nucleasas de tipo activador de la transcripción (TALEN) y las nucleasas asociadas a CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas9). Estos sistemas de nucleasas pueden clasificarse ampliamente en dos categorías con base en su modo de reconocimiento de ADN: las ZFN y las TALEN logran una unión de ADN específica a través de las interacciones proteína-ADN, mientras que los sistemas CRISPR, tales como Cas9, están dirigidos a secuencias de ADN específicas mediante una molécula guía corta de ARN que se empareja directamente con el ADN diana y mediante interacciones proteína-ADN. Véase, por ejemplo, Cox y otros, *Nature Medicine,* 2015, Vol. 21, núm. 2.

Los ejemplos no limitantes de los métodos de edición de genes que pueden usarse de acuerdo con los métodos de expansión de TIL de la presente invención incluyen métodos CRISPR, métodos TALE y métodos ZFN, que se describen con más detalle más abajo. De acuerdo con una modalidad, puede llevarse a cabo un método para expandir TIL en una población terapéutica de acuerdo con cualquier modalidad de los métodos descritos en la presente descripción (por ejemplo, el proceso GEN 3) o como

se describe en los documentos PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605, o PCT/US2018/012633, en donde el método comprende además la edición de genes de al menos una parte de los TIL mediante uno o más de un método CRISPR, un método TALE o un método ZFN, con el fin de generar TIL que pueden proporcionar efecto terapéutico mejorado. De acuerdo con una modalidad, los TIL editados genéticamente pueden evaluarse para un efecto terapéutico mejorado comparándolos con los TIL no modificados *in vitro,* por ejemplo, mediante la evaluación de la función efectora *in vitro*, los perfiles de citocinas, etc, en comparación con los TIL no modificados. En determinadas modalidades, el método comprende la edición de genes de una población de TIL mediante el uso de los métodos CRISPR, TALE y/o ZFN.

En algunas modalidades de la presente invención, la electroporación se usa para el suministro de un sistema de edición de genes, tal como los sistemas CRISPR, TALEN y ZFN. En algunas modalidades de la presente invención, el sistema de electroporación es un sistema de electroporación de flujo. Un ejemplo de un sistema de electroporación de flujo adecuado para su uso con algunas modalidades de la presente invención es el sistema MaxCyte STX disponible comercialmente. Hay varios instrumentos de electroporación alternativos disponibles comercialmente que pueden ser adecuados para su uso con la presente invención, tal como el sistema AgilePulse o ECM 830 disponible de BTX-Harvard Apparatus, Cellaxess Elektra (Cellectricon), Nucleofector (Lonza/Amaxa), GenePulser MXcell (BIORAD), iPorator-96 (Primax) o siPORTer96 (Ambion). En algunas modalidades de la presente invención, el sistema de electroporación forma un sistema estéril cerrado con el resto del método de expansión de los TIL. En algunas modalidades de la presente invención, el sistema de electroporación es un sistema de electroporación pulsada como se describe en la presente descripción, y forma un sistema estéril cerrado con el resto del método de expansión de los TIL.

Puede realizarse un método para expandir los TIL en una población terapéutica de acuerdo con cualquier modalidad de los métodos descritos en la presente descripción (por ejemplo, el proceso GEN 3) o como se describe en los documentos PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605, o PCT/US2018/012633, en donde el método comprende además la edición de genes de al menos una parte de los TIL mediante un método CRISPR (por ejemplo, CRISPR/Cas9 o CRISPR/Cpf1). De acuerdo con modalidades particulares, el uso de un método CRISPR durante el proceso de expansión de los TIL provoca que la expresión de uno o más genes de puntos de control

inmunitarios se silencie o reduzca en al menos una parte de la población terapéutica de los TIL. Alternativamente, el uso de un método CRISPR durante el proceso de expansión de los TIL hace que se mejore la expresión de uno o más genes de puntos de control inmunitarios en al menos una parte de la población terapéutica de los TIL.

CRISPR son las siglas de "Clustered Regularly Interpaced Short Palindromic Repeats". Un método de uso de un sistema CRISPR para la edición de genes también se denomina método CRISPR en la presente descripción. Hay tres tipos de sistemas CRISPR que incorporan ARN y proteínas Cas, y que pueden usarse en concordancia con la presente invención: Tipos I, II y III. El CRISPR Tipo II (ejemplificado por Cas9) es uno de los sistemas mejor caracterizados.

La tecnología CRISPR se adaptó a partir de los mecanismos naturales de defensa de bacterias y arqueas (el dominio de los microorganismos unicelulares). Estos organismos usan ARN derivado de CRISPR y varias proteínas Cas, que incluye Cas9, para frustrar los ataques de virus y otros cuerpos extraños al cortar y destruir el ADN de un invasor extraño. CRISPR es una región especializada de ADN con dos características distintas: la presencia de repeticiones de nucleótidos y espaciadores. Las secuencias repetidas de nucleótidos se distribuyen a lo largo de una región CRISPR con segmentos cortos de ADN extraño (espaciadores) intercalados entre las secuencias repetidas. En el sistema CRISPR/Cas de tipo II, los espaciadores se integran dentro de los loci genómicos CRISPR y se transcriben y procesan en ARN CRISPR corto (crARN). Estos crARN se aparean con los crARN que se activan en trans (tracrARN) y dirigen la escisión específica de la secuencia y el silenciamiento del ADN patógeno por las proteínas Cas. El reconocimiento de la diana por la proteína Cas9 requiere una secuencia "semilla" dentro del crARN y una secuencia conservada del motivo adyacente del protoespaciador que contiene dinucleótidos (PAM) aguas arriba de la región de unión del crARN. De este modo, el sistema CRISPR/Cas puede ser reorientado para escindir virtualmente cualquier secuencia de ADN mediante un nuevo diseño del crARN. El crARN y tracrARN en el sistema nativo pueden simplificarse en un único ARN guía (sgARN) de aproximadamente 100 nucleótidos para su uso en ingeniería genética. El sistema CRISPR/Cas es directamente portátil a las células humanas mediante el suministro conjunto de plásmidos que expresan la endonucleasa Cas9 y los componentes de crARN necesarios. Pueden usarse diferentes variantes de proteínas Cas para reducir las limitaciones de dirección (por ejemplo, ortólogos de Cas9, tal como Cpf1).

Los ejemplos no limitantes de genes que pueden ser silenciados o inhibidos por edición genética permanente de los TIL mediante de un método CRISPR que incluye PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, y GUCY1B3.

Los ejemplos no limitantes de genes que pueden mejorarse mediante edición genética permanente de los TIL mediante un método CRISPR incluyen CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

Los ejemplos de sistemas, métodos y composiciones para alterar la expresión de una secuencia de genes diana mediante un método CRISPR, y que pueden usarse de acuerdo con las modalidades de la presente invención, se describen en las Patentes de EE.UU. núm. 8,697,359; 8,993,233; 8,795,965; 8,771,945; 8,889,356; 8,865,406; 8,999,641; 8,945,839; 8,932,814; 8,871,445; 8,906,616; y 8,895,308, que se incorporan en la presente descripción como referencia. Los recursos para llevar a cabo los métodos CRISPR, tal como los plásmidos para expresar CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cpf1, están disponibles comercialmente en empresas tal como GenScript.

En una modalidad, las modificaciones genéticas de poblaciones de TIL, como se describe en la presente descripción, pueden realizarse mediante el uso del sistema CRISPR/Cpf1 como se describe en la Patente de EE.UU núm. US 9790490, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia.

Puede llevar a cabo un método para expandir los TIL en una población terapéutica de acuerdo con cualquier modalidad de los métodos descritos en la presente descripción (por ejemplo, el proceso 2A) o como se describe en los documentos PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605, o PCT/US2018/012633, en donde el método comprende además la edición de genes de al menos una parte de los TIL mediante un método TALE. De acuerdo con modalidades particulares, el uso de un método TALE durante el proceso de expansión de TIL provoca que la expresión de uno o más genes de puntos de control inmunitarios se silencie o reduzca en al menos una parte de la población terapéutica de los TIL. Alternativamente, el uso de un método TALE durante el proceso de expansión de TIL hace que se mejore la expresión de uno o más

genes de puntos de control inmunitarios en al menos una parte de la población terapéutica de los TIL.

TALE significa proteínas "Efectores de Actividad Similar a Activador de la Transcripción ", que incluyen los TALEN ("Nucleasa Efectora de Actividad Similar a Activador de la Transcripción"). Un método de uso de un sistema TALE para la edición de genes también puede denominarse en la presente descripción método TALE. Los TALE son proteínas de origen natural del género de bacterias fitopatógenas *Xanthomonas*, y contienen dominios de unión al ADN compuestos por una serie de dominios repetidos de 33-35 aminoácidos, cada uno de los cuales reconoce un solo par de bases. La especificidad de TALE está determinada por dos aminoácidos hipervariables que se conocen como di-residuos de repetición variable (RVD). Las repeticiones modulares de TALE se unen para reconocer secuencias de ADN contiguas. Un RVD específico en el dominio de unión al ADN reconoce una base en el locus diana, lo que proporciona una característica estructural para ensamblar dominios de unión al ADN predecibles. Los dominios de unión al ADN de un TALE se fusionan con el dominio catalítico de una endonucleasa FokI de tipo IIS para formar una nucleasa TALE que puede dirigirse. Para inducir una mutación específica del sitio, dos brazos de TALEN individuales, separados por una región espaciadora de 14-20 pares de bases, acercan los monómeros FokI para dimerizarlos y producir una ruptura bicatenaria dirigida.

Varios estudios grandes y sistemáticos que utilizan varios métodos de ensamblaje han indicado que las repeticiones de TALE pueden combinarse para reconocer prácticamente cualquier secuencia definida por el usuario. Las matrices TALE diseñadas a medida también están disponibles comercialmente a través de Cellectis Bioresearch (París, Francia), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, EE.UU.) y Life Technologies (Grand Island, NY, EE.UU.). Los métodos TALE y TALEN adecuados para su uso en la presente invención se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. US 2011/0201118 A1; US 2013/0117869 A1; US 2013/0315884 A1; US 2015/0203871 A1 y US 2016/0120906 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia.

Los ejemplos no limitantes de genes que pueden ser silenciados o inhibidos mediante edición genética permanente de los TIL mediante un método TALE incluyen PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6,

CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, y GUCY1B3.

Los ejemplos no limitantes de genes que pueden mejorarse mediante edición genética permanente de los TIL mediante de un método TALE incluyen CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

Los ejemplos de sistemas, métodos y composiciones para alterar la expresión de una secuencia de genes diana mediante un método TALE, y que pueden usarse de acuerdo con las modalidades de la presente invención, se describen en la Patente de EE.UU. núm. 8,586,526, que se incorpora como referencia en la presente descripción.

Puede llevarse a cabo un método para expandir los TIL en una población terapéutica de acuerdo con cualquier modalidad de los métodos descritos en la presente descripción (por ejemplo, el proceso GEN 3) o como se describe en los documentos PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605, o PCT/US2018/012633, en donde el método comprende además la edición de genes de al menos una parte de los TIL mediante un método de dedos de zinc o de nuclease con dedos de zinc. De acuerdo con modalidades particulares, el uso de un método con dedos de zinc durante el proceso de expansión de TIL provoca que la expresión de uno o más genes de puntos de control inmunitarios se silencie o reduzca en al menos una parte de la población terapéutica de los TIL. Alternativamente, el uso de un método con dedos de zinc durante el proceso de expansión de TIL hace que se mejore la expresión de uno o más genes de puntos de control inmunitarios en al menos una parte de la población terapéutica de los TIL.

Un dedo de zinc individual contiene aproximadamente 30 aminoácidos en una configuración ββα conservada. Varios aminoácidos en la superficie de la hélice α típicamente entran en contacto con 3 pb en el surco principal del ADN, con diferentes niveles de selectividad. Los dedos de zinc tienen dos dominios proteicos. El primer dominio es el dominio de unión al ADN, que incluye factores de transcripción de eucariotas y contiene el dedo de zinc. El segundo dominio es el dominio nucleasa, que incluye la enzima de restricción FokI y es responsable de la escisión catalítica del ADN.

Los dominios de unión al ADN de las ZFN individuales típicamente contienen entre tres y seis repeticiones de dedos de zinc individuales y cada uno puede reconocer entre 9 y 18 pares de bases. Si los dominios de dedos de zinc son específicos para su sitio diana deseado, incluso un par de ZFN de 3 dedos que reconocen un total de 18 pares de

bases pueden, en teoría, dirigirse a un solo locus en un genoma de mamífero. Un método para generar nuevas matrices de dedos de zinc es combinar "módulos" de dedos de zinc más pequeños de especificidad conocida. El proceso de ensamblaje modular más común implica combinar tres dedos de zinc separados que pueden reconocer cada uno una secuencia de ADN de 3 pares de bases para generar una matriz de 3 dedos que puede reconocer un sitio objetivo de 9 pares de bases. Alternativamente, pueden usar enfoques basados en la selección, tales como la ingeniería de grupos oligomerizados (OPEN) para seleccionar nuevas matrices de dedos de zinc de bibliotecas aleatorias que tienen en cuenta las interacciones dependientes del contexto entre los dedos vecinos. Los dedos de zinc modificados genéticamente están disponibles comercialmente; Sangamo Biosciences (Richmond, CA, EE.UU.) ha desarrollado una plataforma propia (CompoZr®) para la construcción con dedos de zinc en asociación con Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

Los ejemplos no limitantes de genes que pueden ser silenciados o inhibidos mediante la edición genética permanente de los TIL mediante un método de dedo de zinc incluyen PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, y GUCY1B3.

Los ejemplos no limitantes de genes que pueden mejorarse mediante edición genética permanente de los TIL mediante un método de dedo de zinc incluyen CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

Los ejemplos de sistemas, métodos y composiciones para alterar la expresión de una secuencia de genes diana mediante un método con dedos de zinc, que pueden usarse de acuerdo con las modalidades de la presente invención, se describen en las Patentes de EE.UU. núm. 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7,241,573, 7,241,574, 7,585,849, 7,595,376, 6,903,185, que se incorporan en la presente descripción como referencia.

Otros ejemplos de sistemas, métodos y composiciones para alterar la expresión de una secuencia de genes diana mediante un método con dedos de zinc, que pueden usarse de acuerdo con modalidades de la presente invención, se describen en Beane, y otros,

Mol. Therapy, **2015,** 23 1380-1390, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, los TIL opcionalmente se modifican genéticamente para incluir funcionalidades adicionales, que incluyen, pero no se limitan a, un receptor de células T de alta afinidad (TCR), por ejemplo, un TCR dirigido a un antígeno asociado a tumores tal como MAGE-1, HER2 o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de la superficie celular asociada a un tumor (por ejemplo, mesotelina) o una molécula de la superficie celular de linaje restringido (por ejemplo, CD19). En determinadas modalidades, el método comprende manipular genéticamente una población de TIL para incluir un receptor de células T de alta afinidad (TCR), por ejemplo, un TCR dirigido a un antígeno asociado a un tumor tal como MAGE-1, HER2 o NY-ESO-1, o un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a una molécula de la superficie celular asociada a un tumor (por ejemplo, mesotelina) o una molécula de la superficie celular de linaje restringido (por ejemplo, CD19). Apropiadamente, la población de TIL puede ser una primera población, una segunda población y/o una tercera población como se describe en la presente descripción.

K. Sistemas Cerrados para la Producción de TIL

La presente invención proporciona el uso de sistemas cerrados durante el proceso de cultivo de TIL. Tales sistemas cerrados permiten prevenir y/o reducir la contaminación microbiana, permiten el uso de menos frascos y permiten reducir los costos. En algunas modalidades, el sistema cerrado usa dos recipientes.

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

Los dispositivos de conexión estériles (STCD) producen soldaduras estériles entre dos piezas de tubería compatible. Este método permite la conexión estéril de una variedad de recipientes y diámetros de tubo. En algunas modalidades, los sistemas cerrados incluyen sistemas LuerLock y termosellados como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo G. En algunas modalidades, se accede al sistema cerrado mediante jeringas en condiciones estériles para mantener la esterilidad y la naturaleza cerrada del sistema. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado como se describe en el Ejemplo G. En algunas modalidades, los TIL se formulan en un recipiente de formulación de

producto final de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo G, sección “Formulación Final y Llenado”.

En algunas modalidades, el sistema cerrado usa un recipiente desde el momento en que se obtienen los fragmentos tumorales hasta que los TIL están listos para la administración al paciente o la crioconservación. En algunas modalidades, cuando se usan dos recipientes, el primer recipiente es un recipiente G cerrado y la población de TIL se centrifuga y transfiere a una bolsa de infusión sin abrir el primer recipiente G cerrado. En algunas modalidades, cuando se usan dos recipientes, la bolsa de infusión es una bolsa de infusión que contiene Hipotermosol. Un sistema cerrado o un sistema de cultivo de células TIL cerrado se caracteriza porque una vez que se han agregado la muestra y/o los fragmentos tumorales, el sistema se sella herméticamente desde el exterior para formar un ambiente cerrado libre de la invasión de bacterias, hongos y o cualquier otra contaminación microbiana.

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

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

Además, el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del ambiente de cultivo de células TIL varían a medida que se cultivan las células. En

consecuencia, aunque se haga circular un medio apropiado para el cultivo celular, el ambiente cerrado todavía necesita mantenerse constantemente como un ambiente óptimo para la proliferación de TIL. Para ello, es deseable que los factores físicos de pH, presión parcial de dióxido de carbono y presión parcial de oxígeno dentro del líquido de cultivo del ambiente cerrado sean monitoreados por medio de un sensor, cuya señal se usa para controlar un intercambiador de gas instalado en la entrada del ambiente de cultivo y la presión parcial de ese gas del ambiente cerrado se ajustan en tiempo real de acuerdo con los cambios en el líquido de cultivo para optimizar el ambiente de cultivo celular. En algunas modalidades, la presente invención proporciona un sistema de cultivo celular cerrado que incorpora en la entrada al ambiente cerrado un intercambiador de gas equipado con un dispositivo de monitoreo que mide el pH, la presión parcial de dióxido de carbono y la presión parcial de oxígeno del ambiente cerrado, y optimiza el ambiente de cultivo celular mediante el ajuste automático de las concentraciones de gas con base en las señales del dispositivo de monitorización.

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

En algunas modalidades, pueden sustituirse o añadirse componentes de cultivo óptimos para la proliferación de los TIL, y pueden incluirse factores tales como IL-2 y/u OKT3, así como también la combinación.

L. Crioconservación Opcional de los TIL

O la población de TIL mayoritaria (por ejemplo, la segunda población de TIL) o la población expandida de TIL (por ejemplo, la tercera población de TIL) pueden crioconservarse opcionalmente. En algunas modalidades, la crioconservación se produce en la población de TIL terapéutica. En algunas modalidades, la crioconservación se produce en los TIL cosechados después de la segunda expansión. En algunas modalidades, la crioconservación se produce en los TIL en la etapa F ilustrativa de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En

algunas modalidades, los TIL se crioconservan en la bolsa de infusión. En algunas modalidades, los TIL se crioconservan antes de colocarlos en una bolsa de infusión. En algunas modalidades, los TIL se crioconservan y no se colocan en una bolsa de infusión. En algunas modalidades, la crioconservación se realiza mediante el uso de un medio de crioconservación. En algunas modalidades, el medio de crioconservación contiene dimetilsulfóxido (DMSO). Esto generalmente se logra al colocar la población de TIL en una solución de congelación, por ejemplo, suero AB inactivado con complemento al 85 % y dimetilsulfóxido (DMSO) al 15 %. Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80 °C, con transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para crioconservación. Véase, Sadeghi, y otros*, Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986.

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

En una modalidad preferida, una población de TIL se crioconserva mediante el uso de un medio de crioconservación CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). En una modalidad preferida, una población de TIL se crioconserva mediante el uso de un medio de crioconservación que contiene dimetilsulfóxido (DMSO). En una modalidad preferida, una población de TIL se crioconserva mediante el uso de una relación 1:1 (vol:vol) de CS10 y medio de cultivo celular. En una modalidad preferida, una población de TIL se crioconserva mediante el uso una relación de aproximadamente 1:1 (vol:vol) de CS10 y medio de cultivo celular, que comprende además IL-2 adicional.

Como se discutió anteriormente, y se ejemplificó en las Etapas A a E como se proporciona en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), la crioconservación puede ocurrir en numerosos puntos a lo largo del proceso de expansión de TIL. En algunas modalidades, la población expandida de TIL después de la segunda expansión (como se proporciona, por ejemplo, de acuerdo con la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) puede crioconservarse. La crioconservación generalmente puede lograrse al colocar la población de TIL en una solución de congelación, por ejemplo, suero AB inactivado con complemento al 85 % y dimetilsulfóxido (DMSO) al 15 %. Las células en solución se colocan en viales criogénicos y se almacenan durante 24 horas a -80 °C, con

transferencia opcional a congeladores de nitrógeno gaseoso para crioconservación. Véase Sadeghi, y otros*, Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986. En algunas modalidades, los TIL se crioconservan en DMSO al 5 %. En algunas modalidades, los TIL se crioconservan en medio de cultivo celular más DMSO al 5 %. En algunas modalidades, los TIL se crioconservan de acuerdo con los métodos proporcionados en el Ejemplo D.

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

En algunos casos, la población de TIL de la Etapa B puede crioconservarse inmediatamente, mediante el uso de los protocolos que se describen más abajo. Alternativamente, la población de TIL mayoritaria puede someterse a la Etapa C y a la Etapa D y después crioconservarse después de la Etapa D. De manera similar, en el caso de que se utilicen TIL modificados genéticamente en la terapia, las poblaciones de TIL de la Etapa B o de la Etapa D pueden someterse a pruebas genéticas modificaciones para tratamientos adecuados.

M. Características Fenotípicas de los TIL Expandidos

En alguna modalidad, los TIL se analizan para determinar la expresión de numerosos marcadores fenotípicos después de la expansión, que incluyen los descritos en la presente descripción y en los Ejemplos. En una modalidad, se examina la expresión de uno o más marcadores fenotípicos. En algunas modalidades, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de la primera expansión en la Etapa B. En algunas modalidades, las características fenotípicas de los TIL se analizan durante la transición en la Etapa C. En algunas modalidades, las características fenotípicas de los TIL se analizan durante la transición de acuerdo con la Etapa C y después de la crioconservación. En algunas modalidades, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de la segunda expansión de acuerdo con la Etapa D. En algunas modalidades, las características fenotípicas de los TIL se analizan después de dos o más expansiones de acuerdo con la Etapa D.

En algunas modalidades, el marcador se selecciona del grupo que consiste en CD8 y CD28. En algunas modalidades, se examina la expresión de CD8. En algunas modalidades, se examina la expresión de CD28. En algunas modalidades, la expresión de CD8 y/o CD28 es mayor en los TIL producidos de acuerdo con el proceso de la

invención actual, en comparación con otros procesos (por ejemplo, el proceso Gen 3 como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), en comparación con el proceso 2A como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la expresión de CD8 es mayor en los TIL producidos de acuerdo con el proceso de la invención actual, en comparación con otros procesos (por ejemplo, el proceso Gen 3 como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), en comparación con el proceso 2A como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la expresión de CD28 es mayor en los TIL producidos de acuerdo con el proceso de la invención actual, en comparación con otros procesos (por ejemplo, el proceso Gen 3 como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), en comparación con el proceso 2A como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1A)). En algunas modalidades, una alta expresión de CD28 es indicativa de un fenotipo de TIL más joven y más presencial. En una modalidad, se mide la expresión de uno o más marcadores reguladores.

En una modalidad, no se realiza ninguna selección de la primera población de TIL, la segunda población de TIL, la tercera población de TIL o la población de TIL cosechada con base en la expresión de CD8 y/o CD28 durante ninguna de las etapas del método para expandir los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el porcentaje de células de memoria central es mayor en los TIL producidos de acuerdo con el proceso de la invención actual, en comparación con otros procesos (por ejemplo, el proceso Gen 3 como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), en comparación con el proceso 2A como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1A)). En algunas modalidades, el marcador de memoria para las células de memoria central se selecciona del grupo que consiste en CCR7 y CD62L.

En algunas modalidades, los subconjuntos de memoria de TIL CD4+ y/o CD8+ pueden dividirse en diferentes subconjuntos de memoria. En algunas modalidades, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL vírgenes (CD45RA+CD62L+). En algunas modalidades, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL de memoria central (CM; CD45RA-CD62L+). En algunas modalidades, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL de

memoria efectora (EM; CD45RA-CD62L-). En algunas modalidades, los TIL CD4+ y/o CD8+ comprenden los TIL RA+ de memoria efectora / efectores (TEMRA/TEFF; CD45RA+CD62L+). En algunas modalidades, hay un % más alto de CD8+ en comparación con la población de CD4+.

En algunas modalidades, los TIL expresan uno más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en granzima B, perforina y granulisina. En algunas modalidades, los TIL expresan granzima B. En algunas modalidades, los TIL expresan perforina. En algunas modalidades, los TIL expresan granulisina.

En una modalidad, los TIL estimulados nuevamente también pueden evaluarse para la liberación de citocinas, mediante el uso de ensayos de liberación de citocinas. En algunas modalidades, los TIL pueden evaluarse para la secreción de interferón-γ (IFN-γ). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ se mide mediante un ensayo ELISA. En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ se mide mediante un ensayo ELISA después de la segunda etapa de expansión rápida, después de la Etapa D como se proporciona, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, en la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la salud de los TIL se mide mediante la secreción de IFN-gamma (IFN-γ). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ es indicativa de TIL activos. En algunas modalidades, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN-γ. La producción de IFN-γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de IFN-γ puede medirse mediante la determinación de los niveles de la citocina IFN-γ en el medio de TIL estimulado con anticuerpos contra CD3, CD28 y CD137/4-1BB. Los niveles de IFN-γ en los medios de estos TIL estimulados pueden determinarse mediante la medición de la liberación de IFN-γ. En algunas modalidades, un aumento en la producción de IFN-γ en, por ejemplo, la Etapa D en el proceso Gen 3 como se proporciona en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) de los TIL en comparación con, por ejemplo, la Etapa D en el proceso 2A como se proporciona en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1A) es indicativo de un aumento en el potencial citotóxico de los TIL de la Etapa D. En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más. En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta una vez. En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta dos veces. En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta tres veces. En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta cuatro veces. En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta cinco veces. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide mediante el uso

de un kit de ELISA Quantikine. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en los TIL *ex vivo*. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en los TIL *ex vivo*, que incluyen los TIL producidos por los métodos de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los métodos de la Figura 1B.

En algunas modalidades, los TIL capaces de la secreción de al menos una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces o cinco veces más de IFN-γ son los TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los métodos de la Figura 1B y/o la Figura 1C. En algunas modalidades, los TIL capaces de la secreción de IFN-γ al menos una vez más son los TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los métodos de la Figura 1B y/o la Figura 1C. En algunas modalidades, los TIL capaces de la secreción de IFN-γ al menos dos veces más son los TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los métodos de la Figura 1B y/o la Figura 1C. En algunas modalidades, los TIL capaces de la secreción de IFN-γ al menos tres veces son los TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los métodos de la Figura 1B y/o la Figura 1C. En algunas modalidades, los TIL capaces de la secreción de IFN-γ al menos cuatro veces más son los TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los métodos de la Figura 1B y/o la Figura 1C. En algunas modalidades, los TIL capaces de la secreción de IFN-γ al menos cinco veces más son los TIL producidos por los métodos de expansión de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, los métodos de la Figura 1B y/o la Figura 1C.

Los diversos receptores de antígenos de las células T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos génicos. Estos segmentos génicos: V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante), determinan la especificidad de unión y las aplicaciones posteriores de inmunoglobulinas y receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un método para generar TIL que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen mediante el presente método exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, los TIL obtenidos mediante el presente método exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con los TIL recién cosechados y/o los TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, los métodos distintos de los

incorporados en Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, los TIL obtenidos mediante el presente método exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con los TIL recién cosechados y/o los TIL preparados mediante el uso de los métodos referidos como proceso 2A, como se ejemplifica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1A). En algunas modalidades, los TIL que se obtienen en la primera expansión exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, el aumento en la diversidad es un aumento en la diversidad de inmunoglobulinas y/o la diversidad del receptor de células T. En algunas modalidades, la diversidad en la inmunoglobulina se encuentra en la cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la diversidad en la inmunoglobulina se encuentra en la cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la diversidad se encuentra en el receptor de células T. En algunas modalidades, la diversidad se encuentra en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión de TCRab (es decir, TCRα/β). En algunas modalidades, el proceso como se describe en la presente descripción (por ejemplo, el proceso Gen 3) muestra una mayor diversidad clonal en comparación con otros procesos, por ejemplo, el proceso referido como Gen 2 con base en el número de péptidos únicos de CDR dentro de la muestra (véanse, por ejemplo, las Figuras 12-14).

En algunas modalidades, la activación y el agotamiento de los TIL pueden determinarse mediante el examen de uno o más marcadores. En algunas modalidades, la activación y el agotamiento pueden determinarse mediante el uso de citometría de flujo multicolor. En algunas modalidades, la activación y el agotamiento de los marcadores incluyen, pero no se limitan a, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD3, PD-1, 2B4/CD244, CD8, CD25, BTLA, KLRG, TIM-3, CD194/CCR4, CD4, TIGIT, CD183, CD69, CD95, CD127, CD103, y/o LAG-3). En algunas modalidades, la activación y el agotamiento de los marcadores incluyen, pero no se limitan a, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1, TIGIT y/o TIM- 3. En algunas modalidades, la activación y el agotamiento de los marcadores incluyen, pero no se limitan a, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, CD103+/CD69+,

CD103+/CD69-, PD-1, TIGIT, y/o TIM-3. En algunas modalidades, los marcadores de células T (que incluyen los marcadores de activación y agotamiento) pueden determinarse y/o analizarse para examinar la activación, inhibición o función de las células T. En algunas modalidades, los marcadores de células T pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en TIGIT, CD3, FoxP3, Tim-3, PD-1, CD103, CTLA-4, LAG-3, BTLA-4, ICOS, Ki67, CD8, CD25, CD45, CD4 y/o CD59.

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

N. Modalidades de Procesos Adicionales

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto al procesar una muestra de tumor obtenida del sujeto en múltiples fragmentos tumorales; (b) realizar una primera expansión con sensibilización al cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y OKT-3, en donde primera expansión con sensibilización se realiza durante aproximadamente 1 a 8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es mayor en número que la primera población de TIL; (c) realizar una segunda expansión rápida al poner en contacto la segunda población de TIL con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígenos (APC) exógenas para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza durante aproximadamente 1 a 10 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL; y (d) cosechar la población terapéutica de TIL obtenida en la etapa (c). En algunas modalidades, la etapa de la segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia de la segunda población de TIL del cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500MCS, en donde en el segundo recipiente se cultiva la segunda población de TIL del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 8 días. En algunas modalidades, la etapa

de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un primer cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son iguales en tamaño al primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente, la porción de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala transferida a tal segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un período de aproximadamente 4 a 8 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal y un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son más grandes que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la parte de la segunda población de TIL transferida desde el cultivo a pequeña escala a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 8 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal y un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida del cultivo a pequeña escala a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 5 a 7 días.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a)

obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto al procesar una muestra de tumor obtenida del sujeto en múltiples fragmentos tumorales; (b) realizar una primera expansión con sensibilización al cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y OKT-3, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza durante aproximadamente 1 a 8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es mayor en número que la primera población de TIL; (c) realizar una segunda expansión rápida al poner en contacto la segunda población de TIL con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígenos exógenas (APC) para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza durante aproximadamente 1 a 8 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL; y (d) cosechar la población terapéutica de TIL obtenida en la etapa (c). En algunas modalidades, la etapa de la segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia de la segunda población de TIL del cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500MCS, en donde en el segundo recipiente se cultiva la segunda población de TIL del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 8 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un primer cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son iguales en tamaño al primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente, la porción de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala transferida a tal segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un período de aproximadamente 4 a 6 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal y un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la

segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son más grandes que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida desde el cultivo a pequeña escala a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 6 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal y un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida del cultivo a pequeña escala a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 5 días.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (a) obtener una primera población de TIL de un tumor extirpado de un sujeto procesando una muestra de tumor obtenida del sujeto en múltiples fragmentos tumorales; (b) realizar una primera expansión con sensibilización al cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 y OKT-3, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza durante aproximadamente 1 a 7 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es mayor en número que la primera población de TIL; (c) realizar una segunda expansión rápida al poner en contacto la segunda población de TIL con un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígenos exógenas (APC) para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza durante aproximadamente 1 a 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL; y (d) cosechar la población terapéutica de TIL obtenida en la etapa (c). En algunas modalidades, la etapa de la

segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia de la segunda población de TIL del cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500MCS, en donde en el segundo recipiente se cultiva la segunda población de TIL del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un primer cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son iguales en tamaño al primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente, la porción de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala transferida a tal segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal y un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son más grandes que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida desde el cultivo a pequeña escala a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala durante un período de aproximadamente 4 a 7 días. En algunas modalidades, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para lograr un escalado horizontal y un escalado vertical del cultivo mediante: (1) realizar la segunda expansión rápida al cultivar la segunda población de TIL en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100MCS, durante un período de

aproximadamente 4 días, y después (2) efectuar la transferencia y distribución de la segunda población de TIL del primer cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la segunda población de TIL transferida desde el cultivo a pequeña escala a tal segundo recipiente se cultiva a mayor escala durante un período de aproximadamente 5 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según sea aplicable modificado anteriormente de tal manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al poner en contacto la primera población de TIL con un medio de cultivo que además comprende células presentadoras antígeno exógenas (APC), en donde el número de APC en el medio de cultivo en la etapa (c) es mayor que el número de APC en el medio de cultivo en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según sea aplicable modificado anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) el medio de cultivo se suplementa con APC exógenas adicionales.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 20:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 10:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 9:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la

relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 8:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 7:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 6:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 5:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 4:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 3:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,9:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,8:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,7:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de 1,1:1 a aproximadamente 2,6:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,5:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,4:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,3:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número

de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,2:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2,1:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 1,1:1 a aproximadamente 2:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 3:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,9:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,8:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,7:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,6:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,5:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,4:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número

de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,3:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,2:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 2,1:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) es de aproximadamente 2:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida y el número de APC añadidas en la etapa (b) es de aproximadamente 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3,1:1, 3,2:1, 3,3:1, 3,4:1, 3,5:1, 3,6:1, 3,7:1, 3,8:1, 3,9:1, 4:1, 4,1:1, 4,2:1, 4,3:1, 4,4:1, 4,5:1, 4,6:1, 4,7:1, 4,8:1, 4,9:1, o 5:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el número de APC añadidas en la primera expansión primaria es de aproximadamente 1×10^8, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, 2×10^8, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, 3×10^8, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$ o $3,5\times10^8$ APC y de manera que el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida es de aproximadamente $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 4×10^8, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, 5×10^8, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$, 6×10^8, $6,1\times10^8$, $6,2\times10^8$, $6,3\times10^8$, $6,4\times10^8$, $6,5\times10^8$,

$6{,}6\times10^8$, $6{,}7\times10^8$, $6{,}8\times10^8$, $6{,}9\times10^8$, 7×10^8, $7{,}1\times10^8$, $7{,}2\times10^8$, $7{,}3\times10^8$, $7{,}4\times10^8$, $7{,}5\times10^8$, $7{,}6\times10^8$, $7{,}7\times10^8$, $7{,}8\times10^8$, $7{,}9\times10^8$, 8×10^8, $8{,}1\times10^8$, $8{,}2\times10^8$, $8{,}3\times10^8$, $8{,}4\times10^8$, $8{,}5\times10^8$, $8{,}6\times10^8$, $8{,}7\times10^8$, $8{,}8\times10^8$, $8{,}9\times10^8$, 9×10^8, $9{,}1\times10^8$, $9{,}2\times10^8$, $9{,}3\times10^8$, $9{,}4\times10^8$, $9{,}5\times10^8$, $9{,}6\times10^8$, $9{,}7\times10^8$, $9{,}8\times10^8$, $9{,}9\times10^8$ o 1×10^9 APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el número de APC añadidas en la primera expansión primaria está en el intervalo de aproximadamente 1×10^8 APC a aproximadamente $3{,}5\times10^8$ APC, y en donde el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $3{,}5\times10^8$ APC a aproximadamente 1×10^9 APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el número de APC añadidas en la primera expansión primaria está en el intervalo de aproximadamente $1{,}5\times10^8$ APC a aproximadamente 3×10^8 APC, y en donde el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente 4×10^8 APC a aproximadamente $7{,}5\times10^8$ APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el número de APC añadidas en la primera expansión primaria está en el intervalo de aproximadamente 2×10^8 APC a aproximadamente $2{,}5\times10^8$ APC, y en donde el número de APC añadidas en la segunda expansión rápida está en el intervalo de aproximadamente $4{,}5\times10^8$ APC a aproximadamente $5{,}5\times10^8$ APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que se añaden aproximadamente $2{,}5\times10^8$ APC a la primera expansión primaria y se añaden aproximadamente $5x10^8$ APC a la segunda expansión rápida.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las células presentadoras de antígeno son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos tumorales se distribuyan en una pluralidad de recipientes

separados, en cada uno de los cuales se obtiene la primera población de TIL en la etapa (a), la segunda población de TIL se obtiene en la etapa (b), y la tercera población de TIL se obtiene en la etapa (c), y las poblaciones terapéuticas de TIL de la pluralidad de recipientes en la etapa (c) se combinan para producir la población de TIL cosechada de la etapa (d).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples tumores se distribuyan uniformemente en la pluralidad de recipientes separados.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la pluralidad de recipientes separados comprenda al menos dos recipientes separados.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la pluralidad de recipientes separados comprenda de dos a veinte recipientes separados.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la pluralidad de recipientes separados comprenda de dos a quince recipientes separados.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la pluralidad de recipientes separados comprenda de dos a diez recipientes separados.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la pluralidad de recipientes separados comprenda de dos a cinco recipientes separados.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la pluralidad de recipientes separados comprenda 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 recipientes separados.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que para cada recipiente en el que se realiza la primera expansión con sensibilización en una primera población de TIL en la etapa (b), la segunda expansión rápida en la etapa (c)

se realiza en el mismo recipiente sobre la segunda población de TIL producida a partir de tal primera población de TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada uno de los recipientes separados comprenda una primera área de superficie permeable a los gases.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos tumorales se distribuyan en un solo recipiente.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el recipiente único comprenda una primera área de superficie permeable a los gases.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente una capa celular a aproximadamente tres capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1,5 capas celulares a aproximadamente 2,5 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la

etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas celulares a aproximadamente 10 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas celulares a aproximadamente 8 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión con sensibilización se realiza en un primer recipiente que comprende una primera área de superficie permeable a los gases y en la etapa (c) la segunda expansión rápida se realiza en un segundo recipiente que comprende una segunda superficie permeable a los gases.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el segundo recipiente es más grande que el primer recipiente.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente una capa celular a aproximadamente tres capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1,5 capas celulares a aproximadamente 2,5 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda modificado de manera que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1, 1,1 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas celulares a aproximadamente 10 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas celulares a aproximadamente 8 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la segunda área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión con sensibilización se realiza en un primer recipiente que comprende una primera área de superficie permeable a los gases y en la etapa (c) la segunda expansión rápida se realiza en el primer recipiente.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente una capa celular a aproximadamente tres capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1,5 capas celulares a aproximadamente 2,5 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la

etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 2 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3 capas celulares a aproximadamente 10 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4 capas celulares a aproximadamente 8 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (c) las APC se disponen en capas sobre la primera área de superficie permeable a los gases con un grosor promedio de aproximadamente 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8 capas celulares.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el

número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:10.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:9.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:8.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:7.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo

celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:6.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:5.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:4.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,1 a aproximadamente 1:2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,2 a aproximadamente 1:8.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,3 a aproximadamente 1:7.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número

promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,4 a aproximadamente 1:6.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:5.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,6 a aproximadamente 1:4.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,7 a aproximadamente 1:3,5.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el

número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,8 a aproximadamente 1:3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:1,9 a aproximadamente 1:2,5.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) está en el intervalo de aproximadamente 1:2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera expansión primaria se realiza al suplementar el medio de cultivo celular de la primera población de TIL con células presentadoras de antígenos (APC) adicionales, en donde el número de APC añadidas en la etapa (c) es mayor que el número de APC añadidas en la etapa (b), y en donde la relación entre el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (b) y el número promedio de capas de las APC dispuestas en capas en la etapa (c) se selecciona de aproximadamente 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,1, 1:2,2, 1:2,3, 1:2,4, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9, 1:3, 1:3,1, 1:3,2, 1:3,3, 1:3,4, 1:3,5, 1:3,6, 1:3,7, 1:3,8, 1:3,9, 1:4, 1:4,1, 1:4,2, 1:4,3, 1:4,4, 1:4,5, 1:4,6, 1:4,7, 1:4,8, 1:4,9, 1:5, 1:5,1, 1:5,2, 1:5,3, 1:5,4, 1:5,5, 1:5,6, 1:5,7, 1:5,8, 1:5,9, 1:6, 1:6,1, 1:6,2, 1:6,3,

1:6,4, 1:6,5, 1:6,6, 1:6,7, 1:6,8, 1:6,9, 1:7, 1:7,1, 1:7,2, 1:7,3, 1:7,4, 1:7,5, 1:7,6, 1:7,7, 1:7,8, 1:7,9, 1:8, 1:8,1, 1:8,2, 1:8,3, 1:8,4, 1:8,5, 1:8,6, 1:8,7, 1:8,8, 1:8,9, 1:9, 1:9,1, 1:9,2, 1:9,3, 1:9,4, 1:9,5, 1:9,6, 1:9,7, 1:9,8, 1:9,9 o 1:10.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 1,5:1 a aproximadamente 100:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 50:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 25:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 20:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la relación entre el número de TIL en la segunda población de TIL y el número de TIL en la primera población de TIL es de aproximadamente 10:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la segunda población de TIL sea al menos aproximadamente 50 veces mayor en número que la primera población de TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la segunda población de TIL sea al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,

34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 veces mayor en número que la primera población de TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que aproximadamente en 2 días o aproximadamente en 3 días después del comienzo del segundo período en la etapa (c), el medio de cultivo celular se suplementa con IL-2 adicional.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado para comprender además la etapa de crioconservar la población de TIL cosechada en la etapa (d) mediante el uso de un proceso de crioconservación.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado para comprender realizar después de la etapa (d) la etapa adicional de (e) transferir la población de TIL cosechada de la etapa (d) a una bolsa de infusión que opcionalmente contiene HypoThermosol.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado para comprender la etapa de crioconservar la bolsa de infusión que comprende la población de TIL cosechada en la etapa (e) mediante el uso de un proceso de crioconservación.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el proceso de crioconservación se realiza mediante el uso de una relación 1:1 de la población de TIL cosechada a medio de crioconservación.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las células presentadoras de antígeno son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las PBMC se irradien y sean alogénicas.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el número total de APC añadidas al cultivo celular en la etapa (b) es de $2,5 \times 10^8$.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el número total de APC añadidas al cultivo celular en la etapa (c) es de 5×10^8.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las APC sean PBMC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las PBMC se irradien y sean alogénicas.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las células presentadoras de antígenos sean células presentadoras de antígenos artificiales.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la cosecha en la etapa (d) se realiza mediante el uso de un sistema de procesamiento celular basado en membrana.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la cosecha en la etapa (d) se realiza mediante el uso de un sistema de procesamiento de células LOVO.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden de 5 o aproximadamente 5 a 60 o a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden de 10 o aproximadamente 10 a 60 o a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 25 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprendan de aproximadamente 35 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente de manera que los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 45 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente de manera que los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente de manera que los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 fragmentos por recipiente en la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tiene un volumen de aproximadamente 27 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tiene un volumen de aproximadamente 20 mm^3 a aproximadamente 50 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tenga un volumen de aproximadamente 21 mm^3 a aproximadamente 30 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tenga un volumen de aproximadamente 22 mm^3 a aproximadamente 29,5 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tenga un volumen de aproximadamente 23 mm^3 a aproximadamente 29 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tenga un volumen de aproximadamente 24 mm^3 a aproximadamente 28,5 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tenga un volumen de aproximadamente 25 mm^3 a aproximadamente 28 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada

fragmento tenga un volumen de aproximadamente 26,5 mm^3 a aproximadamente 27,5 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada fragmento tenga un volumen de aproximadamente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 30 a aproximadamente 60 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1300 mm^3 a aproximadamente 1500 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1350 mm^3.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que los múltiples fragmentos comprenden 50 fragmentos o aproximadamente 50 fragmentos con una masa total de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 1,5 gramos.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el medio de cultivo celular se proporciona en un recipiente que es un recipiente G o una bolsa de células Xuri.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la concentración de IL-2 en el medio de cultivo celular es de aproximadamente 10 000 UI/ml a aproximadamente 5000 UI/ml.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la concentración de IL-2 en el medio de cultivo celular es de aproximadamente 6000 UI/ml.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el medio de crioconservación comprenda dimetilsulfóxido (DMSO).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el medio de crioconservación comprenda de 7 % a 10 % de DMSO.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el primer período en la etapa (b) se realiza dentro de un período de aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el segundo período en la etapa (c) se realiza dentro de un período de aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días u 11 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) se realizan individualmente dentro de un período de aproximadamente 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) se realizan individualmente dentro de un período de aproximadamente 5 días, 6 días o 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el primer período en la etapa (b) y el segundo período en la etapa (c) se realizan individualmente dentro de un período de aproximadamente 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 14 días a aproximadamente 18 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 15 días a aproximadamente 18 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 16 días a aproximadamente 18 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 17 días a aproximadamente 18 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 14 días a aproximadamente 17 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 15 días a aproximadamente 17 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 16 días a aproximadamente 17 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 14 días a aproximadamente 16 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 15 días a aproximadamente 16 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 14 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 15 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 16 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 17 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 18 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 14 días o menos.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 15 días o menos.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 16 días o menos.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 17 días o menos.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las etapas (a) a (d) se realizan en un total de aproximadamente 18 días o menos.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la población terapéutica de TIL cosechada en la etapa (d) comprende suficientes TIL para una dosificación con eficacia terapéutica de los TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que el número de TIL suficientes para una dosis con eficacia terapéutica es de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ a aproximadamente $13,7 \times 10^{10}$.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporcione una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona al menos una producción de interferón gamma de una a cinco veces o más en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 16 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona al menos una producción de interferón gamma de una a cinco veces o más en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 17 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que la tercera población de TIL en la etapa (c) proporciona al menos una producción de interferón gamma de una a cinco veces o más en comparación con los TIL preparados mediante un proceso de más de 18 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la tercera población de TIL de la etapa (c) exhiban una expresión aumentada de CD8 y CD28 en relación con las células T efectoras y/o las células T de memoria central obtenidas de la segunda población de células de la etapa (b).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada recipiente mencionado en el método sea un recipiente cerrado.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada recipiente mencionado en el método sea un recipiente G.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada recipiente mencionado en el método sea un GREX-10.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada recipiente mencionado en el método sea un GREX-100.

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificado de manera que cada recipiente mencionado en el método sea un GREX-500.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) producida mediante el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de células presentadoras de antígeno (APC) u OKT3.

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de células presentadoras de antígeno (APC).

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde

la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de OKT3.

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de células presentadoras de antígeno (APC) y sin la adición de OKT3.

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL preparados mediante un proceso que es un proceso de más de 16 días.

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL preparados mediante un proceso que es un proceso de más de 17 días.

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) preparada a partir de tejido tumoral de un paciente, en donde la población terapéutica de TIL proporciona una mayor eficacia, una mayor producción de interferón gamma y/o una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL preparados mediante un proceso que es un proceso de más de 18 días.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente que proporciona una mayor producción de interferón gamma.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente que proporciona una mayor diversidad clonal.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente que proporciona una mayor eficacia.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos una vez más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 16 días. En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos una vez más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 17 días. En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos una vez más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 18 días. En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos una vez más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos dos veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 16 días. En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos dos veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 17 días. En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos dos veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 18 días. En algunas modalidades, los TIL se

vuelven capaces de producir al menos dos veces más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 16 días. En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 17 días. En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que la población terapéutica de TIL sea capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados por un proceso de más de 18 días. En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos tres veces más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que es capaz de producir al menos una vez más interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de células presentadoras de antígeno (APC). En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos una vez más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que es capaz de producir al menos una vez más de interferón

gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de OKT3. En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos una vez más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de TIL que es capaz de producir al menos dos veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de APC. En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos dos veces más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de TIL que es capaz de producir al menos dos veces más de interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de OKT3. En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos dos veces más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de TIL que es capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza sin la adición de APC. En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos una vez más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona una población terapéutica de TIL que es capaz de producir al menos tres veces más interferón gamma en comparación con los TIL preparados mediante un proceso en el que la primera expansión de TIL se realiza

sin la adición de OKT3. En algunas modalidades, los TIL se vuelven capaces de producir al menos tres veces más interferón gamma debido al proceso de expansión descrito en la presente descripción, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En otra modalidad, la invención proporciona el método descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según sea aplicable modificado anteriormente modificado de manera que los fragmentos tumorales sean pequeñas biopsias (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente de manera que los fragmentos tumorales son biopsias con aguja gruesa.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que los fragmentos tumorales son aspirados con aguja fina.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que los fragmentos tumorales son biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que los fragmentos tumorales son punción biópsica con aguja gruesa.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que (i) el método comprende obtener la primera población de TIL de una o más biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del sujeto, (ii) el método comprende realizar la etapa de cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 por un período de aproximadamente 3 días antes de realizar la etapa de la primera expansión con sensibilización, (iii) el método comprende realizar la primera expansión con sensibilización por un período de aproximadamente 8 días, y (iv) el método comprende

realizar la segunda expansión rápida por un período de aproximadamente 11 días. En algunas de las modalidades anteriores, las etapas del método se completan en aproximadamente 22 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que (i) el método comprende obtener la primera población de TIL de una o más biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa, o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del sujeto, (ii) el método comprende realizar la etapa de cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 por un período de aproximadamente 3 días antes de realizar la etapa de la primera expansión con sensibilización, (iii) el método comprende realizar la primera expansión con sensibilización por un período de aproximadamente 8 días, y (iv) el método comprende realizar la segunda expansión rápida mediante el cultivo del cultivo de la segunda población de TIL por aproximadamente 5 días, que divide el cultivo en hasta 5 subcultivos y se cultivan los subcultivos por aproximadamente 6 días. En algunas de las modalidades anteriores, los hasta 5 subcultivos se cultivan cada uno en un recipiente que es del mismo tamaño o más grande que el recipiente en el que se inicia el cultivo de la segunda población de TIL en la segunda expansión rápida. En algunas de las modalidades anteriores, el cultivo de la segunda población de TIL se divide igualmente entre los hasta 5 subcultivos. En algunas de las modalidades anteriores, las etapas del método se completan en aproximadamente 22 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 20 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 10 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 20 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

Los párrafos como se aplican anteriormente modificados de manera que la primera población de TIL se obtiene a partir de 1 a aproximadamente 10 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 20 punción biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 10 punción biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 punción biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 punción biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1 a aproximadamente 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de TIL se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral del sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que (i) el método comprende obtener la primera población de TIL a partir de 1 a aproximadamente 10 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto, (ii) el método comprende realizar la etapa de cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 por un período de aproximadamente 3 días antes de realizar la etapa de la primera expansión con sensibilización, (iii) el método comprende realizar la etapa de la primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de la primera población de TIL en un medio de cultivo que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) por un período de aproximadamente 8 días para obtener la segunda población de TIL, y (iv) el método comprende realizar la etapa de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la segunda población de TIL en un medio de cultivo que comprende IL-2, OKT-3 y APC por un período de aproximadamente 11 días. En algunas de las modalidades anteriores, las etapas del método se completan en aproximadamente 22 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que (i) el método comprende obtener la primera población de TIL a partir de 1 a aproximadamente 10 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto, (ii) el método comprende realizar la etapa de cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende IL-2 por un período de aproximadamente 3 días antes

de realizar la etapa de la primera expansión con sensibilización, (iii) el método comprende realizar la etapa de la primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de la primera población de TIL en un medio de cultivo que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) por un período de aproximadamente 8 días para obtener la segunda población de TIL, y (iv) el método comprende realizar la segunda expansión rápida mediante el cultivo del cultivo de la segunda población de TIL en un medio de cultivo que comprende IL-2, OKT-3 y APC por aproximadamente 5 días, que divide el cultivo en hasta 5 subcultivos y se cultivan cada uno de los subcultivos en un medio de cultivo que comprende IL-2 por aproximadamente 6 días. En algunas de las modalidades anteriores, los hasta 5 subcultivos se cultivan cada uno en un recipiente que es del mismo tamaño o más grande que el recipiente en el que se inicia el cultivo de la segunda población de TIL en la segunda expansión rápida. En algunas de las modalidades anteriores, el cultivo de la segunda población de TIL se divide igualmente entre los hasta 5 subcultivos. En algunas de las modalidades anteriores, las etapas del método se completan en aproximadamente 22 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que (i) el método comprende obtener la primera población de TIL a partir de 1 a aproximadamente 10 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del sujeto, (ii) el método comprende realizar la etapa de cultivar la primera población de TIL en un medio de cultivo celular que comprende 6000 UI de IL-2/mL en 0,5 L de medio de cultivo CM1 en un frasco G-Rex 100 M por un período de aproximadamente 3 días antes de realizar la etapa de la primera expansión con sensibilización, (iii) el método comprende realizar la primera expansión con sensibilización mediante la adición de 0,5 L de medio de cultivo CM1 que contiene 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3, y aproximadamente 10^8 células alimentadoras y se cultivan por un período de aproximadamente 8 días, y (iv) el método comprende realizar la segunda expansión rápida mediante (a) la transferencia de la segunda población de TIL a un frasco G-Rex 500 MCS que contiene 5 L de medio de cultivo CM2 con 3000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 y $5x10^9$ de células alimentadoras y se cultivan por aproximadamente 5 días (b) la división del cultivo en hasta 5 subcultivos mediante la transferencia de 10^9 de TIL a cada uno de hasta 5 frascos G-Rex 500 MCS que contienen 5 L de medio AIM-V con 3000 UI/mL de IL-2 y se cultivan los subcultivos por aproximadamente 6 días. En algunas de las modalidades anteriores, las etapas del método se completan en aproximadamente 22 días.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para expandir células T que comprende: (a) realizar una primera expansión con sensibilización de una primera población de células T que se obtienen de un donante mediante el cultivo de la primera población de células T para efectuar el crecimiento y cebar una activación de la primera población de células T; (b) después de la activación de la primera población de células T que se ceban en la etapa (a) comienza a decaer, se realiza una segunda expansión rápida de la primera población de células T mediante el cultivo de la primera población de células T para efectuar el crecimiento y estimular la activación de la primera población de células T para obtener una segunda población de células T; y (c) cosechar la segunda población de células T. En otra modalidad, la etapa de la segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500 MCS, y se cultiva la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala en el segundo recipiente por un período de aproximadamente 4 a 7 días. En otra modalidad, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un primer cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son iguales en tamaño que el primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente, la porción de la primera población de células T del primer cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala por un período de aproximadamente 4 a 7 días. En otra modalidad, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado y una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 3 a 4 días,

y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500 MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 4 a 7 días. En otra modalidad, la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado y una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500 MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 5 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la etapa de la segunda expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala a un segundo recipiente más grande que el primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 500 MCS, y se cultiva la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en un cultivo a mayor escala en el segundo recipiente por un período de aproximadamente 5 a 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión

rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un primer cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del primer cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que tienen igual tamaño que el primer recipiente, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del primer cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un segundo cultivo a pequeña escala por un período de aproximadamente 5 a 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado y una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 2 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500 MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 5 a 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado y una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500 MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del cultivo a

pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 5 a 6 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado y una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500cMCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 5 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado y una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500 MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 6 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la etapa de expansión rápida se divide en una pluralidad de etapas para alcanzar un aumento del escalado y una ampliación del escalado del cultivo mediante: (a) la modalidad de la segunda expansión rápida mediante el cultivo de la primera población de células T en un cultivo a pequeña escala en un primer recipiente, por ejemplo, un

recipiente G-REX 100 MCS, por un período de aproximadamente 3 a 4 días, y después (b) efectuar la transferencia y distribución de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala en y entre 2, 3 o 4 segundos recipientes que son más grandes en tamaño que el primer recipiente, por ejemplo, recipientes G-REX 500 MCS, en donde en cada segundo recipiente la porción de la primera población de células T del cultivo a pequeña escala que se transfiere a tal segundo recipiente se cultiva en un cultivo a mayor escala por un período de aproximadamente 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera expansión con sensibilización de la etapa (a) se realiza durante un período de hasta 7 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 8 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 10 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 11 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera expansión con sensibilización en la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la

primera expansión con sensibilización en la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 10 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera expansión con sensibilización en la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días u 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera expansión con sensibilización en la etapa (a) se realiza durante un período de 7 días u 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 10 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera expansión con sensibilización en la etapa (a) se realiza durante un período de 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 9 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera expansión con sensibilización en la etapa (a) se realiza durante un período de 8 días y la segunda expansión rápida de la etapa (b) se realiza durante un período de hasta 8 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo que comprende OKT-3 e IL-2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que el primer medio de cultivo comprende un agonista de 4-1BB, OKT-3 e IL-2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que el

primer medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que el primer medio de cultivo comprende un agonista de 4-1BB, OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo que comprende OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que el segundo medio de cultivo comprende un agonista de 4-1BB, OKT-3, IL-2 y células presentadoras de antígeno (APC).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable a los gases, en donde el primer medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en donde la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, en donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el recipiente, en donde el segundo medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una segunda población de APC, en donde la segunda población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, y en donde la segunda población de APC es superior a la primera población de APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable a los gases, en donde el primer medio de cultivo comprende un agonista de 4-1BB, OKT-3, IL-2 y una

primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en donde la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, en donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el recipiente, en donde el segundo medio de cultivo comprende OKT-3, IL -2 y una segunda población de APC, en donde la segunda población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, y en donde la segunda población de APC es superior a la primera población de APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable a los gases, en donde el primer medio de cultivo comprende OKT-3, IL-2 y una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en donde la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, en donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el recipiente, en donde el segundo medio de cultivo comprende un agonista de 4-1BB, OKT-3, IL -2 y una segunda población de APC, en donde la segunda población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, y en donde la segunda población de APC es superior a la primera población de APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de células T se cultiva en un primer medio de cultivo en un recipiente que comprende una primera superficie permeable a los gases, en donde el primer medio de cultivo comprende un agonista de 4-1BB, OKT-3, IL-2 y una primera población de células presentadoras de antígeno (APC), en donde la primera población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la primera población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, en donde en la etapa (b) la primera población de células T se cultiva en un segundo medio de cultivo en el recipiente, en donde el segundo medio de cultivo

comprende un agonista de 4-1BB, OKT-3, IL-2 y una segunda población de APC, en donde la segunda población de APC es exógena al donante de la primera población de células T y la segunda población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases, y en donde la segunda población de APC es superior a la primera población de APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la relación del número de APC en la segunda población de APC al número de APC en la primera población de APC es aproximadamente 2:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que el número de APC en la primera población de APC es aproximadamente $2,5x10^8$ y el número de APC en la segunda población de APC es aproximadamente $5x10^8$.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases con un espesor promedio de 2 capas de APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la segunda población de APC se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases con un espesor promedio en el intervalo de 4 a 8 capas de APC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la relación del número promedio de capas de APC que se dispone en capas sobre la primera superficie permeable a los gases en la etapa (b) al número promedio de capas de APC en que se disponen en capas sobre la primera superficie permeable a los gases en la etapa (a) es 2:1.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $1,0x10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $4,5x10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $1,5\times10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $3,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $2,0x10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente $3,0x10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad de o aproximadamente de $2,0x10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $2,5x10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $7,5x10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $3,5x10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $6,0x10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $4,0x10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $5,5x10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad de o aproximadamente de $4,0\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $1,0\times10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $4,5\times10^6$ APC/cm^2 y en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $2,5\times10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $7,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $1,5\times10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $3,5\times10^6$ APC/cm^2 y en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $3,5\times10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $6,0\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $2,0\times10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $3,0\times10^6$ APC/cm^2 y en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad en el intervalo de o aproximadamente de $4,0\times10^6$ APC/cm^2 a o aproximadamente a $5,5\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que en la etapa (a) la primera población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad de o aproximadamente de $2,0x10^6$ APC/cm^2 y en la etapa (b) la segunda población de APC se siembra en la primera superficie permeable a los gases a una densidad de o aproximadamente de $4,0\times10^6$ APC/cm^2.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que las APC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que las PBMC se irradian y son exógenas al donante de la primera población de células T.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que las células T son linfocitos infiltrantes de tumor (TIL).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que las células T son linfocitos infiltrantes de médula (MIL).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que las células T son linfocitos de sangre periférica (PBL).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene mediante la separación de la sangre total del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene mediante la separación del producto de aféresis del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se separa de la sangre total o del producto de aféresis del donante mediante selección positiva o negativa de un fenotipo de células T.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que el fenotipo del linfocito T es CD3+ y CD45+.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que antes de realizar la primera expansión con sensibilización de la primera población de células T, las células T se separan de las células NK. En otra modalidad, las células T se separan de las células NK en la primera población de células T mediante la eliminación de células CD3- y CD56 + de la primera población de células T. En otra modalidad, las células CD3- y CD56 + se eliminan de la primera población de células T al someter la primera población de células T a una clasificación de células mediante el

uso de una estrategia de activación que elimina la fracción de células CD3- y CD56 + y recupera la fracción negativa. En otra modalidad, el método anterior se utiliza para la expansión de células T en una primera población de células T que se caracteriza por un alto porcentaje de células NK. En otra modalidad, el método anterior se utiliza para la expansión de células T en una primera población de células T que se caracteriza por un alto porcentaje de células CD3- y CD56 +. En otra modalidad, el método anterior se utiliza para la expansión de células T en tejido tumoral que se caracteriza por la presencia de un alto número de células NK. En otra modalidad, el método anterior se utiliza para la expansión de células T en tejido tumoral que se caracteriza por un alto número de células CD3- y CD56+. En otra modalidad, el método anterior se utiliza para la expansión de células T en tejido tumoral que se obtiene de un paciente que padece de un tumor que se caracteriza por la presencia de un alto número de células NK. En otra modalidad, el método anterior se utiliza para la expansión de células T en tejido tumoral que se obtiene de un paciente que padece de un tumor que se caracteriza por la presencia de un alto número de células CD3- y CD56+. En otra modalidad, el método anterior se utiliza para la expansión de células T en tejido tumoral que se obtiene de un paciente que padece de cáncer de ovario.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que se siembran células T a o aproximadamente a $1x10^7$ de la primera población de células T en un recipiente para iniciar el primer cultivo de expansión primario en tal recipiente.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se distribuye en una pluralidad de recipientes, y en cada recipiente se siembran células T a o aproximadamente a $1x10^7$ de la primera población de células T para iniciar el primer cultivo de expansión primario en tal recipiente.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la segunda población de células T que se cosechan en la etapa (c) es seleccionada.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de una o más biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados), biopsias con aguja gruesa, punción biópsica con aguja gruesa o aspiración con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de una o más biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 20 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la

primera población de células T se obtiene de 1 a 10 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 biopsias con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de una o más aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 20 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 10 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aspiraciones con aguja fina del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la

primera población de células T se obtiene de una o más biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral el donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral el donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 biopsias pequeñas (que incluyen, por ejemplo, una biopsia en sacabocados) del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene a partir de una o más punción biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 20 punciones biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1 a 10 punciones biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 punción biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que la primera población de células T se obtiene de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 punción biópsica con aguja gruesa del tejido tumoral del donante.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: i) obtener y/o recibir una primera población de TIL de una muestra tumoral que se obtiene de una o más biopsias pequeñas, biopsias con aguja gruesa o biopsias con aguja fina de un tumor en un sujeto mediante el cultivo de la muestra tumoral en un primer medio de cultivo celular que comprende IL-2 por aproximadamente 3 días; (ii) realizar una primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de la primera población de TIL en un segundo medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza en un recipiente que comprende una primera área de superficie permeable a los gases, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza por un primer período de aproximadamente 7 u 8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es superior en número a la primera población de TIL; (iii) realizar una segunda expansión rápida al complementar el segundo medio de cultivo celular de la segunda población de TIL con IL-2, OKT-3 y APC adicionales, para producir una tercera población de TIL, en donde el número de APC que se añaden en la segunda expansión rápida es al menos el doble del número de APC que se añaden en la etapa (ii), en donde la segunda expansión rápida se realiza por un segundo período de aproximadamente 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza en un recipiente que comprende una segunda área de superficie permeable a los gases; (iv) cosechar la población terapéutica de TIL que se obtiene en la etapa (iii); y (v) transferir la población de TIL que se cosecha de la etapa (iv) a una bolsa de infusión.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para expandir linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en una población terapéutica de TIL que comprende: (i)

obtener y/o recibir una primera población de TIL de una muestra tumoral que se obtiene de una o más biopsias pequeñas, biopsias con aguja gruesa o biopsias con aguja fina de un tumor en un sujeto mediante el cultivo de la muestra tumoral en un primer medio de cultivo celular que comprende IL-2 por aproximadamente 3 días; (ii) realizar una primera expansión con sensibilización mediante el cultivo de la primera población de TIL en un segundo medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y células presentadoras de antígeno (APC) para producir una segunda población de TIL, en donde la primera expansión con sensibilización se realiza por un primer período de aproximadamente 7 u 8 días para obtener la segunda población de TIL, en donde la segunda población de TIL es superior en número a la primera población de TIL; (iii) realizar una segunda expansión rápida al poner en contacto la segunda población de TIL con un tercer medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3 y APC, para producir una tercera población de TIL, en donde la segunda expansión rápida se realiza para un segundo período de aproximadamente 11 días para obtener la tercera población de TIL, en donde la tercera población de TIL es una población terapéutica de TIL; y (iv) cosechar la población terapéutica de TIL que se obtiene en la etapa (iii).

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que después del día 5 del segundo período el cultivo se divide en 2 o más subcultivos, y cada subcultivo se complementa con una cantidad adicional del tercer medio de cultivo y se cultiva por aproximadamente 6 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que después del día 5 del segundo período el cultivo se divide en 2 o más subcultivos, y cada subcultivo se complementa con un cuarto medio de cultivo que comprende IL-2 y se cultiva por aproximadamente 6 días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que después del día 5 del segundo período el cultivo se divide en hasta 5 subcultivos.

En otra modalidad, la invención proporciona el método que se describe en cualquiera de los párrafos anteriores como se aplica anteriormente modificado de manera que todas las etapas del método se completen en aproximadamente 22 días.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para expandir células T que comprende: (i) realizar una primera expansión con sensibilización de una primera población de células T de una muestra tumoral que se obtiene de una o más biopsias pequeñas, biopsias con aguja gruesa o biopsias con aguja fina de un tumor en un donante mediante el cultivo de la primera población de células T para efectuar el crecimiento y sensibilizar una activación de la primera población de células T; (ii) después de la activación de la primera población de células T que se sensibilizan en la etapa (a) comienza a decaer, se realiza una segunda expansión rápida de la primera población de células T mediante el cultivo la primera población de células T para efectuar el crecimiento y estimular la activación de la primera población de células T para obtener una segunda población de células T; y (iv) cosechar la segunda población de células T. En algunas modalidades, la muestra tumoral se obtiene de una pluralidad de biopsias con aguja gruesa. En algunas modalidades, la pluralidad de biopsias con aguja gruesa se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 biopsias con aguja gruesa.

III. Procesos de Producción de TIL (modalidades del proceso 2A con medios definidos)

Un proceso de TIL ilustrativo conocido como proceso 2A que contiene algunas de estas características se representa en la Figura 1A y 109 (tal proceso también se describe en la Publicación de Patente Internacional WO/2018/182817).

Como se analiza en la presente descripción, la presente invención puede incluir una etapa que se relaciona con la nueva estimulación de TIL crioconservados para aumentar su actividad metabólica y por tanto la salud relativa antes del trasplante en un paciente, y métodos para probar dicha salud metabólica. Como se describe generalmente en la presente descripción, los TIL generalmente se toman de una muestra de paciente y se manipulan para expandir su número antes del trasplante en un paciente. En algunas modalidades, los TIL pueden manipularse genéticamente opcionalmente como se describe más abajo.

En algunas modalidades, los TIL pueden crioconservarse. Una vez descongelados, también pueden estimularse nuevamente para aumentar su metabolismo antes de la infusión en un paciente.

En algunas modalidades, la primera expansión (que incluyen los procesos que se denominan como preREP así como también los procesos mostrados en la Figura 109 como Etapa A) se reduce de 3 a 14 días y la segunda expansión (que incluyen los

procesos que se denominan como REP así como también los procesos mostrados en la Figura 109 como Etapa B) se reduce de 7 a 14 días, como se analiza en detalle más abajo así como también en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión (por ejemplo, una expansión que se describe como Etapa B en la Figura 109) se reduce a 11 días y la segunda expansión (por ejemplo, una expansión como se describe en la Etapa D en la Figura 109) se reduce a 11 días. En algunas modalidades, la combinación de la primera expansión y la segunda expansión (por ejemplo, las expansiones que se describen como Etapa B y Etapa D en la Figura 109) se acorta a 22 días, como se explica en detalle a continuación y en los ejemplos y figuras.

Las denominaciones de "Etapa" A, B, C, *etcétera*, más abajo se refieren a la Figura 109 y se refiere a determinadas modalidades que se describen en la presente descripción. El orden de las Etapas más abajo y en la Figura 109 es ilustrativo y cualquier combinación u orden de etapas, así como también etapas adicionales, repetición de etapas, y/u omisión de etapas se contemplan mediante la presente solicitud y los métodos que se describen en la presente descripción.

A. ETAPA A: Obtener una muestra tumoral del paciente

En general, los TIL se obtienen inicialmente de una muestra tumoral del paciente ("TIL primarios") y después se expanden a una población más grande para su manipulación adicional como se describe en la presente descripción, crioconservados de forma opcional, estimulados nuevamente como se describe en la presente descripción y que se evalúan de forma general para fenotipo y parámetros metabólicos como indicación de la salud de TIL.

Puede obtenerse una muestra tumoral de un paciente mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, generalmente mediante extirpación quirúrgica, biopsia con aguja u otros medios para obtener una muestra que contiene una mezcla de células tumorales y de TIL. En general, la muestra tumoral puede ser de cualquier tumor sólido, que incluye tumores primarios, tumores invasores o tumores metastásicos. La muestra tumoral también puede ser un tumor líquido, tal como un tumor que se obtiene de una neoplasia maligna hematológica. El tumor sólido puede ser de cualquier tipo de cáncer, que incluye, pero no se limita a, mama, páncreas, próstata, colorrectal, pulmón, cerebro, riñón, estómago y piel (que incluye, entre otros, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y melanoma). En algunas modalidades, se obtienen TIL útiles a partir de tumores de melanoma malignos, ya que se ha informado que estos tienen niveles particularmente altos de TIL.

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

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

Una vez que se obtiene, la muestra de tumor se fragmenta generalmente mediante el uso de disección con bisturí en pequeñas piezas de entre 1 y aproximadamente 8 mm^3, siendo particularmente útil los de aproximadamente 2-3 mm^3. Los TIL se cultivan a partir de estos fragmentos mediante el uso de digestiones tumorales enzimáticas. Tales digestiones tumorales pueden producirse mediante incubación en medios enzimáticos (por ejemplo, Tampón 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), glutamato 2 mM, gentamicina 10 mcg/mL, 30 unidades/mL de DNasa y 1,0 mg/mL de colagenasa) seguido de disociación mecánica (*por ejemplo*, mediante el uso de un disociador de tejidos). La digestión tumoral puede producirse al colocar el tumor en medios enzimáticos y disociar mecánicamente el tumor por aproximadamente 1 minuto, seguido

de la incubación por 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 %, seguido de ciclos repetidos de disociación mecánica y la incubación bajo las condiciones anteriores hasta que sólo pequeños trozos de tejido se encuentran presentes. Al final de este proceso, si la suspensión celular contiene una gran cantidad de eritrocitos o células muertas, puede realizarse una separación en gradiente de densidad mediante el uso de un polisacárido hidrófilo ramificado FICOLL para eliminar estas células. Pueden usarse métodos alternativos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. núm. 2012/0244133 A1, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. Cualquiera de los métodos anteriores puede usarse en cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción para métodos de expansión de TIL o métodos para tratar un cáncer.

En general, la suspensión celular que se cosecha se denomina "población de células primarias" o población de células "recién cosechada".

En algunas modalidades, la fragmentación incluye la fragmentación física, que incluye por ejemplo, disección así como también digestión. En algunas modalidades, la fragmentación es una fragmentación física. En algunas modalidades, la fragmentación es disección. En algunas modalidades, la fragmentación es mediante digestión. En algunas modalidades, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones tumorales enzimáticas y fragmentos tumorales que se obtienen de pacientes. En una modalidad, los TIL pueden cultivarse inicialmente a partir de digestiones tumorales enzimáticas y fragmentos tumorales que se obtienen de pacientes.

En algunas modalidades, donde el tumor es un tumor sólido, el tumor se somete a fragmentación física después que la muestra tumoral se obtiene en, por ejemplo, la Etapa A (como se proporciona en la Figura 109). En algunas modalidades, la fragmentación se produce antes de la crioconservación. En algunas modalidades, la fragmentación se produce después de la crioconservación. En algunas modalidades, la fragmentación se produce después de obtener el tumor y en ausencia de cualquier crioconservación. En algunas modalidades, el tumor se fragmenta y se colocan 10, 20, 30, 40 o más fragmentos o trozos en cada recipiente para la primera expansión. En algunas modalidades, el tumor se fragmenta y se colocan 30 o 40 fragmentos o piezas en cada recipiente para la primera expansión. En algunas modalidades, el tumor se fragmenta y se colocan 40 fragmentos o trozos en cada recipiente para la primera expansión. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente de 4 a aproximadamente 50 fragmentos, en donde cada fragmento

tiene un volumen de aproximadamente 27 mm^3. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1300 mm^3 a aproximadamente 1500 mm^3. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con un volumen total de aproximadamente 1350 mm^3. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 50 fragmentos con una masa total de aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 1,5 gramos. En algunas modalidades, los múltiples fragmentos comprenden aproximadamente 4 fragmentos.

En algunas modalidades, los TIL se obtienen a partir de fragmentos tumorales. En algunas modalidades, el fragmento de tumor se obtiene mediante disección con bisturí. En algunas modalidades, el fragmento de tumor está entre aproximadamente 1 mm^3 y 10 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento tumoral se encuentra entre aproximadamente 1 mm^3 y 8 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento tumoral se encuentra en aproximadamente 1 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento tumoral se encuentra en aproximadamente 2 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 3 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 4 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 5 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 6 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 7 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 8 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 9 mm^3. En algunas modalidades, el fragmento de tumor es de aproximadamente 10 mm^3.

En algunas modalidades, los TIL se obtienen a partir de digestiones del tumor. En algunas modalidades, se generaron digestiones tumorales mediante la incubación en medio enzimático, por ejemplo, pero que no se limita a RPMI 1640, GlutaMAX 2 mM, gentamicina 10 mg/mL, DNasa 30 U/mL y colagenasa 1,0 mg/mL, seguido de disociación mecánica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Después de colocar el tumor en medio enzimático, el tumor puede disociarse mecánicamente por aproximadamente 1 minuto. A continuación, la solución puede incubarse durante 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 % y después puede disociarse mecánicamente nuevamente durante aproximadamente 1 minuto. Después que se incuban de nuevo por 30 minutos a 37 °C en CO_2 al 5 %, el tumor puede disociarse mecánicamente una tercera vez por

aproximadamente 1 minuto. En algunas modalidades, después de la tercera disociación mecánica si grandes piezas de tejido estaban presentes, 1 o 2 disociaciones mecánicas adicionales se aplicaron a la muestra, con o sin 30 minutos adicionales de incubación a 37 °C en 5 % de CO_2. En algunas modalidades, al final de la incubación final si la suspensión celular contiene un gran número de glóbulos rojos o células muertas, puede realizarse una separación por gradiente de densidad mediante el uso de Ficoll para eliminar estas células.

En algunas modalidades, la suspensión celular que se cosecha antes de la primera etapa de expansión se denomina "población de células primarias" o población de células "recién cosechadas".

En algunas modalidades, las células pueden congelarse opcionalmente después de cosechar la muestra y almacenarla congelada antes de entrar en la expansión que se describe en la Etapa B, que se describe con más detalle más abajo, así como también se ejemplifica en la Figura 109.

B. ETAPA B: Primera expansión

1. TIL jóvenes

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

Los diversos receptores de antígenos de las células T y B se producen por recombinación somática de un número limitado, pero grande, de segmentos génicos. Estos segmentos génicos: V (variable), D (diversidad), J (unión) y C (constante), determinan la especificidad de unión y las aplicaciones posteriores de inmunoglobulinas y receptores de células T (TCR). La presente invención proporciona un método para

generar TIL que exhiben y aumentan la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen mediante el presente método exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen mediante el presente método exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T en comparación con los TIL recién cosechados y/o TIL que se preparan mediante el uso de otros métodos distintos de aquellos que se proporcionan en la presente descripción que incluyen por ejemplo, métodos distintos de aquellos que se incorporan en la Figura 109. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen en la primera expansión exhiben un aumento en la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, el aumento en la diversidad es un aumento en la diversidad de inmunoglobulinas y/o la diversidad del receptor de células T. En algunas modalidades, la diversidad en la inmunoglobulina se encuentra en la cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la diversidad en la inmunoglobulina se encuentra en la cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la diversidad se encuentra en el receptor de células T. En algunas modalidades, la diversidad se encuentra en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión de TCRab (es decir, TCRα/β).

Después de la disección o digestión de los fragmentos tumorales, por ejemplo tal como se describe en la Etapa A de la Figura 109, las células resultantes se cultivan en suero que contiene IL-2 bajo condiciones que favorecen el crecimiento de TIL sobre el tumor y otras células. En algunas modalidades, las digestiones tumorales se incuban en pocillos de 2 mL en un medio que comprende suero AB humano inactivado con 6000 UI/mL de IL-2. Esta población de células primarias se cultiva por un período de días, generalmente de 3 a 14 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta población de células primarias se cultiva por un período de 7 a 14 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta población de células primarias se cultiva por un período de 10 a 14 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células

TIL mayoritarias. En algunas modalidades, esta población de células primarias se cultiva por un período de aproximadamente 11 días, lo que resulta en una población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritaria.

En una modalidad preferida, la expansión de TIL puede realizarse mediante el uso de una etapa inicial de expansión de TIL mayoritaria (por ejemplo, tal como aquellos que se describen en la Etapa B de la Figura 109, que puede incluir procesos denominados como pre-REP) como se describe más abajo y en la presente descripción, seguido de una segunda expansión (Etapa D, que incluye los procesos denominados como etapas del protocolo de expansión rápida (REP)) como se describe más abajo bajo la Etapa D y en la presente descripción, seguido de la crioconservación opcional, y seguido de una segunda Etapa D (que incluye los procesos denominados como etapas de nueva estimulación REP) como se describe más abajo y en la presente descripción. Los TIL que se obtienen de este proceso pueden caracterizarse opcionalmente en base a características fenotípicas y parámetros metabólicos como se describe en la presente descripción.

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

En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión se denomina como "CM", una abreviatura para medios de cultivo. En algunas modalidades, el CM para la Etapa B consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, que se complementa con suero AB humano al 10 %, Hepes 25 mM, y gentamicina 10 mg/mL. En modalidades donde los cultivos se inician en frascos permeables a los gases con una capacidad de 40 mL y un fondo de silicona permeable a los gases de 10 cm^2 (por ejemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Figura 1), cada frasco se cargó con $10–40\times10^6$ células de digestión tumoral viables o 5–30 fragmentos tumorales en 10–40 mL de CM con IL-2. Tanto las placas de G-Rex10 como las de 24 pocillos se incubaron en una incubadora húmeda a 37 °C en CO_2 al 5 % y 5 días después del inicio del cultivo, se eliminó la mitad del medio y se sustituyó con CM e IL-2 recién preparados y después del día 5, la mitad del medio se cambió cada 2-3 días.

Después de la preparación de los fragmentos tumorales, las células resultantes (es decir, los fragmentos) se cultivan en suero que contiene IL-2 bajo condiciones que favorecen el crecimiento de TIL sobre el tumor y otras células. En algunas modalidades, las digestiones tumorales se incuban en pocillos de 2 mL en un medio que comprende suero AB humano inactivado (o, en algunos casos, como se describe en la presente descripción, en presencia de una población de células APC) con 6000 UI/mL de IL-2. Esta población de células primarias se cultiva por un período de días, generalmente de 10 a 14 días, lo que resulta en población de TIL mayoritaria, generalmente de aproximadamente 1×10^8 células TIL mayoritarias. En algunas modalidades, el medio de crecimiento durante la primera expansión comprende IL-2 o una variante de la misma. En algunas modalidades, la IL es IL-2 humana recombinante (rhIL-2). En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de 20-30x10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de 20x10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de 25x10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una actividad específica de 30x10^6 UI/mg para un vial de 1 mg. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una concentración final de 4-8x10^6 UI/mg de IL-2. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una concentración final de 5-7x10^6 UI/mg de IL-2. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 tiene una concentración final de 6x10^6 UI/mg de IL-2. En algunas modalidades, la solución de reserva de IL-2 se prepara como se describe en el Ejemplo 4. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 10 000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 9000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 7000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2 o aproximadamente 5000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 9000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 5000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 7000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular

comprende aproximadamente 3000 UI/ml de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende además IL-2. En una modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1000 UI/ml, aproximadamente 1500 UI/ml, aproximadamente 2000 UI/ml, aproximadamente 2500 UI/ml, aproximadamente 3000 UI/ml, aproximadamente 3500 UI/ml, aproximadamente 4000 UI/ml, aproximadamente 4500 UI/ml, aproximadamente 5000 UI/ml, aproximadamente 5500 UI/ml, aproximadamente 6000 UI/ml, aproximadamente 6500 UI/ml, aproximadamente 7000 UI/ml, aproximadamente 7500 UI/ml o aproximadamente 8000 UI/ml de IL-2. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende entre 1000 y 2000 UI/mL, entre 2000 y 3000 UI/mL, entre 3000 y 4000 UI/mL, entre 4000 y 5000 UI/mL, entre 5000 y 6000 UI/mL, entre 6000 y 7000 UI/mL, entre 7000 y 8000 UI/mL, o aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2.

En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15, aproximadamente 400 UI/mL de IL-15, aproximadamente 300 UI/mL de IL-15, aproximadamente 200 UI/mL de IL-15, aproximadamente 180 UI/mL de IL-15, aproximadamente 160 UI/mL de IL-15, aproximadamente 140 UI/mL de IL-15, aproximadamente 120 UI/mL de IL-15 o aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende adicionalmente IL-15. En una modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 180 UI/ml de IL-15.

En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 20 UI/mL de IL-21, aproximadamente 15 UI/mL de IL-21, aproximadamente 12 UI/mL de IL-21, aproximadamente 10 UI/mL de IL-21, aproximadamente 5 UI/mL de IL-21, aproximadamente 4 UI/mL de IL-21,

aproximadamente 3 UI/mL de IL-21, aproximadamente 2 UI/mL de IL-21, aproximadamente 1 UI/mL de IL-21, o aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende adicionalmente IL-21. En una modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

En algunas modalidades, el primer medio de cultivo de expansión se denomina como "CM", una abreviatura para medios de cultivo. En algunas modalidades, se denomina CM1 (medio de cultivo 1). En algunas modalidades, el CM consiste en RPMI 1640 con GlutaMAX, suplementado con suero AB humano al 10 %, Hepes 25 mM y gentamicina 10 mg/ml. En modalidades donde los cultivos se inician en frascos permeables a los gases con una capacidad de 40 mL y un fondo de silicona permeable a los gases de 10 cm^2 (por ejemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Figura 1), cada frasco se cargó con 10–40x10^6 células de digestión tumoral viables o 5–30 fragmentos tumorales en 10–40 mL de CM con IL-2. Tanto las placas de G-Rex10 como las de 24 pocillos se incubaron en una incubadora húmeda a 37 °C en CO_2 al 5 % y 5 días después del inicio del cultivo, se eliminó la mitad del medio y se sustituyó con CM e IL-2 recién preparados y después del día 5, la mitad del medio se cambió cada 2-3 días. En algunas modalidades, el CM es el CM1 que se describe en los Ejemplos, ver, Ejemplo 5. En algunas modalidades, la primera expansión ocurre en un medio de cultivo celular inicial o en un primer medio de cultivo celular. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular inicial o el primer medio de cultivo celular comprenden IL-2.

En algunas modalidades, el proceso de la primera expansión (que incluye procesos tales como por ejemplo, aquellos que se describen en la Etapa B de la Figura 109, que pueden incluir aquellos que a veces se denominan como pre-REP) se reduce de 3-14 días, como se analiza en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión (que incluye procesos tales como por ejemplo, los que se describen en la Etapa B de la Figura 109, que pueden incluir aquellos que a veces se denominan como pre-REP) se reduce de 7 a 14 días, como se analiza en los Ejemplos y es mostrado en las Figuras 4 y 5, así como también se incluye por ejemplo, una expansión como se describe en la Etapa B de la Figura 109. En algunas modalidades, la primera expansión de la Etapa B se reduce de 10-14 días, como se analiza en los Ejemplos y es mostrado en las Figuras 4 y 5. En algunas modalidades, la primera expansión se reduce a 11 días, así como también se incluye por ejemplo, una expansión como se describe en la Etapa B de la Figura 109.

En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar por 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, o 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 1 día a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 2 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 3 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 4 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 5 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 6 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 7 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 8 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 9 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 10 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 11 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 12 a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 13 días a 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar por 14 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 1 día a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 2 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 3 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 4 a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 5 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar

de 6 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 7 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 8 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 9 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar de 10 días a 11 días. En algunas modalidades, la primera expansión de TIL puede continuar por 11 días.

En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21 como una combinación durante la primera expansión. En algunas modalidades, pueden incluirse IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21, así como también cualquier combinación de las mismas, durante la primera expansión, lo que incluye por ejemplo, durante un proceso de la Etapa B de acuerdo con la Figura 109, como así también se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 como una combinación durante la primera expansión. En algunas modalidades, pueden incluirse IL-2, IL-15, e IL-21, así como también cualquier combinación de las mismas durante los procesos de la Etapa B de acuerdo con la Figura 109 y como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el primer proceso de expansión (que incluye los procesos denominados como pre-REP; por ejemplo, Etapa B de acuerdo con la Figura 109) se reduce de 3 a 14 días, como se analiza en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la primera expansión de la Etapa B se reduce de 7 a 14 días, como se analiza en los Ejemplos y es mostrado en las Figuras 4 y 5. En algunas modalidades, la primera expansión de la Etapa B se reduce de 10 a 14 días, como se analiza en los Ejemplos y es mostrado en las Figuras 4, 5, y 27. En algunas modalidades, la primera expansión se reduce a 11 días.

En algunas modalidades, la primera expansión, por ejemplo, la Etapa B de acuerdo con la Figura 109, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un único biorreactor. En algunas modalidades, el único biorreactor que se emplea es, por ejemplo, un G-REX-10 o un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

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

En algunos casos, la población de TIL mayoritaria que se obtiene de la primera expansión, que incluye por ejemplo, la población de TIL que se obtiene de, por ejemplo,

la Etapa B como se indica en la Figura 109, puede crioconservarse inmediatamente, mediante el uso de los protocolos que se analizan más abajo en la presente descripción. Alternativamente, la población de TIL que se obtiene de la primera expansión, denominada como segunda población de TIL, puede someterse a una segunda expansión (que puede incluir expansiones a veces denominadas como REP) y después crioconservarse como se analiza más abajo. De manera similar, en el caso donde se usarán TIL modificados genéticamente en terapia, la primera población de TIL (a veces denominada como población de TIL mayoritaria) o la segunda población de TIL (que en algunas modalidades puede incluir poblaciones denominadas como poblaciones de REP TIL) puede someterse a modificaciones genéticas para tratamientos adecuados antes de la expansión o después de la primera expansión y antes de la segunda expansión.

En algunas modalidades, los TIL que se obtienen de la primera expansión (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 109) se almacenan hasta que se caracterizan en base al fenotipo para la selección. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen de la primera expansión (por ejemplo, de la Etapa B como se indica en la Figura 109) no se almacenan y pueden pasar directamente a la segunda expansión. En algunas modalidades, los TIL que se obtienen de la primera expansión no se crioconservan después de la primera expansión y antes de la segunda expansión. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a aproximadamente 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, o 14 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre aproximadamente de 3 a 14 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre aproximadamente de 4 días a 14 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre aproximadamente de 4 días a 10 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre aproximadamente de 7 días a 14 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a aproximadamente 14 días de cuando ocurre la fragmentación.

En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11

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

fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 7 días a 11 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 8 días a 11 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 9 días a 11 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre de 10 días a 11 días de cuando ocurre la fragmentación. En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión ocurre a 11 días de cuando ocurre la fragmentación.

En algunas modalidades, los TIL no se almacenan después de la primera expansión y antes de la segunda expansión, y los TIL pueden pasar directamente a la segunda expansión (por ejemplo, en algunas modalidades, no existe almacenamiento durante la transición de la Etapa B a la Etapa D como es mostrado en la Figura 109). En algunas modalidades, la transición ocurre en un sistema cerrado, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL de la primera expansión, la segunda población de TIL, procede directamente a la segunda expansión sin período de transición.

En algunas modalidades, la transición de la primera expansión a la segunda expansión, por ejemplo, la etapa C de acuerdo con la Figura 109, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un único biorreactor. En algunas modalidades, el único biorreactor que se emplea es, por ejemplo, un G-REX-10 o un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

En algunas modalidades, el medio de cultivo que se usa en los procesos de expansión que se describen en la presente descripción es un medio libre de suero o un medio definido. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o un sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido se usa para prevenir y/o disminuir la variación experimental debido en parte a la variación de lote a lote de los medios que contienen suero.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio de células basales incluye, pero no se limita al Medio Basal de

Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, el suplemento de suero o sustituto del suero incluye, pero no se limita a uno o más del Suplemento de Suero de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™, una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos, y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o 2-mercaptoetanol.

En algunas modalidades, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias de Células T CTS™ OpTmizer™ se usa con medios de crecimiento convencionales, que incluyen pero no se limitan al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración total de sustituto de suero (% en volumen) en el medio libre de suero o definido es de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % en volumen del medio total libre de suero o definido. En algunas modalidades, la

concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 3 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 5 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 10 % del volumen total del medio libre de suero o definido.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM.

En algunas modalidades, el medio definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina. En algunas modalidades, el SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente el 3 % del sustituto de suero de células inmunitarias (SR) CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina, y comprende además de aproximadamente 1000 UI/ml a aproximadamente 8000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas

modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, de 0,5 mM a aproximadamente 9 mM, de 1 mM a aproximadamente 8 mM, de 2 mM a aproximadamente 7 mM, de 3 mM a aproximadamente 6 mM, o de 4 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de 10 mM a aproximadamente 140 mM, de 15 mM a aproximadamente 130 mM, de 20 mM a aproximadamente 120 mM, de 25 mM a aproximadamente 110 mM, de 30 mM a aproximadamente 100 mM, de 35 mM a aproximadamente 95 mM, de 40 mM a aproximadamente 90 mM, de 45 mM a aproximadamente 85 mM, de 50 mM a aproximadamente 80 mM, de 55 mM a aproximadamente 75 mM, de 60 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 65 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55 mM.

En algunas modalidades, los medios definidos que se describen en la Publicación del PCT Internacional Número WO/1998/030679, que se incorpora en la presente descripción como referencia, son útiles en la presente invención. En esa publicación, se describen medios de cultivo de células eucariotas sin suero. El medio de cultivo para células eucariotas sin suero incluye un medio de cultivo de células basales suplementado con un suplemento sin suero capaz de apoyar el crecimiento de las células en un cultivo sin suero. El suplemento del medio de cultivo de células eucariotas libre de suero comprende o se obtiene mediante la combinación de uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más oligoelementos, y uno o más antibióticos. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o beta-mercaptoetanol. En algunas modalidades, el medio definido comprende una albúmina o un sustituto de albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio de

células basales se selecciona del grupo que consiste en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración de glicina en el medio definido se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-histidina se encuentra de aproximadamente 5-250 mg/L, la concentración de L-isoleucina se encuentra de aproximadamente 5-300 mg/L, la concentración de L-metionina se encuentra de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-fenilalanina se encuentra de aproximadamente 5-400 mg/L, la concentración de L-prolina se encuentra de aproximadamente 1-1000 mg/L, la concentración de L-hidroxiprolina se encuentra de aproximadamente 1-45 mg/L, la concentración de L-serina se encuentra de aproximadamente 1-250 mg/L, la concentración de L-treonina se encuentra de aproximadamente 10-500 mg/L, la concentración de L-triptófano se encuentra de aproximadamente 2-110 mg/L, la concentración de L-tirosina se encuentra de aproximadamente 3-175 mg/L, la concentración de L-valina se encuentra de aproximadamente 5-500 mg/L, la concentración de tiamina se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de glutatión reducido se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de ácido L-ascórbico-2-fosfato se encuentra de aproximadamente 1-200 mg/L, la concentración de transferrina saturada de hierro se encuentra de aproximadamente 1-50 mg/L, la concentración de insulina se encuentra de aproximadamente 1-100 mg/L, la concentración de selenito de sodio se encuentra de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y la concentración de albúmina (por ejemplo, AlbuMAX®I) se encuentra de aproximadamente 5000-50 000 mg/L.

En algunas modalidades, los ingredientes sin porción de oligoelementos en el medio definido se encuentran presentes en los intervalos de concentración que se enumeran en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en el Medio 1X" en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, los ingredientes de las porciones que no son oligoelementos en el medio definido están presentes en las concentraciones finales enumeradas en la columna bajo el título “Una Modalidad Preferida del Medio 1X” en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, el medio definido es un medio de células basales que comprende un suplemento libre de suero. En algunas de estas modalidades, el suplemento libre de suero comprende ingredientes de las porciones que

no son oligoelementos del tipo y en las concentraciones enumeradas en la columna bajo el título “Una modalidad preferida en el suplemento” en la Tabla A más abajo.

Tabla A: Concentraciones de Ingredientes Sin Porción de Oligoelementos

Ingrediente	Una modalidad preferida en suplemento (mg/L) (aproximadamente)	Intervalo de concentración en el medio 1X (mg/l) (aproximadamente)	Una modalidad preferida en el medio 1X (mg/L) (aproximadamente)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-Isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-Fenilalanina	1800	5-400	336
L-prolina	4000	1-1000	600
L-Hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-Treonina	2200	10-500	425
L-triptófano	440	2-110	82
L-Tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutatión Reducido	10	1-20	1,5
Ácido Ascórbico-2-PO_4 (mg de sal)	330	1-200	50
Transferrina	55	1-50	8

(saturado de hierro)			
Insulina	100	1-100	10
Selenito de Sodio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50 000	12,500

En algunas modalidades, la osmolaridad del medio definido se encuentra entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol. En algunas modalidades, la osmolaridad se encuentra entre aproximadamente 280 y 310 mOsmol. En algunas modalidades, el medio definido se complementa con hasta aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio. El medio definido puede suplementarse además con L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM), 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

En algunas modalidades, el medio definido que se describe en Smith, y otros, “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” *Clin Transl Immunology*, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) son útiles en la presente invención. Brevemente, se usa RPMI o CTS™ OpTmizer™ como medio de células basales y se complementa ya sea con 0, 2 %, 5 %, o 10 % de Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™.

En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

D. ETAPA D: Segunda expansión

En algunas modalidades, la población de células de TIL se expande en número después de la cosecha y el procesamiento inicial mayoritario por ejemplo, después de la Etapa A y la Etapa B, y la transición que se denomina como Etapa C, como se indica en la Figura 109). Esta expansión adicional se denomina en la presente descripción como la segunda

expansión, que puede incluir procesos de expansión que generalmente se denominan en la técnica como procesos de expansión rápida (REP; así como también procesos como se indica en la Etapa D de la Figura 109). La segunda expansión se alcanza generalmente mediante el uso de un medio de cultivo que comprende un número de componentes, que incluyen células alimentadoras, una fuente de citocinas, y un anticuerpo anti-CD3, en un recipiente permeable a los gases.

En algunas modalidades, la segunda expansión o segunda expansión de TIL (que puede incluir expansiones a veces denominadas como REP; así como también los procesos como se indican en la Etapa D de la Figura 109) de TIL puede realizarse mediante el uso de cualquier frasco o recipiente de TIL conocido por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar por 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, o 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar de aproximadamente 7 días a aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar de aproximadamente 8 días a aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar de aproximadamente 9 días a aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar de aproximadamente 10 días a aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar de aproximadamente 11 días a aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar de aproximadamente 12 días a aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar de aproximadamente 13 días a aproximadamente 14 días. En algunas modalidades, la segunda expansión de TIL puede continuar por aproximadamente 14 días.

En una modalidad, la segunda expansión puede realizarse en un recipiente permeable a los gases mediante el uso de los métodos de la presente descripción (que incluyen por ejemplo, las expansiones denominadas como REP; así como también los procesos como se indican en la etapa D de la Figura 109). Por ejemplo, los TIL pueden expandirse rápidamente mediante el uso de la estimulación inespecífica del receptor de células T en presencia de interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15). El estímulo inespecífico del receptor de células T puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, tal como aproximadamente 30 ng/mL de OKT3, un anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (disponible comercialmente en Ortho-McNeil, Raritan, NJ o Miltenyi Biotech, Auburn, CA) o UHCT-1 (disponible comercialmente en BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.). Los

TIL pueden expandirse para inducir una estimulación adicional de los TIL *in vitro* al incluir uno o más antígenos durante la segunda expansión, que incluye porciones antigénicas de los mismos, tal como epítopo(s) del cáncer, que pueden expresarse de forma opcional a partir de un vector, tal como un péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), por ejemplo, 0,3 µM de MART-1: 26-35 (27 L) o gpl 00:209-217 (210 M), de forma opcional en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como 300 UI/mL de IL-2 o IL-15. Otros antígenos adecuados pueden incluir, por ejemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno de cáncer de tirosinasa, MAGE-A3, SSX-2 y VEGFR2, o porciones antigénicas de los mismos. Los TIL también pueden expandirse rápidamente mediante una nueva estimulación con el mismo antígeno(s) del cáncer que se pulsan sobre células presentadoras de antígeno que expresan HLA-A2. Alternativamente, los TIL pueden estimularse nuevamente con, por ejemplo, linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. En algunas modalidades, la nueva estimulación ocurre como parte de la segunda expansión. En algunas modalidades, la segunda expansión ocurre en presencia de linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ e IL-2 irradiados.

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

En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende un anticuerpo OKT3. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 30 ng/mL del anticuerpo OKT3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,1 ng/mL, aproximadamente 0,5 ng/mL, aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente 2,5 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 7,5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL,

aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, aproximadamente 100 ng/mL, aproximadamente 200 ng/mL, aproximadamente 500 ng/mL, y aproximadamente 1 µg/mL del anticuerpo OKT3. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende entre 0,1 ng/mL y 1 ng/mL, entre 1 ng/mL y 5 ng/mL, entre 5 ng/mL y 10 ng/mL, entre 10 ng/mL y 20 ng/mL, entre 20 ng/mL y 30 ng/mL, entre 30 ng/mL y 40 ng/mL, entre 40 ng/mL y 50 ng/mL, y entre 50 ng/mL y 100 ng/mL del anticuerpo OKT3.

En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21 como una combinación durante la segunda expansión. En algunas modalidades, pueden incluirse IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21, así como también cualquier combinación de las mismas, durante la segunda expansión, que incluye por ejemplo, durante un proceso de la Etapa D de acuerdo con la Figura 109, así como también se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea una combinación de IL-2, IL-15, e IL-21 como una combinación durante la segunda expansión. En algunas modalidades, pueden incluirse IL-2, IL-15, e IL-21, así como también cualquier combinación de las mismas, durante los procesos de la Etapa D de acuerdo con la Figura 109 y como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, la segunda expansión puede llevarse a cabo en un medio de cultivo celular suplementado que comprende IL-2, OKT-3 y células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas modalidades, la segunda expansión ocurre en un medio de cultivo celular suplementado. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular suplementado comprende IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo celular comprende IL-2, OKT-3, y células presentadoras de antígenos (APC; también denominadas como células alimentadoras presentadoras de antígeno). En algunas modalidades, la segunda expansión ocurre en un medio de cultivo celular que comprende IL-2, OKT-3, y células alimentadoras presentadoras de antígeno (es decir, células presentadoras de antígeno).

En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15, aproximadamente 400 UI/mL de IL-15, aproximadamente 300 UI/mL de IL-15, aproximadamente 200 UI/mL de IL-15, aproximadamente 180 UI/mL de IL-15, aproximadamente 160 UI/mL de IL-15, aproximadamente 140 UI/mL de IL-15, aproximadamente 120 UI/mL de IL-15, o

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

En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 20 UI/ml de IL-21, aproximadamente 15 UI/ml de IL-21, aproximadamente 12 UI/ml de IL-21, aproximadamente 10 UI/ml de IL-21, aproximadamente 5 UI/ml de IL-21, aproximadamente 4 UI/ml de IL-21, aproximadamente 3 UI/ml de IL-21, aproximadamente 2 UI/ml de IL-21, aproximadamente 1 UI/ml de IL-21, o aproximadamente 0,5 UI/ml de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende de aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el segundo medio de cultivo de expansión comprende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. En algunas modalidades, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. En una modalidad, el medio de cultivo celular comprende adicionalmente IL-21. En una modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

En algunas modalidades las células alimentadoras presentadoras de antígeno (APC) son PBMC. En una modalidad, la relación de TIL a PBMC y/o células presentadoras de antígeno en la expansión rápida y/o la segunda expansión es de aproximadamente 1 a 25, de aproximadamente 1 a 50, de aproximadamente 1 a 100, de aproximadamente 1 a 125, de aproximadamente 1 a 150, de aproximadamente 1 a 175, de aproximadamente 1 a 200, de aproximadamente 1 a 225, de aproximadamente 1 a 250, de aproximadamente 1 a 275, de aproximadamente 1 a 300, de aproximadamente 1 a 325, de aproximadamente 1 a 350, de aproximadamente 1 a 375, de aproximadamente 1 a 400, o de aproximadamente 1 a 500. En una modalidad, la relación entre TIL y PBMC en la expansión rápida y/o la segunda expansión está entre 1 a 50 y 1 a 300. En una modalidad, la proporción de TIL a PBMC en la expansión rápida y/o la segunda expansión se encuentra entre 1 a 100 y 1 a 200.

En una modalidad, REP y/o la segunda expansión se realiza en frascos con los TIL mayoritarios que se mezclan con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, 30 mg/mL del anticuerpo anti-CD3 OKT3 y 3000 UI/mL de IL-2 en 150 mL del medio. Se realiza la sustitución del medio (generalmente 2/3 de sustitución del medio mediante respiración con medio recién preparado) hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. Las cámaras de crecimiento alternativas incluyen frascos G-REX y recipientes permeables a los gases como se analiza con más detalle más abajo.

En algunas modalidades, la segunda expansión (que puede incluir procesos denominados como proceso REP) se reduce de 7-14 días, como se analiza en los ejemplos y figuras. En algunas modalidades, la segunda expansión se reduce a 11 días.

En una modalidad, el REP y/o la segunda expansión pueden realizarse mediante el uso de frascos T-175 y bolsas permeables a los gases como se describe previamente (Tran, *y otros*, *J. Immunother.* 2008, *31,* 742-51; Dudley, *y otros*, *J. Immunother.* 2003, *26,* 332-42) o material de cultivo permeable a los gases (frascos G-Rex). En algunas modalidades, la segunda expansión (que incluye las expansiones denominadas como expansiones rápidas) se realiza en frascos T-175, y pueden añadirse aproximadamente $1x10^6$ TIL suspendidos en 150 mL de medio a cada frasco T-175. Los TIL pueden cultivarse en una mezcla 1 a 1 de medio CM y AIM-V, que se complementa con 3000 UI por mL de IL-2 y 30 ng por mL de anti-CD3. Los frascos T-175 pueden incubarse a 37 °C en CO_2 al 5 %. La mitad del medio puede intercambiarse el día 5 mediante el uso de medio 50/50 con 3000 UI por mL de IL-2. En algunas modalidades, el día 7 las células

de dos frascos T-175 pueden combinarse en una bolsa de 3 L y 300 mL de AIM V con suero AB humano al 5 % y se añadieron 3000 UI por mL de IL-2 a los 300 mL de suspensión de TIL. El número de células en cada bolsa se contó cada uno o dos días y se añadió medio recién preparado para mantener el recuento de células entre 0,5 y 2,0x10^6 células/mL.

En una modalidad, la segunda expansión (que puede incluir expansiones denominadas como REP, así como también aquellas que se denominan en la Etapa D de la Figura 109) puede realizarse en frascos permeables a los gases de 500 mL de capacidad con fondos de silicona permeables a los gases de 100 cm (G-Rex 100, disponible comercialmente en Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EE.UU.), pueden cultivarse 5×10^6 o 10×10^6 TIL con PBMC en 400 mL de medio 50/50, que se complementa con suero AB humano al 5 %, 3000 UI por mL de IL-2 y 30 ng por mL de anti-CD3 (OKT3). Los frascos G-Rex 100 pueden incubarse a 37 °C en CO_2 al 5 %. El día 5, pueden retirarse 250 ml de sobrenadante y colocarse en botellas de centrífuga y centrifugarse a 1500 rpm (491 × g) durante 10 minutos. Los sedimentos de TIL pueden suspenderse nuevamente con 150 mL de medio recién preparado con suero AB humano al 5 %, 3000 UI por mL de IL-2, y pueden volverse a añadir a los frascos G-Rex 100 originales. Cuando los TIL se expanden en serie en frascos G-Rex 100, el día 7 los TIL en cada G-Rex 100 pueden suspenderse nuevamente en los 300 mL de medio presentes en cada frasco y la suspensión celular puede dividirse en 3 alícuotas de 100 mL que pueden usarse para sembrar 3 frascos G-Rex 100. Después pueden añadirse a cada frasco 150 mL de AIM-V con suero AB humano al 5 % y 3000 UI por mL de IL-2. Los frascos G-Rex 100 pueden incubarse a 37 °C en 5 % de CO_2 y después de 4 días pueden añadirse 150 mL de AIM-V con 3000 UI por mL de IL-2 a cada frasco G-REX 100. Las células pueden cosecharse el día 14 de cultivo.

En una modalidad, la segunda expansión (que incluye las expansiones denominadas como REP) se realiza en frascos con los TIL mayoritarios que se mezclan con un exceso de 100 o 200 veces de células alimentadoras inactivadas, 30 mg/mL de anticuerpo anti-CD3 OKT3 y 3000 UI/mL de IL-2 en 150 mL del medio. En algunas modalidades, el cambio del medio se realiza hasta que las células se transfieren a una cámara de crecimiento alternativa. En algunas modalidades, 2/3 del medio se cambia mediante respiración con medio recién preparado. En algunas modalidades, las cámaras de crecimiento alternativas incluyen frascos G-REX y recipientes permeables a los gases como se analiza con más detalle más abajo.

En una modalidad, se realiza la segunda expansión (que incluye las expansiones denominadas como REP) y comprende adicionalmente una etapa en donde los TIL se seleccionan para una reactividad tumoral superior. Puede usarse cualquier método de selección conocido en la técnica. Por ejemplo, los métodos que se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. Número 2016/0010058 A1, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia, pueden usarse para la selección de TIL para una reactividad tumoral superior.

De forma opcional, puede realizarse un ensayo de viabilidad celular después de la segunda expansión (que incluye las expansiones denominadas como expansión REP), mediante el uso de ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de exclusión con azul tripán en una muestra de TIL mayoritaria, que marca selectivamente las células muertas y permite una evaluación de la viabilidad. En algunas modalidades, las muestras de TIL pueden contarse y determinar la viabilidad mediante el uso de un contador celular automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). En algunas modalidades, la viabilidad se determina de acuerdo con el protocolo del Contador de Células Automático del Citómetro de Imagen Cellometer K2 que se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 15.

En algunas modalidades, la segunda expansión (que incluye las expansiones denominadas como REP) de TIL puede realizarse mediante el uso de frascos T-175 y bolsas permeables a los gases como se describe anteriormente (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, y otros, 2008, *J Immunother*, 31:742-751, y Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, y otros, *2003, J Immunother*, 26:332-342) o frascos G-Rex permeables a los gases. En algunas modalidades, la segunda expansión se realiza mediante el uso de frascos. En algunas modalidades, la segunda expansión se realiza mediante el uso de frascos G-Rex permeables a los gases. En algunas modalidades, la segunda expansión se realiza en frascos T-175, y aproximadamente $1x10^6$ TIL se suspenden en aproximadamente 150 mL de medio y esto se añade a cada frasco T-175. Los TIL se cultivan con PBMC alogénicas irradiadas (50 Gy) como células " alimentadoras " en una relación de 1 a 100 y las células se cultivan en una mezcla 1 a 1 de medio CM y AIM-V (medio 50/50), que se complementa con 3000 UI/mL de IL-2 y 30 ng/mL de anti-CD3. Los frascos T-175 se incuban a 37 °C en CO_2 al 5 %. En algunas modalidades, la mitad del medio se cambia el día 5 mediante el uso de medio 50/50 con 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el día 7, las células de 2 frascos T-175 se combinan en una bolsa de 3 L y se añaden 300 mL de AIM-V con suero AB humano al 5 % y 3000 UI/mL de IL-2 de suspensión de TIL. El número de células en cada bolsa puede contarse cada

uno o dos días y pueden añadirse medios recién preparados para mantener el recuento de células entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2,0x10^6 células/mL.

En algunas modalidades, la segunda expansión (que incluye las expansiones denominadas como REP) se realiza en frascos de 500 mL de capacidad con fondos de silicona de 100 cm^2 permeables a los gases (G-Rex 100, Wilson Wolf) (Figura 1), pueden cultivarse aproximadamente 5x10^6 o 10x10^6 TIL con PBMC alogénicas irradiadas en una relación de 1 a 100 en 400 mL de medio 50/50, que se complementa con 3000 UI/mL de IL-2 y 30 ng/mL de anti-CD3. Los frascos G-Rex 100 se incuban a 37 °C en CO_2 al 5 %. En algunas modalidades, el día 5, se eliminan 250 mL de sobrenadante y se colocan en botellas de centrífuga y se centrifugan a 1500 rpm (491 g) por 10 minutos. Los sedimentos de TIL pueden suspenderse nuevamente con 150 mL de medio recién preparado 50/50 con 3000 UI/mL de IL-2 y pueden volverse a añadir a los frascos G-Rex 100 originales. En las modalidades en las que los TIL se expanden en serie en frascos G-Rex 100, el día 7, los TIL de cada G-Rex 100 se suspenden en 300 mL del medio presente en cada frasco y la suspensión celular se divide en tres alícuotas de 100 mL que se usan para sembrar 3 frascos G-Rex 100. Después se añaden a cada frasco 150 mL de AIM-V con suero AB humano al 5 % y 3000 UI/mL de IL-2. Los frascos G-Rex 100 se incuban a 37 °C en CO_2 al 5 % y después de 4 días se añaden 150 mL de AIM-V con 3000 UI/mL de IL-2 a cada frasco G-Rex 100. Las células se cosechan el día 14 de cultivo.

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

modalidades, la diversidad se encuentra en el receptor de células T. En algunas modalidades, la diversidad se encuentra en uno de los receptores de células T seleccionados del grupo que consiste en receptores alfa, beta, gamma, y delta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa y/o beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) alfa. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión del receptor de células T (TCR) beta. En algunas modalidades, existe un aumento en la expresión de TCRab (es decir, TCRα/β).

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

En algunas modalidades, la segunda expansión, por ejemplo, la Etapa D de acuerdo con la Figura 109, se realiza en un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un único biorreactor. En algunas modalidades, el único biorreactor que se emplea es, por ejemplo, un G-REX-10 o un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

En algunas modalidades, el medio de cultivo que se usa en los procesos de expansión que se describen en la presente descripción es un medio libre de suero o un medio definido. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o un sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido se usa para prevenir y/o disminuir la variación experimental debido en parte a la variación de lote a lote de los medios que contienen suero.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio de células basales incluye, pero no se limita al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI

1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, el suplemento de suero o sustituto del suero incluye, pero no se limita a uno o más del Suplemento de Suero de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™, una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos, y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o 2-mercaptoetanol.

En algunas modalidades, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias de Células T CTS™ OpTmizer™ se usa con medios de crecimiento convencionales, que incluyen pero no se limitan al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración total de sustituto de suero (% en volumen) en el medio libre de suero o definido es de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % en volumen del medio total libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 3 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 5 % del volumen total del medio libre de suero

o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 10 % del volumen total del medio libre de suero o definido.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM.

En algunas modalidades, el medio definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina. En algunas modalidades, el SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente el 3 % del sustituto de suero de células inmunitarias (SR) CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina, y comprende además de aproximadamente 1000 UI/ml a aproximadamente 8000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y

comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, de 0,5 mM a aproximadamente 9 mM, de 1 mM a aproximadamente 8 mM, de 2 mM a aproximadamente 7 mM, de 3 mM a aproximadamente 6 mM, o de 4 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente

150 mM, de 10 mM a aproximadamente 140 mM, de 15 mM a aproximadamente 130 mM, de 20 mM a aproximadamente 120 mM, de 25 mM a aproximadamente 110 mM, de 30 mM a aproximadamente 100 mM, de 35 mM a aproximadamente 95 mM, de 40 mM a aproximadamente 90 mM, de 45 mM a aproximadamente 85 mM, de 50 mM a aproximadamente 80 mM, de 55 mM a aproximadamente 75 mM, de 60 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 65 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55 mM.

En algunas modalidades, los medios definidos que se describen en la Publicación del PCT Internacional Número WO/1998/030679, que se incorpora en la presente descripción como referencia, son útiles en la presente invención. En esa publicación, se describen medios de cultivo de células eucariotas sin suero. El medio de cultivo para células eucariotas sin suero incluye un medio de cultivo de células basales suplementado con un suplemento sin suero capaz de apoyar el crecimiento de las células en un cultivo sin suero. El suplemento del medio de cultivo de células eucariotas libre de suero comprende o se obtiene mediante la combinación de uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más oligoelementos, y uno o más antibióticos. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o beta-mercaptoetanol. En algunas modalidades, el medio definido comprende una albúmina o un sustituto de albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3''}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio de células basales se selecciona del grupo que consiste en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI

1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración de glicina en el medio definido se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-histidina se encuentra de aproximadamente 5-250 mg/L, la concentración de L-isoleucina se encuentra de aproximadamente 5-300 mg/L, la concentración de L-metionina se encuentra de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-fenilalanina se encuentra de aproximadamente 5-400 mg/L, la concentración de L-prolina se encuentra de aproximadamente 1-1000 mg/L, la concentración de L-hidroxiprolina se encuentra de aproximadamente 1-45 mg/L, la concentración de L-serina se encuentra de aproximadamente 1-250 mg/L, la concentración de L-treonina se encuentra de aproximadamente 10-500 mg/L, la concentración de L-triptófano se encuentra de aproximadamente 2-110 mg/L, la concentración de L-tirosina se encuentra de aproximadamente 3-175 mg/L, la concentración de L-valina se encuentra de aproximadamente 5-500 mg/L, la concentración de tiamina se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de glutatión reducido se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de ácido L-ascórbico-2-fosfato se encuentra de aproximadamente 1-200 mg/L, la concentración de transferrina saturada de hierro se encuentra de aproximadamente 1-50 mg/L, la concentración de insulina se encuentra de aproximadamente 1-100 mg/L, la concentración de selenito de sodio se encuentra de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y la concentración de albúmina (por ejemplo, AlbuMAX®I) se encuentra de aproximadamente 5000-50 000 mg/L.

En algunas modalidades, los ingredientes sin porción de oligoelementos en el medio definido se encuentran presentes en los intervalos de concentración que se enumeran en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en el Medio 1X" en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, los ingredientes de las porciones que no son oligoelementos en el medio definido están presentes en las concentraciones finales enumeradas en la columna bajo el título “Una Modalidad Preferida del Medio 1X” en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, el medio definido es un medio de células basales que comprende un suplemento libre de suero. En algunas de estas modalidades, el suplemento libre de suero comprende ingredientes de las porciones que no son oligoelementos del tipo y en las concentraciones enumeradas en la columna bajo el título “Una modalidad preferida en el suplemento” en la Tabla A más abajo.

Tabla A: Concentraciones de Ingredientes Sin Porción de Oligoelementos

Ingrediente	Una modalidad preferida en suplemento (mg/L) (aproximadamente)	Intervalo de concentración en el medio 1X (mg/l) (aproximadamente)	Una modalidad preferida en el medio 1X (mg/L) (aproximadamente)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-Isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-Fenilalanina	1800	5-400	336
L-prolina	4000	1-1000	600
L-Hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-Treonina	2200	10-500	425
L-triptófano	440	2-110	82
L-Tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutatión Reducido	10	1-20	1,5
Ácido Ascórbico-2-PO_4 (mg de sal)	330	1-200	50
Transferrina (saturado de hierro)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10

Selenito de Sodio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50 000	12,500

En algunas modalidades, la osmolaridad del medio definido se encuentra entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol. En algunas modalidades, la osmolaridad se encuentra entre aproximadamente 280 y 310 mOsmol. En algunas modalidades, el medio definido se complementa con hasta aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio. El medio definido puede suplementarse además con L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM), 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

En algunas modalidades, el medio definido que se describe en Smith, y otros, “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” *Clin Transl Immunology*, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) son útiles en la presente invención. Brevemente, se usa RPMI o CTS™ OpTmizer™ como medio de células basales y se complementa ya sea con 0, 2 %, 5 %, o 10 % de Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™.

En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

1. Células alimentadoras y células presentadoras de antígeno

En una modalidad, los procedimientos de la segunda expansión que se describen en la presente descripción (por ejemplo, que incluye la expansión tal como aquellas que se describen en la Etapa D de la Figura 109, así como también aquellas denominadas como REP) requieren un exceso de células alimentadoras durante la expansión REP de TIL y/o durante la segunda expansión. En muchas modalidades, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se obtienen de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se

obtienen mediante el uso de métodos estándar tales como la separación por gradiente Ficoll-Paque.

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

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para usar en los procedimientos de expansión de TIL que se describen en la presente descripción si el número total de células viables el día 14 es menor que el número inicial de células viables que se colocan en cultivo el día 0 del REP y/o día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión). Ver, por ejemplo, el Ejemplo 14.

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para usar en los procedimientos de expansión de TIL que se describen en la presente descripción si el número total de células viables, que se cultivan en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número inicial de células viables que se colocan en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión). En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y 3000 UI/ml de IL-2. Ver, por ejemplo, el Ejemplo 13.

En algunas modalidades, las PBMC se consideran incompetentes para la replicación y se aceptan para usar en los procedimientos de expansión de TIL que se describen en la presente descripción si el número total de células viables, que se cultivan en presencia de OKT3 e IL-2, el día 7 y el día 14 no ha aumentado desde el número inicial de células viables que se colocan en cultivo el día 0 del REP y/o el día 0 de la segunda expansión (es decir, el día de inicio de la segunda expansión). En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 5-60 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 1000-6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 10-50 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2000-5000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 20-40 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2000-4000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, las PBMC se cultivan en presencia de 25-35 ng/mL de anticuerpo OKT3 y 2500-3500 UI/mL de IL-2.

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno alimentadoras son PBMC. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno alimentadoras son células presentadoras de antígenos alimentadoras artificiales. En una modalidad, la relación de TIL con respecto a las células presentadoras de antígenos alimentadoras en la segunda expansión es aproximadamente 1 a 25, aproximadamente 1 a 50, aproximadamente 1 a 100, aproximadamente 1 a 125, aproximadamente 1 a 150, aproximadamente 1 a 175, aproximadamente 1 a 200, aproximadamente 1 a 225, aproximadamente 1 a 250, aproximadamente 1 a 275, aproximadamente 1 a 300, aproximadamente 1 a 325, aproximadamente 1 a 350, aproximadamente 1 a 375, aproximadamente 1 a 400 o aproximadamente 1 a 500. En una modalidad, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión se encuentra de entre 1 a 50 y 1 a 300. En una modalidad, la relación de TIL a células alimentadoras presentadoras de antígeno en la segunda expansión se encuentra de entre 1 a 100 y 1 a 200.

En una modalidad, el procedimiento de la segunda expansión que se describe en la presente descripción requiere una relación de aproximadamente $2,5x10^9$ células alimentadoras a aproximadamente $100x10^6$ TIL. En otra modalidad, el procedimiento de la segunda expansión que se describe en la presente descripción requiere una relación de aproximadamente $2,5x10^9$ células alimentadoras a aproximadamente $50x10^6$ TIL. Aún en otra modalidad, el procedimiento de la segunda expansión que se describe en la presente descripción requiere aproximadamente $2,5x10^9$ células alimentadoras a aproximadamente $25x10^6$ TIL.

En una modalidad, el procedimiento de la segunda expansión que se describe en la presente descripción requiere un exceso de células alimentadoras durante la segunda expansión. En muchas modalidades, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se obtienen de unidades de sangre total estándar de donantes de sangre sanos. Las PBMC se obtienen mediante el uso de métodos estándar tales como la separación por gradiente Ficoll-Paque. En una modalidad, se usan células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) en lugar de PBMC.

En general, las PBMC alogénicas se inactivan, ya sea mediante irradiación o tratamiento térmico, y se usan en los procedimientos de expansión de TIL que se describen en la presente descripción.

En una modalidad, las células presentadoras de antígenos artificiales se usan en la segunda expansión como sustituto de, o en combinación con, PBMC.

2. Citocinas

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

Alternativamente, el uso de combinaciones de citocinas para la expansión rápida y/o la segunda expansión de TIL es adicionalmente posible, con combinaciones de dos o más de IL-2, IL-15 e IL-21 como se describe generalmente en la Publicación Internacional Número WO 2015/189356 y la Publicación Internacional Número WO 2015/189357, que se incorpora expresamente en la presente como referencia en su totalidad. Por tanto, las posibles combinaciones incluyen IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, y esta última encuentra un uso particular en muchas modalidades. El uso de combinaciones de citocinas favorece específicamente la generación de linfocitos, y en particular de células T como se describe allí.

3. Anticuerpos anti-CD3

En algunas modalidades, los medios de cultivo que se usa en los métodos de expansión que se describen en la presente descripción (que incluyen aquellos denominados como REP, ver por ejemplo, la Figura 109) también incluyen un anticuerpo anti-CD3. Un anticuerpo anti-CD3 en combinación con IL-2 induce la activación de las células T y la división celular en la población TIL. Este efecto puede observarse con anticuerpos de longitud completa así como también con fragmentos Fab y F(ab')2, generalmente se prefiere el primero; ver, por ejemplo, Tsoukas y otros, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

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

E. ETAPA E: Cosecha de TILS

Después de la etapa de la segunda expansión, pueden cosecharse las células. En algunas modalidades, los TIL se cosechan después de una, dos, tres, cuatro o más

etapas de expansión, por ejemplo como se proporciona en la Figura 109. En algunas modalidades los TIL se recolectan después de dos etapas de expansión, por ejemplo como se proporciona en la Figura 109.

Los TIL pueden cosecharse de cualquier manera apropiada y estéril, que incluye por ejemplo, mediante centrifugación. Los métodos para la cosecha de TIL son bien conocidos en la técnica y cualquier método conocido puede emplearse con el presente proceso. En algunas modalidades, los TIL se cosechan mediante el uso de un sistema automatizado.

Los cosechadores de células y/o los sistemas de procesamiento de células se encuentran disponibles comercialmente a partir de una variedad de fuentes, que incluyen, por ejemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer e Inotech Biosystems International, Inc. Puede emplearse cualquier cosechador en base a células con los presentes métodos. En algunas modalidades, el recolector de células y/o los sistemas de procesamiento de células es un cosechador de células en base a membrana. En algunas modalidades, la cosecha de células se realiza mediante un sistema de procesamiento de células, tal como el sistema LOVO (fabricado por Fresenius Kabi). El término "sistema de procesamiento de células LOVO" también se refiere a cualquier instrumento o dispositivo fabricado mediante cualquier proveedor que pueda bombear una solución que comprenda células a través de una membrana o filtro tal como una membrana giratoria o un filtro giratorio en un entorno de sistema estéril y/o cerrado, lo que permite flujo continuo y procesamiento celular para eliminar el sobrenadante o el medio de cultivo celular sin peletización. En algunas modalidades, el cosechador de células y/o el sistema de procesamiento de células puede realizar la separación de células, el lavado, el intercambio de fluidos, la concentración y/u otras etapas de procesamiento de células en un sistema estéril cerrado.

En algunas modalidades, la cosecha, por ejemplo, en la Etapa E de acuerdo con la Figura 109, se realiza de un biorreactor de sistema cerrado. En algunas modalidades, se emplea un sistema cerrado para la expansión de TIL, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se emplea un único biorreactor. En algunas modalidades, el único biorreactor que se emplea es, por ejemplo, un G-REX-10 o un G-REX-100. En algunas modalidades, el biorreactor de sistema cerrado es un único biorreactor.

F. ETAPA F: Formulación Final/Transferencia a la Bolsa de Infusión

Después de que las Etapas A hasta E como se proporcionan en un orden ilustrativo en la Figura 109 y como se describe en detalle anteriormente y en la presente descripción se encuentren completas, las células se transfieren a un recipiente para usar en la administración a un paciente. En algunas modalidades, una vez que se obtiene un número terapéuticamente suficiente de TIL mediante el uso de los métodos de expansión descritos anteriormente, se transfieren a un recipiente para usar en la administración a un paciente.

En una modalidad, los TIL que se expanden mediante el uso de APC de la presente descripción se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una modalidad, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL que se expanden mediante el uso de PBMC de la presente descripción pueden administrarse por cualquier ruta adecuada como es conocido en la técnica. En algunas modalidades, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferentemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras rutas de administración adecuadas incluyen intraperitoneal, intratecal, e intralinfática.

1. Composiciones Farmacéuticas, Dosificaciones, y Regímenes de dosificación

En una modalidad, los TIL expandidos mediante el uso de los métodos de la presente descripción se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una modalidad, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL que se expanden mediante el uso de PBMC de la presente descripción pueden administrarse por cualquier ruta adecuada como es conocido en la técnica. En algunas modalidades, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferentemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras rutas de administración adecuadas incluyen intraperitoneal, intratecal, e intralinfática.

Puede administrarse cualquier dosis adecuada de TIL. En algunas modalidades, se administran de aproximadamente $2,3x10^{10}$ a aproximadamente $13,7x10^{10}$ de TIL, con un promedio de aproximadamente $7,8x10^{10}$ de TIL, particularmente si el cáncer es melanoma. En una modalidad, se administran de aproximadamente $1,2x10^{10}$ a aproximadamente $4,3x10^{10}$ de TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $3x10^{10}$ a aproximadamente $12x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, se administran de aproximadamente 4×10^{10} a aproximadamente 10×10^{10} TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $5x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $6x10^{10}$ a aproximadamente

$8x10^{10}$ de TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $7x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $2,3x10^{10}$ a aproximadamente $13,7x10^{10}$. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $7,8x10^{10}$ de TIL, particularmente si el cáncer es melanoma. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $1,2x10^{10}$ a aproximadamente $4,3x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $3x10^{10}$ a aproximadamente $12x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 4×10^{10} a aproximadamente 10×10^{10} TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $5x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosis con eficacia terapéutica es de aproximadamente 6×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $7x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL.

En algunas modalidades, el número de TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es aproximadamente 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} y 9×10^{13}. En una modalidad, el número de TIL que se proporciona en las composiciones farmacéuticas de la invención se encuentra en el intervalo de $1x10^6$ a $5x10^6$, de $5x10^6$ a $1x10^7$, de $1x10^7$ a $5x10^7$, de 5×10^7 a 1×10^8, de 1×10^8 a 5×10^8, de 5×10^8 a 1×10^9, de 1×10^9 a 5×10^9, de 5×10^9 a 1×10^{10}, de 1×10^{10} a 5×10^{10}, de 5×10^{10} a 1×10^{11}, de 5×10^{11} a 1×10^{12}, de 1×10^{12} a 5×10^{12}, y de 5×10^{12} a 1×10^{13}.

En algunas modalidades, la concentración de TIL que se proporciona en las composiciones farmacéuticas de la invención es menor que, por ejemplo, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01

%, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 % o 0,0001 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es mayor que 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19,75 %, 19,50 %, 19,25 % 19 %, 18,75 %, 18,50 %, 18,25 % 18 %, 17,75 %, 17,50 %, 17,25 % 17 %, 16,75 %, 16,50 %, 16,25 % 16 %, 15,75 %, 15,50 %, 15,25 % 15 %, 14,75 %, 14,50 %, 14,25 % 14 %, 13,75 %, 13,50 %, 13,25 % 13 %, 12,75 %, 12,50 %, 12,25 % 12 %, 11,75 %, 11,50 %, 11,25 % 11 %, 10,75 %, 10,50 %, 10,25 % 10 %, 9,75 %, 9,50 %, 9,25 % 9 %, 8,75 %, 8,50 %, 8,25 % 8 %, 7,75 %, 7,50 %, 7,25 % 7 %, 6,75 %, 6,50 %, 6,25 % 6 %, 5,75 %, 5,50 %, 5,25 % 5 %, 4,75 %, 4,50 %, 4,25 %, 4 %, 3,75 %, 3,50 %, 3,25 %, 3 %, 2,75 %, 2,50 %, 2,25 %, 2 %, 1,75 %, 1,50 %, 125 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 % o 0,0001 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 40 %, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 30 %, aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 29 %, aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 28 %, aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 27 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 26 %, aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 24 %, aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 23 %, aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 22 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 21 %, aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 19 %, aproximadamente 0,4 % a aproximadamente 18 %, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 17 %, aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 16 %, aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 14 %, aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 12 % o aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,9 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es igual o menor que 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g, o 0,0001 g.

En algunas modalidades, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es más de 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g, 0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04 g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5, 3 g, 3,5, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g, o 10 g.

Los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención son eficaces en un amplio intervalo de dosis. La dosificación exacta dependerá de la vía de administración, la forma en la que se administra el compuesto, el sexo y la edad del sujeto a tratar, el peso corporal del sujeto a tratar y la preferencia y experiencia del médico. Las dosis clínicamente establecidas de los TIL también pueden usarse si son apropiadas. Las cantidades de las composiciones farmacéuticas administradas mediante el uso de los métodos de la presente descripción, tales como las

dosificaciones de TIL, dependerán del ser humano o mamífero que se esté tratando, la gravedad del trastorno o afección, la velocidad de administración, la disposición de los ingredientes farmacéuticos activos y el criterio del médico que las prescribe.

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

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

En algunas modalidades, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,55 mg/kg a aproximadamente 0,85 mg/kg, aproximadamente 0,65 mg/kg a aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg a

aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg mg a aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, o aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg.

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

Puede administrarse una cantidad eficaz de TIL en dosis única o múltiples mediante cualquiera de los modos aceptados de administración de los agentes que tienen utilidades similares, que incluye las vías intranasal y transdérmica, mediante inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, tópica, mediante trasplante o inhalación.

IV. Composiciones farmacéuticas, dosis y regímenes de dosificación

En una modalidad, los TIL expandidos mediante el uso de los métodos de la presente descripción se administran a un paciente como una composición farmacéutica. En una

modalidad, la composición farmacéutica es una suspensión de TIL en un tampón estéril. Los TIL que se expanden mediante el uso de PBMC de la presente descripción pueden administrarse por cualquier ruta adecuada como es conocido en la técnica. En algunas modalidades, las células T se administran como una única infusión intraarterial o intravenosa, que preferentemente dura aproximadamente de 30 a 60 minutos. Otras rutas de administración adecuadas incluyen intraperitoneal, intratecal, e intralinfática.

Puede administrarse cualquier dosis adecuada de TIL. En algunas modalidades, se administran de aproximadamente $2,3x10^{10}$ a aproximadamente $13,7x10^{10}$ de TIL, con un promedio de aproximadamente $7,8x10^{10}$ de TIL, particularmente si el cáncer es melanoma. En una modalidad, se administran de aproximadamente $1,2x10^{10}$ a aproximadamente $4,3x10^{10}$ de TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $3x10^{10}$ a aproximadamente $12x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, se administran de aproximadamente 4×10^{10} a aproximadamente 10×10^{10} TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $5x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $6x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL. En una modalidad, se administran de aproximadamente $7x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $2,3x10^{10}$ a aproximadamente $13,7x10^{10}$. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $7,8x10^{10}$ de TIL, particularmente si el cáncer es melanoma. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $1,2x10^{10}$ a aproximadamente $4,3x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $3x10^{10}$ a aproximadamente $12x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 4×10^{10} a aproximadamente 10×10^{10} TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $5x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL. En algunas modalidades, la dosis con eficacia terapéutica es de aproximadamente 6×10^{10} a aproximadamente 8×10^{10} TIL. En algunas modalidades, la dosificación terapéuticamente efectiva es de aproximadamente $7x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ de TIL.

En algunas modalidades, el número de TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es aproximadamente 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, $8 \times$

10^8, 9 × 10^8, 1 × 10^9, 2 × 10^9, 3 × 10^9, 4 × 10^9, 5 × 10^9, 6 × 10^9, 7 × 10^9, 8 × 10^9, 9 × 10^9, 1 × 10^{10}, 2 × 10^{10}, 3 × 10^{10}, 4 × 10^{10}, 5 × 10^{10}, 6 × 10^{10}, 7 × 10^{10}, 8 × 10^{10}, 9 × 10^{10}, 1 × 10^{11}, 2 × 10^{11}, 3 × 10^{11}, 4 × 10^{11}, 5 × 10^{11}, 6 × 10^{11}, 7 × 10^{11}, 8 × 10^{11}, 9 × 10^{11}, 1 × 10^{12}, 2 × 10^{12}, 3 × 10^{12}, 4 × 10^{12}, 5 × 10^{12}, 6 × 10^{12}, 7 × 10^{12}, 8 × 10^{12}, 9 × 10^{12}, 1 × 10^{13}, 2 × 10^{13}, 3 × 10^{13}, 4 × 10^{13}, 5 × 10^{13}, 6 × 10^{13}, 7 × 10^{13}, 8 × 10^{13} y 9 × 10^{13}. En una modalidad, el número de TIL que se proporciona en las composiciones farmacéuticas de la invención se encuentra en el intervalo de 1x10^6 a 5x10^6, de 5x10^6 a 1x10^7, de 1x10^7 a 5x10^7, de 5×10^7 a 1×10^8, de 1×10^8 a 5×10^8, de 5×10^8 a 1×10^9, de 1×10^9 a 5×10^9, de 5×10^9 a 1×10^{10}, de 1×10^{10} a 5×10^{10}, de 5×10^{10} a 1×10^{11}, de 5×10^{11} a 1×10^{12}, de 1×10^{12} a 5×10^{12}, y de 5×10^{12} a 1×10^{13}.

En algunas modalidades, la concentración de TIL que se proporciona en las composiciones farmacéuticas de la invención es menor que, por ejemplo, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 % o 0,0001 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es mayor que 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19,75 %, 19,50 %, 19,25 % 19 %, 18,75 %, 18,50 %, 18,25 % 18 %, 17,75 %, 17,50 %, 17,25 % 17 %, 16,75 %, 16,50 %, 16,25 % 16 %, 15,75 %, 15,50 %, 15,25 % 15 %, 14,75 %, 14,50 %, 14,25 % 14 %, 13,75 %, 13,50 %, 13,25 % 13 %, 12,75 %, 12,50 %, 12,25 % 12 %, 11,75 %, 11,50 %, 11,25 % 11 %, 10,75 %, 10,50 %, 10,25 % 10 %, 9,75 %, 9,50 %, 9,25 % 9 %, 8,75 %, 8,50 %, 8,25 % 8 %, 7,75 %, 7,50 %, 7,25 % 7 %, 6,75 %, 6,50 %, 6,25 % 6 %, 5,75 %, 5,50 %, 5,25 % 5 %, 4,75 %, 4,50 %, 4,25 %, 4 %, 3,75 %, 3,50 %, 3,25 %, 3 %, 2,75 %, 2,50 %, 2,25 %, 2 %, 1,75 %, 1,50 %, 125 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 % o 0,0001 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de aproximadamente

0,0001 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 40 %, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 30 %, aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 29 %, aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 28 %, aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 27 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 26 %, aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 25 %, aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 24 %, aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 23 %, aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 22 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 21 %, aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 19 %, aproximadamente 0,4 % a aproximadamente 18 %, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 17 %, aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 16 %, aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 15 %, aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 14 %, aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 12 % o aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la concentración de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 %, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 4 %, aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 %, aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 2 %, aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 1 %, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,9 % p/p, p/v o v/v de la composición farmacéutica.

En algunas modalidades, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es igual o menor que 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g, o 0,0001 g.

En algunas modalidades, la cantidad de los TIL proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la invención es más de 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g, 0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04 g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5, 3 g, 3,5, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g, o 10 g.

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

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

En algunas modalidades, una dosis eficaz de TIL es de aproximadamente 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} y $9 \times$

10^{13}. En algunas modalidades, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de 1×10^6 a 5×10^6, 5×10^6 a 1×10^7, 1×10^7 a 5×10^7, 5×10^7 a 1×10^8, 1×10^8 a 5×10^8, 5×10^8 a 1×10^9, 1×10^9 a 5×10^9, 5×10^9 a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12}, 1×10^{12} a 5×10^{12} y 5×10^{12} a 1×10^{13}.

En algunas modalidades, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 4,3 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3,2 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 1,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,55 mg/kg a aproximadamente 0,85 mg/kg, aproximadamente 0,65 mg/kg a aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1,85 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg a aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg mg a aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,15 mg/kg a aproximadamente 3,6 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg a aproximadamente 3,4 mg/kg, aproximadamente 2,4 mg/kg a aproximadamente 3,3 mg/kg, aproximadamente 2,6 mg/kg a aproximadamente 3,15 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, o aproximadamente 2,85 mg/kg a aproximadamente 2,95 mg/kg.

En algunas modalidades, una dosis eficaz de TIL está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 45 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 40 mg, aproximadamente 15 mg a aproximadamente 35 mg, aproximadamente 20 mg a aproximadamente 30 mg, aproximadamente 23 mg a aproximadamente 28 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 60 mg a aproximadamente 140 mg,

aproximadamente 70 mg a aproximadamente 130 mg, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 90 mg a aproximadamente 110 mg, o aproximadamente 95 mg a aproximadamente 105 mg, aproximadamente 98 mg a aproximadamente 102 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg, aproximadamente 170 mg a aproximadamente 230 mg, aproximadamente 180 mg a aproximadamente 220 mg, aproximadamente 190 mg a aproximadamente 210 mg, aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg, o aproximadamente 198 a aproximadamente 207 mg.

Puede administrarse una cantidad eficaz de TIL en dosis única o múltiples mediante cualquiera de los modos aceptados de administración de los agentes que tienen utilidades similares, que incluye las vías intranasal y transdérmica, mediante inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, tópica, mediante trasplante o inhalación.

En otra modalidad, la invención proporciona una bolsa de infusión que comprende la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que comprende la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, la invención proporciona una bolsa de infusión que comprende la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

En otra modalidad, la invención proporciona una preparación crioconservada de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que comprende la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente y un medio de crioconservación.

En otra modalidad, la invención proporciona la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificada de manera que el medio de crioconservación contenga DMSO.

En otra modalidad, la invención proporciona la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el medio de crioconservación contenga DMSO al 7-10 %.

En algunas modalidades, la invención proporciona las composiciones de TIL que comprenden TIL en medio libre de suero o en un medio definido. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o un sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido se usa para prevenir y/o disminuir la variación experimental debido en parte a la variación de lote a lote de los medios que contienen suero.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido comprende un medio de células basales y un suplemento de suero y/o sustituto del suero. En algunas modalidades, el medio de células basales incluye, pero no se limita al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, el suplemento de suero o sustituto del suero incluye, pero no se limita a uno o más del Suplemento de Suero de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™, una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más antibióticos, y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o 2-mercaptoetanol.

En algunas modalidades, el Sustituto de Suero de Células Inmunitarias de Células T CTS™ OpTmizer™ se usa con medios de crecimiento convencionales, que incluyen pero no se limitan al Medio Basal de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™, Medio AIM-V CTS™, SFM AIM-V CTS™, Medio de Expansión de Células T Libre de Compuestos Xenogénicos LymphoONE™, Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración total de sustituto de suero (% en volumen) en el medio libre de suero o definido es de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % en volumen del medio total libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 3 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 5 % del volumen total del medio libre de suero o definido. En algunas modalidades, la concentración total de sustituto del suero es aproximadamente 10 % del volumen total del medio libre de suero o definido.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM.

En algunas modalidades, el medio definido es un SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Cualquier formulación de CTS™ OpTmizer™ es útil en la presente invención. SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ es una combinación de 1 L de medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ y 26 ml del suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™, que se mezclan antes de su uso. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3

% de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), junto con 2-mercaptoetanol a 55 mM. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina. En algunas modalidades, el SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™ se suplementa con aproximadamente el 3 % del sustituto de suero de células inmunitarias (SR) CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina, y comprende además de aproximadamente 1000 UI/ml a aproximadamente 8000 UI/ml de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, y 2 mM de L-glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y 55 mM de 2-mercaptoetanol, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente de aproximadamente 1000 UI/mL a aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™

(ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. En algunas modalidades, el SFM de Expansión de Células T CTS™ OpTmizer™ se complementa con aproximadamente 3 % de Sustituto de Suero (SR) de Células Inmunitarias CTS™ (ThermoFisher Scientific) y aproximadamente 2 mM de glutamina, y comprende adicionalmente aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, de 0,5 mM a aproximadamente 9 mM, de 1 mM a aproximadamente 8 mM, de 2 mM a aproximadamente 7 mM, de 3 mM a aproximadamente 6 mM, o de 4 mM a aproximadamente 5 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con glutamina (es decir, GlutaMAX®) a una concentración de aproximadamente 2 mM.

En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de 10 mM a aproximadamente 140 mM, de 15 mM a aproximadamente 130 mM, de 20 mM a aproximadamente 120 mM, de 25 mM a aproximadamente 110 mM, de 30 mM a aproximadamente 100 mM, de 35 mM a aproximadamente 95 mM, de 40 mM a aproximadamente 90 mM, de 45 mM a aproximadamente 85 mM, de 50 mM a aproximadamente 80 mM, de 55 mM a aproximadamente 75 mM, de 60 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 65 mM. En algunas modalidades, el medio libre de suero o medio definido se complementa con 2-mercaptoetanol a una concentración de aproximadamente 55 mM.

En algunas modalidades, los medios definidos que se describen en la Publicación del PCT Internacional Número WO/1998/030679, que se incorpora en la presente descripción como referencia, son útiles en la presente invención. En esa publicación, se describen medios de cultivo de células eucariotas sin suero. El medio de cultivo para células eucariotas sin suero incluye un medio de cultivo de células basales suplementado con un suplemento sin suero capaz de apoyar el crecimiento de las células en un cultivo sin suero. El suplemento del medio de cultivo de células eucariotas libre de suero comprende o se obtiene mediante la combinación de uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en una o más albúminas o sustitutos de albúmina, uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de

insulina, uno o más precursores de colágeno, uno o más oligoelementos, y uno o más antibióticos. En algunas modalidades, el medio definido comprende adicionalmente L-glutamina, bicarbonato de sodio y/o beta-mercaptoetanol. En algunas modalidades, el medio definido comprende una albúmina o un sustituto de albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en uno o más aminoácidos, una o más vitaminas, una o más transferrinas o sustitutos de transferrina, uno o más antioxidantes, una o más insulinas o sustitutos de insulina, uno o más precursores de colágeno y uno o más oligoelementos. En algunas modalidades, el medio definido comprende albúmina y uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutatión reducido, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de hierro, insulina, y compuestos que contienen los restos de oligoelementos Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} y Zr^{4+}. En algunas modalidades, el medio de células basales se selecciona del grupo que consiste en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio Esencial Mínimo (αMEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow (G-MEM), Medio de Crecimiento RPMI, y Medio de Dulbecco Modificado por Iscove.

En algunas modalidades, la concentración de glicina en el medio definido se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-histidina se encuentra de aproximadamente 5-250 mg/L, la concentración de L-isoleucina se encuentra de aproximadamente 5-300 mg/L, la concentración de L-metionina se encuentra de aproximadamente 5-200 mg/L, la concentración de L-fenilalanina se encuentra de aproximadamente 5-400 mg/L, la concentración de L-prolina se encuentra de aproximadamente 1-1000 mg/L, la concentración de L-hidroxiprolina se encuentra de aproximadamente 1-45 mg/L, la concentración de L-serina se encuentra de aproximadamente 1-250 mg/L, la concentración de L-treonina se encuentra de aproximadamente 10-500 mg/L, la concentración de L-triptófano se encuentra de aproximadamente 2-110 mg/L, la concentración de L-tirosina se encuentra de aproximadamente 3-175 mg/L, la concentración de L-valina se encuentra de aproximadamente 5-500 mg/L, la concentración de tiamina se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de glutatión reducido se encuentra de aproximadamente 1-20 mg/L, la concentración de ácido L-ascórbico-2-fosfato se encuentra de aproximadamente 1-200 mg/L, la concentración de transferrina saturada de hierro se encuentra de aproximadamente 1-50 mg/L, la concentración de insulina se

encuentra de aproximadamente 1-100 mg/L, la concentración de selenito de sodio se encuentra de aproximadamente 0,000001-0,0001 mg/L, y la concentración de albúmina (por ejemplo, AlbuMAX®I) se encuentra de aproximadamente 5000-50 000 mg/L.

En algunas modalidades, los ingredientes sin porción de oligoelementos en el medio definido se encuentran presentes en los intervalos de concentración que se enumeran en la columna bajo el título "Intervalo de Concentración en el Medio 1X" en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, los ingredientes de las porciones que no son oligoelementos en el medio definido están presentes en las concentraciones finales enumeradas en la columna bajo el título “Una Modalidad Preferida del Medio 1X” en la Tabla A más abajo. En otras modalidades, el medio definido es un medio de células basales que comprende un suplemento libre de suero. En algunas de estas modalidades, el suplemento libre de suero comprende ingredientes de las porciones que no son oligoelementos del tipo y en las concentraciones enumeradas en la columna bajo el título “Una modalidad preferida en el suplemento” en la Tabla A más abajo.

Tabla A: Concentraciones de Ingredientes Sin Porción de Oligoelementos

Ingrediente	Una modalidad preferida en suplemento (mg/L) (aproximadamente)	Intervalo de concentración en el medio 1X (mg/l) (aproximadamente)	Una modalidad preferida en el medio 1X (mg/L) (aproximadamente)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-Isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-Fenilalanina	1800	5-400	336
L-prolina	4000	1-1000	600
L-Hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-Treonina	2200	10-500	425

L-triptófano	440	2-110	82
L-Tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutatión Reducido	10	1-20	1,5
Ácido Ascórbico-2-PO_4 (mg de sal)	330	1-200	50
Transferrina (saturado de hierro)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenito de Sodio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50 000	12,500

En algunas modalidades, la osmolaridad del medio definido se encuentra entre aproximadamente 260 y 350 mOsmol. En algunas modalidades, la osmolaridad se encuentra entre aproximadamente 280 y 310 mOsmol. En algunas modalidades, el medio definido se complementa con hasta aproximadamente 3,7 g/L, o aproximadamente 2,2 g/L de bicarbonato de sodio. El medio definido puede suplementarse además con L-glutamina (concentración final de aproximadamente 2 mM), uno o más antibióticos, aminoácidos no esenciales (NEAA; concentración final de aproximadamente 100 µM), 2-mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente 100 µM).

En algunas modalidades, el medio definido que se describe en Smith, y otros, “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” *Clin Transl Immunology*, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) son útiles en la presente invención. Brevemente, se usa RPMI o

CTS™ OpTmizer™ como medio de células basales y se complementa ya sea con 0, 2 %, 5 %, o 10 % de Sustituto de Suero de Células Inmunitarias CTS™.

En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases no está filtrado. El uso de medio celular sin filtrar puede simplificar los procedimientos necesarios para expandir el número de células. En una modalidad, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable a los gases carece de beta-mercaptoetanol (BME o βME; también conocido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

En otra modalidad, la invención proporciona una preparación crioconservada de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

V. Métodos de tratamiento de los pacientes

Los métodos de tratamiento comienzan con la recolección inicial de TIL y el cultivo de TIL. Dichos métodos se han descrito en la técnica, por ejemplo, por Jin y otros, *J. Immunotherapy*, **2012**, 35 (3): 283-292, incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. Las modalidades de los métodos de tratamiento se describen a lo largo de las secciones siguientes, que incluye los Ejemplos.

Los TIL expandidos producidos de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, como se describe en las Etapas A a F anteriores o de acuerdo con las Etapas A a F anteriores (también como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o Figura 1C) encuentran un uso particular en el tratamiento de pacientes con cáncer (por ejemplo, como se describe en Goff, y otros, *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34 (20): 2389-239, así como el contenido complementario; incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, se cultivaron TIL a partir de restos extirpados de melanoma metastásico como se describió previamente (ver, Dudley, y otros, *J Immunother*., **2003**, 26: 332-342; incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad). El tumor fresco puede disecarse en condiciones estériles. Puede recolectarse una muestra representativa para un análisis patológico formal. Pueden usarse fragmentos individuales de 2 mm^3 a 3 mm^3. En algunas modalidades, se obtienen 5, 10, 15, 20, 25 o 30 muestras por paciente. En algunas modalidades, se obtienen 20, 25 o 30 muestras por paciente. En algunas modalidades, se obtienen 20, 22, 24, 26 o 28 muestras por paciente. En algunas modalidades, se obtienen 24 muestras por paciente. Las muestras pueden colocarse en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos, mantenerse en medio de crecimiento con IL-2 en dosis alta (6000

UI/ml) y darle seguimiento para detectar la destrucción del tumor y/o la proliferación de TIL. Cualquier tumor con células viables que queden después del procesamiento puede digerirse enzimáticamente en una suspensión de células individuales y crioconservarse, como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, puede tomarse una muestra de TIL cultivada con éxito para el análisis de fenotipo (CD3, CD4, CD8 y CD56) y puede analizarse contra un tumor autólogo cuando esté disponible. Los TIL pueden considerarse reactivos si el cocultivo durante la noche produjo niveles de interferón-gamma (IFN-γ) > 200 pg/ml y el doble de fondo. (Goff, y otros, *J Immunother.*, **2010**, 33: 840-847; incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad). En algunas modalidades, pueden seleccionarse cultivos con evidencia de reactividad autóloga o patrones de crecimiento suficientes para una segunda expansión (por ejemplo, una segunda expansión como se proporciona de acuerdo con la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), que incluye las segundas expansiones que a veces se denominan expansión rápida (REP). En algunas modalidades, los TIL expandidos con alta reactividad autóloga (por ejemplo, alta proliferación durante una segunda expansión), se seleccionan para una segunda expansión adicional. En algunas modalidades, los TIL con alta reactividad autóloga (por ejemplo, alta proliferación durante la segunda expansión como se proporciona en la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), se seleccionan para una segunda expansión adicional de acuerdo con la Etapa D de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

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

Los fenotipos celulares de muestras crioconservadas de TIL en bolsa de infusión pueden analizarse mediante citometría de flujo (por ejemplo, FlowJo) para los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8, CCR7 y CD45RA (BD BioSciences), así como mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. Las citocinas séricas

pueden medirse mediante el uso de técnicas estándar de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Un aumento del IFN-g sérico puede definirse como > 100 pg/ml y al menos 4 veces o al menos 3 veces o al menos 2 veces o al menos 1 vez mayor que los niveles basales de IFN-g sérico. En algunas modalidades, un aumento de IFN-g sérico se define como > 1000 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento de IFN-g sérico se define como > 200 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 250 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento de IFN-g sérico se define como > 300 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 350 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 400 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 450 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 500 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 550 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 600 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 650 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento de IFN-g sérico se define como > 700 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 750 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 800 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 850 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 900 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento del IFN-g sérico se define como > 950 pg/ml. En algunas modalidades, un aumento de IFN-g sérico se define como > 1000 pg/ml.

En algunas modalidades, los TIL producidos mediante los métodos proporcionados en la presente descripción, por ejemplo los ejemplificados en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), proporcionan una mejora sorprendente en la eficacia clínica de los TIL. En algunas modalidades, los TIL producidos mediante los métodos proporcionados en la presente descripción, por ejemplo, los ejemplificados en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), exhiben una mayor eficacia clínica en comparación con los TIL producidos por métodos distintos a los descritos en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los ejemplificados en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, los métodos distintos de los descritos en la presente descripción incluyen métodos denominados proceso 1C y/o Generación 1 (Gen 1). En algunas modalidades, la eficacia aumentada se mide mediante DCR, ORR y/u otras respuestas clínicas. En algunas modalidades, los TILS producidos mediante los

métodos proporcionados en la presente descripción, por ejemplo, los ejemplificados en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), exhiben un tiempo de respuesta similar y un perfil de seguridad en comparación con los TIL producidos por métodos distintos de los descritos en la presente descripción, que incluye, por ejemplo, métodos distintos de los ejemplificados en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), por ejemplo, el proceso Gen 1.

En algunas modalidades, IFN-gamma (IFN-γ) es indicativo de la eficacia del tratamiento y/o eficacia clínica aumentada. En algunas modalidades, el IFN-γ en la sangre de sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. En algunas modalidades, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN-γ. La producción de IFN-γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de IFN-γ puede medirse mediante la determinación de los niveles de la citocina IFN-γ en la sangre, suero o TIL *ex vivo* de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los métodos de la presente invención, que incluye los descritos, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, un aumento de IFN-γ es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos mediante los métodos de la presente invención. En algunas modalidades, el IFN-γ aumenta una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluye, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la

Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, el IFN-γ se mide mediante el uso de un kit de ELISA Quantikine. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en TIL *ex vivo* de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los métodos de la presente invención, que incluyen los descritos, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los métodos de la presente invención, que incluyen los descritos, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en suero de TIL de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los métodos de la presente invención, que incluyen los descritos, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

En algunas modalidades, los TIL preparados mediante los métodos de la presente invención, que incluyen los que se describen, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), exhiben una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL producidos por otros métodos, que incluyen los no ejemplificados en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), tal como, por ejemplo, los métodos denominados métodos del proceso 1C. En algunas modalidades, una diversidad clonal significativamente mejorada y/o una diversidad clonal aumentada es indicativa de la eficacia del tratamiento y/o aumento de la eficacia clínica. En algunas modalidades, la diversidad clonal se refiere a la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, un aumento de la diversidad clonal puede ser indicativo de la eficacia del tratamiento con respecto a la administración de los TIL producidos mediante los métodos de la presente invención. En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta una vez, dos veces, diez veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en comparación con los TIL preparados mediante el uso de

métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta diez veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta 100 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta 500 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta 1000 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

Las medidas de eficacia pueden incluir la tasa de control de la enfermedad (DCR) así como la tasa de respuesta global (ORR), como se conoce en la técnica y se describe en la presente descripción.

1. Métodos de tratamiento de cánceres y otras enfermedades

Las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en un método para tratar enfermedades. En una modalidad, se utilizan en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos. También pueden usarse para tratar otros trastornos como se describe en la presente descripción y en los siguientes párrafos.

En algunas modalidades, el trastorno hiperproliferativo es cáncer. En algunas modalidades, el trastorno hiperproliferativo es un cáncer de tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma (GBM), cáncer gastrointestinal, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), cáncer renal y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el trastorno hiperproliferativo es una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, el cáncer de tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de células B grandes, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular y linfoma de células del manto.

En algunas modalidades, el cáncer es un fenotipo de cáncer hipermutado. Los cánceres hipermutados se describen ampliamente en Campbell, y otros (Cell, 171: 1042-1056 (2017); incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos). En algunas modalidades, los tumores hipermutados comprenden entre 9 y 10 mutaciones por megabase (Mb). En algunas modalidades, los tumores hipermutados pediátricos comprenden 9,91 mutaciones por megabase (Mb). En algunas modalidades, los tumores hipermutados en adultos comprenden 9 mutaciones por megabase (Mb). En algunas modalidades, los tumores hipermutados potenciados comprenden entre 10 y 100 mutaciones por megabase (Mb). En algunas modalidades, los tumores hipermutados pediátricos potenciados comprenden entre 10 y 100 mutaciones por megabase (Mb). En algunas modalidades, los tumores hipermutados en adultos potenciados comprenden entre 10 y 100 mutaciones por megabase (Mb). En algunas modalidades, los tumores ultrahipermutados comprenden más de 100 mutaciones por megabase (Mb). En algunas modalidades, los tumores ultrahipermutados pediátricos comprenden más de 100 mutaciones por megabase (Mb).

En algunas modalidades, los tumores ultrahipermutados en adultos comprenden más de 100 mutaciones por megabase (Mb).

En algunas modalidades, los tumores hipermutados tienen mutaciones en las vías de reparación de la replicación. En algunas modalidades, los tumores hipermutados tienen mutaciones en las ADN polimerasas asociadas a la reparación de la replicación. En algunas modalidades, los tumores hipermutados tienen inestabilidad de microsatélites. En algunas modalidades, los tumores ultrahipermutados tienen mutaciones en las ADN polimerasas asociadas a la reparación de la replicación y tienen inestabilidad de microsatélites. En algunas modalidades, la hipermutación en el tumor se correlaciona con la respuesta a los inhibidores de puntos de control inmunitarios. En algunas modalidades, los tumores hipermutados son resistentes al tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitarios. En algunas modalidades, los tumores hipermutados pueden tratarse mediante el uso de los TIL de la presente invención. En algunas modalidades, la hipermutación en el tumor es causada por factores ambientales (exposiciones extrínsecas). Por ejemplo, la luz ultravioleta puede ser la causa principal del alto número de mutaciones en el melanoma maligno (*ver*, por ejemplo, Pfeifer, G.P., You, Y.H. y Besaratinia, A. (2005). Mutat. Res. 571, 19–31; Sage, E. (1993). Photochem. Photobiol. 57: 163–174). En algunas modalidades, la hipermutación en el tumor puede ser causada por más de 60 carcinógenos en el humo del tabaco para tumores de pulmón y laringe, así como otros tumores, debido a la exposición directa a mutágenos (ver, por ejemplo, Pleasance, E.D., Stephens, P.J., O'Meara, S., McBride, D.J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M.L., Beare, D., Lau, K.W., Greenman, C., y otros (2010). Nature 463, 184–190. En algunas modalidades, la hipermutación en el tumor es causada por la desregulación de la enzima de edición de ARNm de apolipoproteína B, miembros de la familia de polipéptidos catalíticos (APOBEC), que se ha demostrado que da como resultado niveles aumentados de transiciones de C a T en una amplia gama de cánceres (véase, por ejemplo, Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., y otros (2013). Nat. Genet. 45: 970–976). En algunas modalidades, la hipermutación en el tumor es causada por la reparación defectuosa de la replicación del ADN por mutaciones que comprometen la corrección de errores, que realizan las principales enzimas replicativas Pol3 y Pold1. En algunas modalidades, la hipermutación en el tumor es causada por defectos en la reparación de errores de apareamiento del ADN, que se asocian con la hipermutación en cánceres colorrectal, endometrial y otros (ver, por ejemplo, Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A.D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A.G., Pashtan,

I., Shen, R., Benz, C.C., y otros; (2013). Nature 497, 67–73.; Muzny, D.M., Bainbridge, M.N., Chang, K., Dinh, H.H., Drummond, J.A., Fowler, G., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Morgan, M.B., Newsham, I.F., y otros; (2012). Nature 487, 330–337). En algunas modalidades, las mutaciones en la reparación de la replicación del ADN también se encuentran en síndromes de predisposición al cáncer, tales como en la deficiencia de reparación de errores de apareamiento constitucional o bialélico (CMMRD), síndrome de Lynch y poliposis asociada a la corrección de errores de la polimerasa (PPAP).

En una modalidad, la invención incluye un método para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde el cáncer es un cáncer hipermutado. En una modalidad, la invención incluye un método para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde el cáncer es un cáncer hipermutado potenciado. En una modalidad, la invención incluye un método para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde el cáncer es un cáncer ultrahipermutado.

En una modalidad, la invención incluye un método para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde un paciente se trata previamente con quimioterapia no mielosupresora antes de una infusión de TIL de acuerdo con la presente descripción. En una modalidad, la quimioterapia no mielosupresora es ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 26 antes de la infusión de TIL) y fludarabina 25 mg/m^2/d durante 5 días (días 27 a 23 antes de la infusión de TIL). En una modalidad, después de la quimioterapia no mielosupresora y la infusión de TIL (en el día 0) de acuerdo con la presente descripción, el paciente recibe una infusión intravenosa de IL-2 por vía intravenosa a 720 000 UI/kg cada 8 horas hasta la tolerancia fisiológica.

La eficacia de los compuestos y combinaciones de compuestos descritos en la presente descripción para tratar, prevenir y/o controlar las enfermedades o trastornos indicados puede evaluarse mediante el uso de varios modelos conocidos en la técnica, que proporcionan una guía para el tratamiento de enfermedades humanas. Por ejemplo, se describen modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de ovario, por ejemplo, en Mullany, y otros, *Endocrinology* **2012,** *153*, 1585-92; y Fong, y otros, *J. Ovarian Res.* **2009,** *2*, 12. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de páncreas se describen en Herreros-Villanueva, y otros, *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*: 1286-1294. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de mama se describen, por ejemplo, en Fantozzi, *Breast Cancer Res.* **2006,** *8*, 212. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el melanoma se describen, por ejemplo, en Damsky, y otros, *Pigment*

Cell & Melanoma Res. **2010,** *23*, 853–859. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de pulmón se describen, por ejemplo, en Meuwissen, y otros, *Genes & Development*, **2005,** *19*, 643-664. Los modelos para determinar la eficacia de los tratamientos para el cáncer de pulmón se describen, por ejemplo, en Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2009,** *2*, 55-60; y Sano, *Head Neck Oncol.* **2009,** *1*, 32.

En algunas modalidades, IFN-gamma (IFN-γ) es indicativo de la eficacia del tratamiento para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo. En algunas modalidades, el IFN-γ en la sangre de sujetos tratados con TIL es indicativo de TIL activos. En algunas modalidades, se emplea un ensayo de potencia para la producción de IFN-γ. La producción de IFN-γ es otra medida del potencial citotóxico. La producción de IFN-γ puede medirse mediante la determinación de los niveles de la citocina IFN-γ en la sangre de un sujeto tratado con TIL preparados mediante los métodos de la presente invención, que incluyen los descritos, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, los TIL que se obtienen por el presente método proporcionan un aumento de IFN-γ en la sangre de sujetos tratados con los TIL del presente método en comparación con sujetos tratados con TIL preparados mediante el uso de métodos denominados como el proceso de Gen 3, como se ejemplifica en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C) y a lo largo de esta solicitud. En algunas modalidades, un aumento de IFN-γ es indicativo de la eficacia del tratamiento en un paciente tratado con los TIL producidos mediante los métodos de la presente invención. En algunas modalidades, el IFN-γ aumenta una, dos, tres, cuatro o cinco veces o más en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluye, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En

algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta tres veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta cuatro veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la secreción de IFN-γ aumenta cinco veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, el IFN-γ se mide mediante el uso de un kit de ELISA Quantikine. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide mediante el uso de un kit de ELISA Quantikine. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en TIL *ex vivo* de un paciente tratado con los TIL producidos mediante los métodos de la presente invención. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en sangre en un paciente tratado con los TIL producidos mediante los métodos de la presente invención. En algunas modalidades, el IFN-γ se mide en suero en un paciente tratado con los TIL producidos mediante los métodos de la presente invención.

En algunas modalidades, los TIL preparados mediante los métodos de la presente invención, que incluyen los que se describen, por ejemplo, en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), exhiben una mayor diversidad clonal en comparación con los TIL producidos por otros métodos, que incluyen los no ejemplificados en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), tal como, por ejemplo, los métodos denominados métodos del proceso 1C. En algunas modalidades, una diversidad clonal significativamente mejorada y/o una diversidad clonal aumentada es indicativa de la eficacia del tratamiento y/o el aumento de la eficacia clínica para el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, la diversidad clonal se refiere a la diversidad del repertorio de células T. En algunas modalidades, un aumento de la diversidad clonal puede ser indicativo de la eficacia del tratamiento con respecto a la administración de los TIL producidos mediante los métodos de la presente invención.

En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta una vez, dos veces, diez veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en comparación con los TIL preparados mediante el uso de métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta una vez en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta dos veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta diez veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta 100 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta 500 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). En algunas modalidades, la diversidad clonal aumenta 1000 veces en comparación con un paciente no tratado y/o en comparación con un paciente tratado con TIL preparados mediante el uso de otros métodos distintos a los proporcionados en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, métodos distintos de los que se incluyen en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C).

2. **Métodos de coadministración**

En algunas modalidades, los TIL producidos como se describe en la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, los TIL derivados de un método descrito en las Etapas A a F de la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C), pueden administrarse en combinación con uno o más reguladores de puntos de control inmunitarios, tal como los anticuerpos que se describen más abajo. Por ejemplo, los anticuerpos que se dirigen a PD-1 y que pueden coadministrarse con los TIL de la presente invención incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475 o MK-3475, Merck; Keytruda®), anticuerpo anti-PD-1 humanizado JS001 (ShangHai JunShi), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), pidilizumab (AcM anti-PD-1 CT-011, Medivation), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) y/o anticuerpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), anticuerpo monoclonal humano REGN2810 (Regeneron), anticuerpo monoclonal humano MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) y/o anticuerpo IgG4 anti-PD-1 humanizado PDR001 (Novartis). En algunas modalidades, el anticuerpo contra PD-1 es del clon: RMP1-14 (IgG de rata) - BioXcell cat # BP0146. Otros anticuerpos adecuados para su uso en métodos de coadministración con TIL producidos de acuerdo con las Etapas A a F como se describen en la presente descripción son los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la patente de EE.UU. núm. 8 008 449, incorporada en la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de este se une específicamente a PD-L1 e inhibe su interacción con PD-1, para aumentar así la actividad inmunitaria. Cualquier anticuerpo conocido en la técnica que se una a PD-L1 e interrumpa la interacción entre PD-1 y PD-L1, y estimule una respuesta inmunitaria antitumoral, es adecuado para su uso en métodos de coadministración con TIL producidos de acuerdo con las Etapas A a F como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, los anticuerpos que se dirigen a PD-L1 y que se encuentran en ensayos clínicos incluyen BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) y MPDL3280A (Genentech). Otros anticuerpos adecuados que se dirigen a PD-L1 se describen en la patente de EE.UU. núm. 7 943 743, incorporada en la presente descripción como referencia. Un experto en la técnica entenderá que cualquier anticuerpo que se una a PD-1 o PD-L1, interrumpa la interacción PD-1/PD-L1 y estimule una respuesta inmunitaria antitumoral, es adecuado para su uso en métodos de coadministración con TIL producidos de acuerdo con las Etapas A a F como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el sujeto al que se le administra la combinación de TIL producidos de acuerdo con las Etapas A a F se coadministra con un y un

anticuerpo anti-PD-1 cuando el paciente tiene un tipo de cáncer que es refractario a la administración del anticuerpo anti-PD-1 solo. En algunas modalidades, al paciente se le administran TIL en combinación con y anti-PD-1 cuando el paciente tiene melanoma refractario. En algunas modalidades, al paciente se le administran TIL en combinación con y anti-PD-1 cuando el paciente tiene carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

3. **Preacondicionamiento de linfodepleción opcional de los pacientes**

En una modalidad, la invención incluye un método para tratar un cáncer con una población de TIL, en donde un paciente se trata previamente con quimioterapia no mielosupresora antes de una infusión de TIL de acuerdo con la presente descripción. En una modalidad, la invención incluye una población de TIL para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que ha sido tratado previamente con quimioterapia no mielosupresora. En una modalidad, la población de TIL es para una administración por infusión. En una modalidad, la quimioterapia no mielosupresora es ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 días (días 27 y 26 antes de la infusión de TIL) y fludarabina 25 mg/m^2/d durante 5 días (días 27 a 23 antes de la infusión de TIL). En una modalidad, después de la quimioterapia no mielosupresora y la infusión de TIL (en el día 0) de acuerdo con la presente descripción, el paciente recibe una infusión intravenosa de IL-2 (aldesleucina, disponible comercialmente como PROLEUKIN) por vía intravenosa a 720 000 UI/kg cada 8 horas hasta la tolerancia fisiológica. En determinadas modalidades, la población de TIL se utiliza en el tratamiento del cáncer en combinación con IL-2, en donde la IL-2 se administra después de la población de TIL.

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

En general, la linfodepleción se logra mediante el uso de la administración de fludarabina o ciclofosfamida (la forma activa se denomina mafosfamida) y combinaciones de estas. Dichos métodos se describen en Gassner y otros, *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 75–85, Muranski, y otros, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2006,** *3*, 668–681, Dudley, y otros, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5233-5239 y Dudley, y otros, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2346-

2357, todos los cuales se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, la fludarabina se administra a una concentración de 0,5 µg/ml - 10 µg/ml de fludarabina. En algunas modalidades, la fludarabina se administra a una concentración de 1 µg/ml de fludarabina. En algunas modalidades, el tratamiento con fludarabina se administra durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días o más. En algunas modalidades, la fludarabina se administra a una dosis de 10 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 35 mg/kg/día, 40 mg/kg/día o 45 mg/kg/día. En algunas modalidades, el tratamiento con fludarabina se administra durante 2-7 días a 35 mg/kg/día. En algunas modalidades, el tratamiento con fludarabina se administra durante 4-5 días a 35 mg/kg/día. En algunas modalidades, el tratamiento con fludarabina se administra durante 4-5 días a 25 mg/kg/día.

En algunas modalidades, la mafosfamida, la forma activa de ciclofosfamida, se obtiene a una concentración de 0,5 µg/ml - 10 µg/ml mediante la administración de ciclofosfamida. En algunas modalidades, la mafosfamida, la forma activa de ciclofosfamida, se obtiene a una concentración de 1 µg/ml mediante la administración de ciclofosfamida. En algunas modalidades, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días o más. En algunas modalidades, la ciclofosfamida se administra a una dosis de 100 mg/m^2/día, 150 mg/m^2/día, 175 mg/m^2/día, 200 mg/m^2/día, 225 mg/m^2/día, 250 mg/m^2/día, 275 mg/m^2/día o 300 mg/m^2/día. En algunas modalidades, la ciclofosfamida se administra por vía intravenosa (es decir, i.v.). En algunas modalidades, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 2-7 días a 35 mg/kg/día. En algunas modalidades, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4-5 días a 250 mg/m^2/día por vía i.v. En algunas modalidades, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4 días a 250 mg/m^2/día por vía i.v.

En algunas modalidades, la linfodepleción se realiza mediante la administración de la fludarabina y la ciclofosfamida juntas a un paciente. En algunas modalidades, la fludarabina se administra a 25 mg/m^2/día por vía i.v. y la ciclofosfamida se administra a 250 mg/m^2/día por vía i.v. durante 4 días.

En una modalidad, la linfodepleción se realiza mediante la administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguida de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

4. **Regímenes de IL-2**

En una modalidad, el régimen de IL-2 comprende un régimen de IL-2 de dosis alta, en donde el régimen de IL-2 de dosis alta comprende aldesleucina, o un biosimilar o una variante de esta, administrada por vía intravenosa que comienza el día después de administrar una porción con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL, en donde la aldesleucina o un biosimilar o variante de esta se administra a una dosis de 0,037 mg/kg o 0,044 mg/kg UI/kg (masa corporal del paciente) mediante infusiones intravenosas en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia, hasta un máximo de 14 dosis. Después de 9 días de reposo, este esquema puede repetirse con otras 14 dosis, hasta un máximo de 28 dosis en total.

En una modalidad, el régimen de IL-2 comprende un régimen de IL-2 decreciente. Los regímenes de IL-2 decreciente se han descrito en O'Day, y otros, *J. Clin. Oncol.* **1999,** *17*, 2752-61 y Eton, y otros, *Cancer* **2000,** *88*, 1703-9, cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción como referencia. En una modalidad, un régimen de IL-2 decreciente comprende 18×10^6 UI/m^2 administradas por vía intravenosa durante 6 horas, seguido de 18×10^6 UI/m^2 administradas por vía intravenosa durante 12 horas, seguido de 18×10^6 UI/m^2 administradas por vía intravenosa durante 24 horas, seguido de $4{,}5 \times 10^6$ UI/m^2 administrados por vía intravenosa durante 72 horas. Este ciclo de tratamiento puede repetirse cada 28 días durante un máximo de cuatro ciclos. En una modalidad, un régimen de IL-2 decreciente comprende 18 000 000 UI/m^2 el día 1, 9 000 000 UI/m^2 el día 2 y 4 500 000 UI/m^2 los días 3 y 4.

En una modalidad, el régimen de IL-2 comprende la administración de IL-2 pegilada cada 1, 2, 4, 6, 7, 14 o 21 días a una dosis de 0,10 mg/día a 50 mg/día.

5. **Transferencia celular adoptiva**

La transferencia celular adoptiva (ACT) es una forma eficaz de inmunoterapia e implica la transferencia de células inmunitarias con actividad antitumoral a pacientes con cáncer. ACT es un enfoque de tratamiento que implica la identificación, *in vitro*, de linfocitos con actividad antitumoral, la expansión in vitro de estas células a grandes cantidades y su infusión en el hospedero portador del cáncer. Los linfocitos utilizados para la transferencia adoptiva pueden derivarse del estroma de tumores extirpados (linfocitos infiltrantes de tumor o TIL). Los TIL para ACT pueden prepararse como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL se preparan, por ejemplo, de acuerdo con un método como se describe en la Figura 1 (en particular, por ejemplo, la Figura 1B y/o la Figura 1C). También pueden derivarse o de sangre si están

diseñados genéticamente para expresar receptores de células T antitumorales (TCR) o receptores de antígenos quiméricos (CAR), enriquecidos con cultivos mixtos de células tumorales y linfocitos (MLTC) o clonados mediante el uso de células presentadoras de antígenos autólogas y péptidos derivados de tumores. La ACT en la que los linfocitos se originan del hospedero portador del cáncer que se va a infundir se denomina ACT autóloga. La publicación de EE.UU. núm. 2011/0052530 se refiere a un método para realizar terapia celular adoptiva para promover la regresión del cáncer, principalmente para el tratamiento de pacientes que padecen melanoma metastásico, que se incorpora como referencia en su totalidad para estos métodos. En algunas modalidades, los TIL pueden administrarse como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los TIL pueden administrarse en una sola dosis. Tal administración puede ser mediante inyección, por ejemplo, inyección intravenosa. En algunas modalidades, pueden administrarse TIL y/o linfocitos citotóxicos en múltiples dosis. La dosificación puede ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de seis veces al año. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. La administración de TIL y/o linfocitos citotóxicos puede continuar tanto tiempo como sea necesario.

6. **Métodos adicionales de tratamiento**

En otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis con eficacia terapéutica de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de tal manera que antes de administrar la dosis con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la dosis con eficacia terapéutica de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, se ha administrado al sujeto un régimen de linfodepleción no mielosupresora.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el régimen de linfodepleción no mielosupresora comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguido de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado para comprender además la etapa de tratar al sujeto con un régimen de IL-2 de dosis alta que comienza el día después de la administración de las células TIL al sujeto.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el régimen de IL-2 de dosis alta comprende 600 000 o 720 000 UI/kg administradas como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es un tumor sólido.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal o carcinoma de células renales.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado anteriormente de tal manera que el cáncer es melanoma.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es HNSCC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado anteriormente de manera que el cáncer es un cáncer de cuello uterino.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado anteriormente de manera que el cáncer es NSCLC.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es glioblastoma (que incluye GBM).

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es cáncer gastrointestinal.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es un cáncer hipermutado.

En otra modalidad, la invención proporciona el método para tratar a un sujeto con cáncer descrito en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es un cáncer hipermutado pediátrico.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente para su uso en un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente para su uso en

un método para tratar a un sujeto con cáncer que comprende administrar al sujeto una dosis con eficacia terapéutica de la composición de TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que antes de administrar al sujeto la dosis con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, se ha administrado al sujeto un régimen de linfodepleción no mielosupresora.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el régimen de linfodepleción no mielosupresora comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis de 60 mg/m^2/día durante dos días seguido de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada para comprender además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 en dosis alta que comienza el día después de la administración de las células TIL al paciente.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el régimen de IL-2 en dosis alta comprende 600 000 o 720 000 UI/kg administradas como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es un tumor sólido.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición

de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal o carcinoma de células renales.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de modo que el cáncer es melanoma.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es HNSCC.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es un cáncer de cuello uterino.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es NSCLC.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es glioblastoma (que incluye GBM).

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es cáncer gastrointestinal.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es un cáncer hipermutado.

En otra modalidad, la invención proporciona la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el cáncer es un cáncer hipermutado pediátrico.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una dosis con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una dosis con eficacia terapéutica de la composición de TIL.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un régimen de linfodepleción no mielosupresora y después administrar al sujeto una dosis con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o una dosis con eficacia terapéutica de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de tal manera que antes de administrar al sujeto la dosis con eficacia terapéutica de la población terapéutica de TIL o la dosis con eficacia terapéutica de la composición de TIL, se ha administrado al sujeto un régimen de linfodepleción no mielosupresora.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el régimen de linfodepleción no mielosupresora comprende las etapas de administración de ciclofosfamida a una dosis

de 60 mg/m^2/día durante dos días seguido de la administración de fludarabina a una dosis de 25 mg/m^2/día durante cinco días.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente o el uso de la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado para comprender además la etapa de tratar al paciente con un régimen de IL-2 en dosis alta que comienza el día después de la administración de las células TIL al paciente.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente modificada de manera que el régimen de IL-2 en dosis alta comprende 600 000 o 720 000 UI/kg administrado como una infusión intravenosa en bolo de 15 minutos cada ocho horas hasta la tolerancia.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es un tumor sólido.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer causado por el virus del papiloma humano, cáncer de cabeza y cuello (que incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), glioblastoma (que incluye GBM), cáncer gastrointestinal, cáncer renal o carcinoma de células renales.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es melanoma, HNSCC, cánceres de cuello uterino, NSCLC, glioblastoma (que incluye GBM) y cáncer gastrointestinal.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es melanoma.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es HNSCC.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es un cáncer de cuello uterino.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es NSCLC.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es glioblastoma (que incluye GBM).

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es cáncer gastrointestinal.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es un cáncer hipermutado.

En otra modalidad, la invención proporciona el uso de la población terapéutica de TIL o la composición de TIL descrita en cualquiera de los párrafos anteriores según corresponda anteriormente, modificado de manera que el cáncer es un cáncer hipermutado pediátrico.

EJEMPLOS

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

interpretarse para abarcar todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente descripción.

EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA PROCESOS PRE-REP Y REP

Este ejemplo describe el procedimiento para la preparación de medios de cultivo de tejidos para su uso en protocolos que implican el cultivo de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) derivados de varios tipos de tumores que incluyen, entre otros, melanoma metastásico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinoma de ovario, carcinoma de mama triple negativo y adenocarcinoma de pulmón. Estos medios pueden usarse para la preparación de cualquiera de los TIL descritos en la presente solicitud y en los ejemplos.

Preparación de CM1

Los siguientes reactivos se retiraron del almacenamiento en frío y se calentaron en un baño de agua a 37 °C: (RPMI1640, suero AB humano, L-glutamina 200 mM). Se preparó el medio CM1 de acuerdo con la Tabla 19 a continuación mediante la adición de cada uno de los ingredientes en la sección superior de una unidad de filtro de 0,2 µm apropiada para el volumen a filtrar. Se almacenó a 4 °C.

TABLA 19: Preparación de CM1

Ingrediente	Concentración final	Volumen final 500 ml	Volumen final IL
RPMI1640	NA	450 ml	900 ml
Suero AB humano, inactivado por calor al 10 %	50 ml	100 ml	
L-glutamina 200 mM	2 mM	5 ml	10 ml
BME 55 mM	55 µM	0,5 ml	1 ml
Sulfato de gentamicina a 50 mg/ml	50 µg/ml	0,5 ml	1 ml

El día de uso, precalentar la cantidad requerida de CM1 en un baño de agua a 37 °C y agregar IL-2 a 6000 UI/ml.

Suplementación adicional: según sea necesario de acuerdo con la Tabla 20.

TABLA 20: Suplementación adicional de CM1, según sea necesario.

Suplemento	**Concentración de reserva**	**Dilución**	**Concentración final**
GlutaMAX™	200 mM	1:100	2 mM
Penicilina/estreptomicina	Penicilina a 10 000 U/ml estreptomicina a 10 000 µg/ml	1:100	Penicilina a 100 U/ml estreptomicina a 100 µg/ml
Anfotericina B	250 µg/ml	1:100	2,5 µg/ml

Preparación de CM2

Retirar el CM1 preparado del refrigerador o preparar CM1 fresco como se indica en la Tabla 19 anterior. Se retiró el AIM-V® del refrigerador y se preparó la cantidad de CM2 necesaria mediante la mezcla del CM1 preparado con un volumen igual de AIM-V® en un frasco de medio estéril. Se añadió IL-2 a 3000 UI/ml al medio CM2 el día de su uso. Se preparó suficiente cantidad de CM2 con IL-2 a 3000 UI/ml el día de su uso. Se etiquetó el frasco de medio CM2 con su nombre, las iniciales del preparador, la fecha en que se filtró/preparó, la fecha de vencimiento de dos semanas y se almacenó a 4 °C hasta que se necesitó para el cultivo de tejidos.

Preparación de CM3

Se preparó CM3 el día en que se requirió su uso. CM3 era el mismo que el medio AIM-V®, suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml el día de su uso. Se preparó una cantidad de CM3 suficiente para las necesidades experimentales mediante la adición de la solución de reserva de IL-2 directamente al frasco o bolsa de AIM-V. Se mezcló bien con agitación suave. El frasco se etiquetó con "IL-2 a 3000 UI/ml" inmediatamente después de agregarla al AIM-V. En caso de exceso de CM3, guárdelo en frascos a 4 °C etiquetados con el nombre del medio, las iniciales del preparador, la fecha en que se

preparó el medio y su fecha de vencimiento (7 días después de la preparación). Se desecharon los medios suplementados con IL-2 después de 7 días de almacenamiento a 4 °C.

Preparación de CM4

CM4 era igual que CM3, con el suplemento adicional de GlutaMAX™ 2 mM (concentración final). Por cada 1 L de CM3, se añadieron 10 ml de GlutaMAX™ 200 mM. Se preparó una cantidad de CM4 suficiente para las necesidades experimentales mediante la adición de la solución de reserva de IL-2 y la solución de reserva de GlutaMAX™ directamente al frasco o bolsa de AIM-V. Se mezcló bien con agitación suave. El frasco se etiquetó con "IL-2 a 3000 IL/ml y GlutaMAX" inmediatamente después de agregarlos al AIM-V. En caso de exceso de CM4, se almacenó en frascos a 4 °C etiquetados con el nombre del medio, "GlutaMAX", y su fecha de vencimiento (7 días después de la preparación). Se desecharon los medios suplementados con IL-2 después de 7 días de almacenamiento a 4 °C.

EJEMPLO 2: USO DEL COCTEL DE CITOCINAS IL-2, IL-15 E IL-21

Este ejemplo describe el uso de las citocinas IL-2, IL-15 e IL-21, que sirven como factores de crecimiento de células T adicionales, en combinación con el proceso de TIL de los Ejemplos A a G.

Con el uso de los procesos descritos en la presente descripción, se cultivaron TIL a partir de tumores colorrectales, de melanoma, cuello uterino, mama triple negativo, pulmón y riñón en presencia de IL-2 en un brazo del experimento y, en lugar de IL-2, una combinación de IL-2, IL-15 e IL-21 en otro brazo al inicio del cultivo. Al finalizar la pre-REP, se evaluó la expansión, el fenotipo y la función (CD107a + e IFN-γ) de los cultivos y el repertorio TCR Vβ. IL-15 e IL-21 se describen en otra parte de la presente descripción y en Gruijl y otros, IL-21 promotes the expansion of CD27+CD28+ tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells, *Santegoets*, *S. J.*, J Transl Med., **2013,** *11:*37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

Los resultados mostraron que se observó una mejor expansión de TIL (> 20 %), tanto en células $CD4^+$ como $CD8^+$ en las condiciones tratadas con IL-2, IL-15 e IL-21 en múltiples histologías con relación a las condiciones con IL-2 solamente. Hubo un sesgo hacia una población predominantemente $CD8^+$ con un repertorio de TCR Vβ sesgado en los TIL que se obtienen de los cultivos tratados con IL-2, IL-15 e IL-21 en relación

con los cultivos con IL-2 solamente. IFN-γ y CD107a estaban elevados en los TIL tratados con IL-2, IL-15 e IL-21, en comparación con los TIL tratados solo con IL-2.

EJEMPLO 3: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE RESERVA DE IL-2 (CELLGENIX)

Este ejemplo describe el proceso de disolución de interleucina 2 humana recombinante liofilizada purificada en muestras de reserva adecuadas para su uso en otros protocolos de cultivo de tejidos, que incluyen todos los descritos en la presente solicitud y ejemplos, que incluyen los que implican el uso de rhIL-2.

Procedimiento

Se preparó una solución de ácido acético al 0,2 % (HAc). Se transfirieron 29 ml de agua estéril a un tubo cónico de 50 ml. Se añadió 1 ml de ácido acético 1 N al tubo cónico de 50 ml. Se mezcló bien mediante inversión del tubo 2-3 veces. Se esterilizó la solución de HAc mediante filtración con un filtro Steriflip

Se preparó HSA al 1 % en PBS. Se añadieron 4 ml de solución de reserva de HSA al 25 % a 96 ml de PBS en una unidad de filtro estéril de 150 ml. Se filtró la solución. Se almacenó a 4 °C. Por cada vial de rhIL-2 preparado, complete los formularios.

Se preparó una solución de reserva de rhIL-2 (concentración final 6×10^6 UI/ml). Cada lote de rhIL-2 era diferente y la información requerida se encuentra en el Certificado de Análisis (COA) del fabricante, tal como: 1) masa de rhIL-2 por vial (mg), 2) actividad específica de rhIL-2 (UI/mg) y 3) volumen de reconstitución recomendado de HAc al 0,2 % (ml).

Se calculó el volumen de HSA al 1 % requerido para el lote de rhIL-2 mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\text{Masa en el vial (mg) x actividad biológica } (\frac{IU}{mg})}{6x10^6 \frac{IU}{mL}} \right) - \textit{vol. de HAc (mL)} = \textit{vol. de HSA al 1 \% (mL)}$$

Por ejemplo, de acuerdo con el COA del lote 10200121 de rhIL-2 de CellGenix, la actividad específica para el vial de 1 mg es de 25×10^6 UI/mg. Se recomienda reconstituir la rhIL-2 en 2 ml de HAc al 0,2 %.

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\ \frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2{,}167mL\ HSA$$

Se limpió el tapón de caucho del vial de IL-2 con una toallita con alcohol. Con una aguja 16G conectada a una jeringa de 3 ml, se inyectó el volumen recomendado de HAc al 0,2 % en el vial. Debe tenerse el cuidado de no sacar el tapón al retirar la aguja. Se invirtió el vial 3 veces y se agitó hasta que se disolvió todo el polvo. El tapón se retiró con cuidado y se dejó a un lado en una toallita con alcohol. Se añadió el volumen calculado de HSA al 1 % al vial.

Almacenamiento de la solución de rhIL-2. Para un almacenamiento a corto plazo (<72 horas), el vial se almacenó a 4 °C. Para un almacenamiento a largo plazo (> 72 horas), el vial se dividió en alícuotas en volúmenes más pequeños y se almacenó en crioviales a -20 °C hasta que esté listo para usar. Se evitaron los ciclos de congelación/descongelación. Se registró una fecha de vencimiento de 6 meses después de la fecha de preparación. Las etiquetas de rh-IL-2 incluían el número de catálogo y de proveedor, el número de lote, la fecha de vencimiento, las iniciales del operario, la concentración y el volumen de la alícuota.

EJEMPLO 4: PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

Este ejemplo describe el método del proceso de crioconservación para TIL preparados con el procedimiento cerrado y abreviado descrito en el Ejemplo G mediante el uso del congelador de velocidad controlada CryoMed, modelo 7454 (Thermo Scientific).

El equipo utilizado fue el siguiente: estante porta casetes de aluminio (compatible con bolsas para congelador CS750), casetes de almacenamiento criogénico para bolsas de 750 ml, tanque de nitrógeno líquido de baja presión (22 psi), refrigerador, sensor termopar (tipo cinta para bolsas) y bolsas de congelación CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

El proceso de congelación proporcionó una velocidad de 0,5 °C desde la nucleación hasta -20 °C y una velocidad de enfriamiento de 1 °C por minuto hasta una temperatura final de -80 °C. Los parámetros del programa fueron los siguientes: Etapa 1 - esperar a 4 °C; Etapa 2: 1,0 °C/min (temperatura de la muestra) hasta -4 °C; Etapa 3: 20,0 °C/min

(temperatura de la cámara) hasta -45 °C; Etapa 4: 10.0 °C/min (temperatura de la cámara) hasta -10.0 °C; Etapa 5: 0,5 °C/min (temperatura de la cámara) hasta -20 °C; y Etapa 6: 1,0 °C/min (temperatura de la muestra) hasta -80 °C.

EJEMPLO 5: PROCESO ILUSTRATIVO DE GEN 3

El ejemplo proporciona una comparación entre los procesos de Gen 2 y Gen 3. Este ejemplo describe el desarrollo de una plataforma robusta de expansión de TIL. Las modificaciones al proceso de Gen 2 reducen el riesgo y agilizan el proceso de producción al reducir el número de intervenciones del operario, reducen el tiempo total de fabricación, optimizan el uso de reactivos y facilitan un proceso flexible de producción de células semicerrado y semiautomatizado abierto a la fabricación de alto rendimiento a escala comercial.

Los TIL de proceso de Gen 2 y Gen 3 se componen de TIL autólogos derivados de un paciente individual a través de la extirpación quirúrgica de un tumor y después se expanden ex vivo. La etapa de primera expansión con sensibilización del proceso de Gen 3 fue un cultivo celular en presencia de interleucina 2 (IL-2) y el anticuerpo monoclonal OKT3, que se dirige al correceptor de células T CD3 en un andamiaje de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) irradiadas.

La fabricación de productos de TIL Gen 2 consistió en dos fases: 1) Previa a la expansión rápida (pre-REP) y 2) Protocolo de expansión rápida (REP). Durante la pre-REP, los tumores extirpados se cortaron en ≤ 50 fragmentos de 2-3 mm en cada dimensión, los cuales se cultivaron con medio de cultivo que contenía suero (medio RPMI 1640 que contenía HuSAB al 10 % suplementado) y 6000 UI/ml de interleucina 2 (IL-2) por un período de 11 días. El día 11, los TIL se cosecharon y se introdujeron en la expansión REP secundaria a gran escala. La REP consiste en la activación de ≤200 × 10^6 de las células viables de pre-REP en un cocultivo de 5 × 10^9 células alimentadoras de PBMC alogénicas irradiadas cargadas con 150 µg de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3) en un volumen de 5 L de CM2 suplementado con 3000 UI/ml de rhIL-2 durante 5 días. En el día 16 del cultivo el volumen se redujo en 90 % y la fracción de células se divide en múltiples frascos G-REX-500 a ≥ 1 × 10^9 linfocitos viables/frasco y QS a 5 L con CM4. Los TIL se incuban durante 6 días más. La REP se recolecta el día 22, se lava, se formula y se crioconserva antes de enviarlo a -150 ^oC al sitio clínico para su infusión.

La fabricación de productos de TIL Gen 3 consistió en tres fases: 1) Protocolo de primera expansión con sensibilización 2) Protocolo de segunda expansión rápida (también conocido como fase de expansión rápida o REP) y 3) División de subcultivo. Para efectuar la propagación de TIL de la primera expansión con sensibilización, el tumor extirpado se cortó en ≤ 120 fragmentos de 2-3 mm en cada dimensión. En el día 0 de la primera expansión con sensibilización, una capa de células alimentadoras de aproximadamente 2,5 × 10^8 células alimentadoras de PBMC irradiadas alogénicas cargadas con OKT-3 se estableció en un área de superficie de aproximadamente 100 cm^2 en cada uno de los vasos 3 100 MCS. Los fragmentos tumorales se distribuyeron y cultivaron en los vasos 3 100 MCS, cada uno con 500 ml de medio de cultivo CM1 que contenía suero y 6000 UI/ml de interleucina 2 (IL-2) y 15 µg de OKT-3 durante un período de 7 días. En el día 7, REP se inició mediante la incorporación de una capa de células alimentadoras adicional de aproximadamente 5 × 10^8 células alimentadoras de PBMC irradiadas alogénicas cargadas con OKT-3 en la fase de cultivo de tumor fragmentado en cada uno de los vasos 3 100 MCS y cultivo con 500 ml de medio de cultivo CM2 y 6000 UI/ml de IL-2 y 30 µg de OKT-3. La iniciación de REP se mejoró mediante la activación de todo el cultivo de la primera expansión con sensibilización en el mismo recipiente con el uso de la transferencia de fluido de sistema cerrado de células alimentadoras cargadas con OKT3 en el recipiente 100MCS. Para Gen 3, el aumento o la división de TIL involucró etapas del proceso en las que el cultivo celular completo se escaló a un recipiente más grande a través de la transferencia de fluido de sistema cerrado y se transfirió (de un frasco de 100 M a un frasco de 500 M) y se añadieron 4 L adicionales de medio CM4. Las células REP se recolectaron el día 16, se lavaron, formularon y crioconservaron antes de enviarlas a -150 ˚C al sitio clínico para su infusión.

En general, el proceso de Gen 3 es una plataforma de expansión más corta, más escalable y fácilmente modificable que se adaptará a una producción consistente y a la comparabilidad de procesos.

Tabla 21: Comparación del proceso de producción Gen 2 ilustrativo y Gen 3 ilustrativo.

Etapa	**Proceso (Gen 2)**	**Proceso (Gen 3)**
Pre REP- día 0	Hasta 50 fragmentos/1-G-Rex 100MCS - 11 días En 1 L de medio CM1	Todo el tumor hasta 120 fragmentos divididos uniformemente entre hasta 3 frascos. 1 frasco: 1-60 fragmentos

	+ IL-2 (6000 UI/ml)	2 frascos: 61-89 fragmentos 3 frascos: 90-120 fragmentos 7 días en 200-500 ml de medio CM1 + IL-2 (6000 UI/ml) $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras/frasco Opcionalmente 15 µg de OKT-3/frasco
Inicio de REP	Directo a REP- Día 11- <200e^6 TIL (1) G-Rex 500MCS en 5 L de medio CM2 IL-2 (3000 UI/ml) 5×10^9 células alimentadoras 150 µg de OKT-3	Directo a REP- Día 7-todas las células TIL- mismo G-Rex 100MCS Agregar 500 ml de medio CM2 IL-2 (6000 UI/ml) 5×10^8 células alimentadoras/frasco 30 µg de OKT-3/frasco
Propagación o escalado de TIL	Reducir el volumen y dividir la fracción celular en hasta 5 G-REX 500MCS 4,5 L de medio CM4 + IL-2 (3000 UI/ml) $\geq 1 \times 10^9$ TVC/frasco Dividir día 16	Cada G-REX 100MCS (1 L) se transfiere a 1 G-REX 500MCS Agregar 4 L de medio CM4 + IL-2 (3000 UI/ml) Escalar del día 9 al 11
Cosecha	Cosechar el día 22,	Cosechar el día 16 Lavadora de células automatizada LOVO

	Lavadora de células automatizada LOVO	
Formulación final	Producto crioconservado IL2 a 300 UI/ml- CS10 en LN_2, alícuotas múltiples	Producto crioconservado IL-2 a 300 UI/ml-CS10 en LN_2, alícuotas múltiples
Tiempo de procesamiento	**22 días**	**16 días**

El día 0, para ambos procesos, el tumor se lavó 3 veces y los fragmentos se aleatorizaron y dividieron en dos grupos; un grupo por proceso. Para el proceso de Gen 2, los fragmentos se transfirieron a un frasco GREX 100MCS con 1 L de medio CM1 que contenía rhIL-2 a 6000 UI/ml. Para el proceso de Gen 3, los fragmentos se transfirieron a un frasco GREX100MCS con 200-500 ml de CM1 que contenía rhIL-2 a 6000 UI/ml, opcionalmente 15 µg de OKT-3 y $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras.

La siembra de TIL para el día de inicio de Rep se produjo en días diferentes de acuerdo con cada proceso. Para el proceso de Gen 2, en el que el volumen del frasco G-REX 100MCS se redujo en un 90 %, la suspensión de células recolectadas se transfirió a un nuevo G-REX 500MCS para comenzar la iniciación de REP el día 11 en medio CM2 que contenía IL-2 (3000 UI/ml), más células alimentadoras 5e9 y OKT-3 (30 ng/ml). Las células se expandieron y dividieron el día 16 en múltiples frascos GREX 500 MCS con medio CM4 con IL-2 (3000 UI/ml) según el protocolo. A continuación, el cultivo se cosechó y se crioconservó el día 22 según el protocolo.

Para el proceso de Gen 3, el inicio de REP se produjo el día 7, en el que se utilizó el mismo G-REX 100MCS para el inicio de REP. Brevemente, se añadieron 200-500 ml de medio CM2 que contenía IL-2 (6000 UI/ml) y 5×10^8 células alimentadoras con 30 µg de OKT-3 a cada frasco. El día 9-11 se escaló el cultivo. El volumen completo de G-Rex100M (1 l) se transfirió a un G-REX 500MCS y se añadieron 4 L de CM4 que contenía IL-2 (3000 UI/ml). Los frascos se incubaron durante 5 días. Los cultivos se cosecharon y crioconservaron el día 16.

En particular, la siembra de TIL para el día de inicio de Rep se produjo en días diferentes de acuerdo con cada proceso. Para el proceso de Gen 2, en el que el volumen del frasco G-REX 100MCS se redujo en un 90 %, la suspensión de células recolectadas se transfirió a un nuevo G-Rex 500MCS para comenzar la iniciación de REP el día 11 en medio CM2 que contenía IL-2 (3000 UI/ml) más células alimentadoras 5e9 y OKT-3 (30 ng/ml). Las células se expandieron y dividieron el día 16 en múltiples frascos G-Rex 500 MCS con medio CM4 que contenía IL-2 (3000 UI/ml) según el protocolo. A continuación, el cultivo se cosechó y se crioconservó el día 22 según el protocolo.

En particular, la siembra para el proceso de Gen 3, el inicio de REP se produjo el día 7, en el que se utilizó el mismo G-Rex 100MCS para el inicio de REP. Brevemente, se añadieron a cada frasco 800 ml de medio CM2 que contenía IL-2 (6000 UI/ml) y células alimentadoras 1e9 con 30 µg de OKT-3. El día 11, el cultivo se escaló para las tres corridas. Se transfirió todo el volumen del G-Rex100MCS a un G-Rex 500MCS y se añadieron 4 L de CM4 que contenía IL-2 (3000 UI/ml). Los frascos se incubaron durante 5 días. Los cultivos se cosecharon y crioconservaron el día 16.

Se incluyeron tres tumores diferentes en la comparación, dos tumores de pulmón (L4054 y L4055) y un tumor de melanoma (M1085T).

Los medios CM1 (medio de cultivo 1), CM2 (medio de cultivo 2) y CM4 (medio de cultivo 4) se prepararon por adelantado y se mantuvieron a 4 °C para L4054 y L4055. Se prepararon medios CM1 y CM2 sin filtración para comparar el crecimiento celular con y sin filtración de medios.

El medio se calentó a 37 °C hasta 24 horas de anticipación para el tumor L4055 en el inicio de REP y el escalado.

Resumen de resultados

Gen 3 cayó dentro del 30 % de Gen 2 para el de células viables totales logradas. El producto final de Gen 3 exhibió una mayor producción de INF-γ después de la reestimulación. El producto final de Gen 3 exhibió una mayor diversidad clonal medida por las secuencias de CDR3 únicas totales presentes. El producto final de Gen 3 exhibió una mayor longitud media de los telómeros.

Resultados logrados

Conteo de células y % de viabilidad:

La expansión pre REP y REP en los procesos de Gen 2 y Gen 3 siguió los detalles descritos anteriormente.

Tabla 22: Conteos de células pre-REP. Para cada tumor, los dos grupos contenían el mismo número de fragmentos. Debido al pequeño tamaño de los tumores, no se alcanzó el número máximo de fragmentos por frasco. Las células pre-REP totales (TVC) se cosecharon y contaron el día 11 para el proceso de Gen 2 y el día 7 para el proceso de Gen 3. Para comparar los dos brazos de pre-REP, el conteo de células se dividió entre el número de fragmentos proporcionados en el cultivo para calcular un promedio de células viables por fragmento. Como se indica en la tabla a continuación, el proceso de Gen 2 logró el crecimiento consistente de más células por fragmento en comparación con el proceso de Gen 3. Un cálculo extrapolado del número de TVC esperado para el proceso de Gen 3 en el día 11, que se calculó al dividir TVC pre-REP por 7 y después multiplicar por 11.

Tabla 22: Conteos de células pre-REP

ID del tumor	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Proceso	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
TVC pre-REP	1,42E + 08	4,32E + 07	2,68E + 07	1,38E + 07	1,23E + 07	3,50E + 06
Número de fragmentos	21	21	24	24	16	16
TVC promedio por fragmento en la cosecha pre REP	6,78E + 06	2,06E + 06	1,12E + 06	5,75E + 05	7,66E + 05	2,18E + 05

*** L4055, medio sin filtrar.**

Tabla 23: Conteo de células viables totales y expansión en veces en el producto final de TIL: Para los procesos de Gen 2 y Gen 3, TVC se contó por condición de

proceso y se generó el porcentaje de células viables para cada día del proceso. En la cosecha, se recolectaron las células del día 22 (Gen 2) y del día 16 (Gen 3) y se estableció el conteo de TVC. A continuación, TVC se dividió por el número de fragmentos proporcionados el día 0, para calcular un promedio de células viables por fragmento. La expansión en veces se calculó dividiendo TVC en la cosecha entre TVC de inicio de REP. Como se muestra en la tabla, que compara Gen 2 y Gen 3, las expansiones en veces fueron similares para L4054; en el caso de L4055, la expansión en veces fue mayor para el proceso de Gen 2. Específicamente, en este caso, el medio se calentó 24 antes del día de inicio de REP. También se observó una mayor expansión en veces en Gen 3 para M1085T. Un cálculo extrapolado del número de TVC esperado para el proceso de Gen 3 en el día 22, que se calculó al dividir TVC de REP por 16 y después multiplicar por 22.

Tabla 23: Conteo de células viables totales y expansión en veces en el producto final de TIL

ID del tumor	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Proceso	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
# Fragmentos	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**
TVC al inicio de REP	1,42E + 08	4,32E + 07	2,68E + 07	1,38E + 07	1,23E + 07	3,50E + 06
TVC en escalado (que incluye las células alimentadoras)	3,36E + 09	9,35E + 08	3,49E + 09	8,44E + 08	1,99E + 09	3,25E + 08
TVC en la cosecha	6,67E + 10	1,84E + 10	5,52E + 10	8,76E + 09	1,13E + 10	7,68E + 09
Expansión en veces Cosecha de REP/ Inicio de REP	**468.4**	**425.9**	**2056.8**	**634.6**	**925.0**	**2197.2**
TVC/fragmento	3,18E + 09	8,77E + 08	2,30E + 09	3,65E + 08	7,09E + 08	4,80E + 08

(en cosecha de REP)						

*** L4055, medio sin filtrar.**

Tabla 24: % de viabilidad del producto final de TIL: Tras la cosecha, los productos finales de TIL de REP se compararon con los criterios de liberación para el % de viabilidad. Todas las condiciones para los procesos de Gen 2 y Gen 3 superaron el criterio de viabilidad del 70 % y fueron comparables entre procesos y tumores.

Tabla 24: % de viabilidad de REP

ID del tumor	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Proceso	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Inicio de REP	98,23 %	97,97 %	97,43 %	92,03 %	81,85 %	68,27 %
Escalado	94,00 %	93,57 %	90,50 %	95,93 %	78,55 %	71,15 %
Cosecha	87,95 %	89,85 %	87,50 %	86,70 %	86,10 %	87,45 %

*** L4055, medio sin filtrar.**

Tabla 25: Conteo de células estimado por frasco adicional para el proceso de Gen 3. Debido al número de fragmentos por frasco por debajo del número máximo requerido, se calculó un conteo de células estimado el día de la cosecha para cada tumor. La estimación se basó en la expectativa de que los tumores clínicos fueran lo suficientemente grandes como para sembrar 2 o 3 frascos el día 0.

Tabla 25: Cálculo del conteo de células estimado extrapolado para los frascos 2 y 3 a escala completa en el proceso de Gen 3

ID del tumor	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Proceso de Gen 3	**2 frascos**	**3 frascos**	**2 frascos**	**3 frascos**	**2 frascos**	**3 frascos**
Cosecha estimada	3,68E + 10	5,52E + 10	1,75E + 10	2,63E + 10	1,54E + 10	2,30E + 10

INMUNOFENOTIPADO:

Comparación de marcadores fenotípicos en el producto final de TIL:

Tres tumores L4054, L4055 y M1085T se sometieron a expansión de TIL en los procesos de Gen 2 y Gen 3. Tras la cosecha, los productos finales de REP TIL se sometieron a análisis de citometría de flujo para analizar la pureza, diferenciación y los marcadores de memoria. Para todas las condiciones, el porcentaje de células TCR a/b+ fue superior al 90 %.

Los TIL cosechados del proceso de Gen 3 mostraron una mayor expresión de CD8 y CD28 en comparación con los TIL cosechados del proceso de Gen 2. El proceso de Gen 2 mostró un mayor porcentaje de CD4+. **Consulte la Figura 3 (A, B, C)**.

Comparación de marcadores de memoria en el producto final de TIL:

Los TIL extraídos del proceso de Gen 3 mostraron una mayor expresión en los compartimentos de memoria centrales en comparación con los TIL del proceso de Gen 2. **Consulte la Figura 4 (A, B, C)**.

Comparación de marcadores de activación y agotamiento en el producto final de TIL:

Los marcadores de activación y agotamiento se analizaron en TIL de dos tumores L4054 y L4055 para comparar el producto final de TIL de los procesos de expansión de TIL Gen 2 y Gen 3. Los marcadores de activación y agotamiento fueron comparables entre los procesos de Gen 2 y Gen 3. **Ver, Figura 5 (A, B); Figura 6 (A, B).**

SECRECIÓN DE INTERFERÓN GAMMA TRAS LA REESTIMULACIÓN:

El día de la cosecha, el día 22 para Gen 2 y el día 16 para Gen 3, los TIL se sometieron a una reestimulación durante la noche con placas anti-CD3 recubiertas para L4054 y L4055. La reestimulación en M1085T se realizó mediante el uso de perlas anti-CD3, CD28 y CD137. El sobrenadante se recogió después de 24 horas de reestimulación en todas las condiciones y se congeló el sobrenadante. El análisis de IFNγ por ELISA se evaluó en el sobrenadante de ambos procesos al mismo tiempo mediante el uso de la misma placa ELISA. Se observó una mayor producción de IFNγ del proceso de Gen 3 en los tres tumores analizados. **Consulte la Figura 7 (A, B, C).**

MEDICIÓN DE NIVELES DE IL-2 EN LOS MEDIOS DE CULTIVO:

Para comparar el consumo de IL-2 entre el proceso de Gen 2 y Gen 3, se recogió el sobrenadante celular en el inicio de REP, el escalado y el día de la cosecha, en los

tumores L4054 y L4055. La cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cultivo celular se midió mediante el kit de ELISA Quantitate de R&D. La tendencia general indica que la concentración de IL-2 permanece más alta en el proceso de Gen 3 en comparación con el proceso de Gen 2. Es probable que esto se deba a la mayor concentración de IL-2 en el inicio de REP (6000 UI/ml) para Gen 3 junto con el arrastre de los medios durante todo el proceso. **Consulte la Figura 8 (A, B).**

SUSTRATO METABÓLICO Y ANÁLISIS DE METABOLITOS

Los niveles de sustratos metabólicos tales como D-glucosa y L-glutamina se midieron como sustitutos del consumo total de medios. Se midieron sus metabolitos recíprocos, como el ácido láctico y el amoníaco. La glucosa es un azúcar simple en los medios que las mitocondrias utilizan para producir energía en forma de ATP. Cuando se oxida la glucosa, se produce ácido láctico (el lactato es un éster de ácido láctico). El lactato se produce fuertemente durante la fase de crecimiento exponencial de las células. Los altos niveles de lactato tienen un impacto negativo en los procesos de cultivo celular. **Consulte la Figura 9 (A, B).**

Los medios metabolizados para L4054 y L4055 se recogieron en el inicio de REP, el escalado y los días de cosecha tanto para el proceso de Gen 2 como para Gen 3. La recolección de los medios metabolizados fue para Gen 2 el día 11, el día 16 y el día 22; para Gen 3 fue el día 7, el día 11 y el día 16. El sobrenadante se analizó en un bioanalizador CEDEX para determinar las concentraciones de glucosa, ácido láctico, glutamina, glutamax y amoniaco.

La L-glutamina es un aminoácido esencial inestable que se requiere en las formulaciones de medios de cultivo celular. La glutamina contiene una amina, y este grupo estructural amida puede transportar y entregar nitrógeno a las células. Cuando la L-glutamina se oxida, la célula produce un subproducto de amoníaco tóxico. Para contrarrestar la degradación de la L-glutamina, el medio para los procesos de Gen 2 y Gen 3 se complementó con Glutamax, que es más estable en soluciones acuosas y no se degrada espontáneamente. En las dos líneas tumorales, el brazo de Gen 3 (proceso de 16 días) mostró una disminución de L-glutamina y Glutamax durante el proceso y un aumento de amoniaco a lo largo de REP. En el brazo de Gen 2 (proceso de 22 días) se observó una concentración constante de L-glutamina y Glutamax, y un ligero aumento en la producción de amoniaco. Los procesos de Gen 2 y Gen 3 fueron comparables el día de la cosecha (22 para Gen 2; 16 para Gen 3) para el amoníaco y mostraron una ligera diferencia en la degradación de L-glutamina. **Consulte la Figura 10 (A, B, C).**

REPETICIONES DE TELOMEROS POR FLOW - FISH:

La tecnología Flow-FISH se utilizó para medir la longitud promedio de la repetición de los telómeros en L4054 y L4055 bajo el proceso de Gen 2 y Gen 3. La determinación de la longitud relativa de los telómeros (RTL) se calculó mediante el uso del kit de telómeros PNA/FITC para el análisis de citometría de flujo de DAKO. Gen 3 mostró una longitud de telómeros comparable a Gen 2.

Análisis CD3

Para determinar la diversidad clonal de los productos celulares generados en cada proceso, se tomaron muestras del producto final de TIL recolectado para L4054 y L4055 y se ensayaron para el análisis de diversidad clonal mediante la secuenciación de la porción de CDR3 de los receptores de células T.

Tabla 26: Comparación de Gen 2 y Gen3 del porcentaje de secuencias de CDR3 únicas compartidas en L4054 en el producto de células cosechadas con TIL. Se comparten 199 secuencias entre el producto final de Gen 3 y Gen 2, que corresponde al 97,07 % del 80 % superior de secuencias de CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final de Gen 3.

Tabla 26: Comparación de secuencias de uCDR3 compartidas entre los procesos de Gen 2 y Gen 3 en L4054.

# uCDR3 (% de superposición)	**De todas las uCDR3**		**80 % superior de las uCDR3**	
	Gen 2	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Gen 2-L4054	8915	4355 **(48,85 %)**	205	199 **(97,07 %)**
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

Tabla 27: Comparación de Gen 2 y Gen3 del porcentaje de secuencias de CDR3 únicas compartidas en L4055 en el producto de células cosechadas con TIL. Se comparten 1833 secuencias entre el producto final de Gen 3 y Gen 2, que corresponde al 99,45 % del 80 % superior de las secuencias de CDR3 únicas de Gen 2 compartidas con el producto final de Gen 3.

Tabla 27: Comparación de secuencias de uCDR3 compartidas entre procesos de Gen 2 y Gen 3 en L4055.

# uCDR3 (% de superposición)	De todas las uCDR3		80 % superior de las uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 **(50,77 %)**	1843	1833 **(99,45 %)**
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

Los medios CM1 y CM2 se prepararon antes sin filtración y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso para el tumor L4055 para usar en el proceso de Gen 2 y Gen 3.

El medio se calentó a 37 °C durante 24 horas antes para el tumor L4055 el día de inicio de REP para el proceso de Gen 2 y Gen 3.

No se midió LDH en los sobrenadantes recogidos en los procesos.

El conteo de células TIL de M1085T se ejecutó con un contador de células del medidor de células K2.

En el tumor M1085T, las muestras no estaban disponibles, tales como el sobrenadante para el análisis metabólico, el producto de TIL para el análisis de los marcadores de activación y agotamiento, la longitud de los telómeros y el análisis de CD3-TCR vb.

CONCLUSIONES

Este ejemplo compara 3 tejidos tumorales de donantes independientes en términos de atributos de calidad funcional, además de la caracterización fenotípica extendida y el consumo de medios entre los procesos de Gen 2 y Gen 3.

Se evaluó la comparación de la expansión pre-REP y REP de Gen 2 y Gen 3 en términos de células viables totales generadas y viabilidad de la población total de células nucleadas. Las dosis de células TVC en el día de la cosecha no fueron comparables entre Gen 2 (22 días) y Gen 3 (16 días). Las dosis de células de Gen 3 fueron más bajas que las de Gen 2 en alrededor del 40 % del de células viables totales recolectadas en la cosecha.

Se calculó un número de células extrapolado para el proceso de Gen 3 que asumió que la cosecha pre-REP ocurrió el día 11 en lugar del día 7 y la cosecha de REP el día 22 en lugar del día 16. Ambos casos mostraron números de TVC más cercanos mediante el uso del proceso de Gen 3 en comparación con el proceso de Gen 2, lo que indicó que

la activación temprana permitió un mejor desempeño general en el crecimiento de TIL. Ver las tablas 4 y 5, fila inferior.

En el caso del valor extrapolado para frascos adicionales (2 o 3) en el proceso de Gen 3 que supone un tamaño mayor de tumor procesado y que alcanza el número máximo de fragmentos requeridos por proceso como se describe. Se observó que puede alcanzarse una dosis similar en TVC en la cosecha del día 16 para el proceso de Gen 3 en comparación con el proceso de Gen 2 en el día 22. Esta observación es importante e indica que una activación temprana del cultivo puede permitir un mejor rendimiento de TIL en menos tiempo de procesamiento.

Las comparaciones de expansión pre-REP y REP de Gen 2 y Gen 3 se evaluaron en términos de células viables totales generadas y viabilidad de la población total de células nucleadas. Las dosis de células TVC en el día de la cosecha no fueron comparables entre Gen 2 (22 días) y Gen 3 (16 días). Las dosis de células de Gen 3 fueron más bajas que las de Gen 2 en alrededor del 40 % del de células viables totales recolectadas en la cosecha.

En términos de caracterización fenotípica, se observó una mayor expresión de CD8+ y CD28+ en tres tumores en el proceso de Gen 3 en comparación con el proceso de Gen 2. Estos datos indican que el proceso de Gen 3 ha mejorado los atributos del producto de TIL final en comparación con Gen 2.

El proceso de Gen 3 mostró compartimentos de memoria central ligeramente más altos en comparación con el proceso de Gen 2.

Los procesos de Gen 2 y Gen 3 mostraron marcadores de activación y agotamiento comparables, a pesar de la duración más corta del proceso de Gen 3.

La producción de IFN gamma (IFNγ) fue 3 veces mayor en el producto final de Gen 3 en comparación con Gen 2 en los tres tumores analizados. Estos datos indican que el proceso de Gen 3 generó un producto de TIL altamente funcional y más potente en comparación con el proceso de Gen 2, posiblemente debido a la mayor expresión de CD8 y CD28 en Gen 3. La producción de IFN-γ fue 3 veces mayor en el producto final de Gen 3 en comparación con Gen 2 en los tres tumores analizados, lo que sugiere que el proceso de Gen 3 generó TIL altamente funcionales. La caracterización fenotípica sugirió tendencias positivas en Gen 3 hacia la expresión de CD8+, CD28+ en tres tumores en comparación con el proceso de Gen 2.

La longitud de los telómeros en el producto final de TIL entre Gen 2 y Gen 3 fue comparable.

Los niveles de glucosa y lactato fueron comparables entre el producto final de Gen 2 y Gen 3, lo que sugiere que los niveles de nutrientes en el medio del proceso de Gen 3 no se vieron afectados debido a la no ejecución de la eliminación de reducción de volumen en cada día del proceso y menos volumen de medio en general en el proceso, en comparación con Gen 2.

En general, el proceso de Gen 3 mostró una reducción de casi dos veces del tiempo de procesamiento en comparación con el proceso de Gen 2, lo que produciría una reducción sustancial en el costo de bienes (COG) para el producto de TIL expandido mediante el proceso de Gen 3.

El consumo de IL-2 indica una tendencia general de consumo de IL-2 en el proceso de Gen 2, y en el proceso de Gen 3, la IL-2 fue mayor debido a que no se eliminaron los medios viejos.

El proceso de Gen 3 mostró una mayor diversidad clonal medida por el análisis de secuencia de CDR3 TCRab.

La adición de células alimentadoras y OKT-3 el día 0 de pre-REP permitió una activación temprana de TIL y, en general, un mejor rendimiento de crecimiento de TIL mediante el uso del proceso de Gen 3.

La Tabla 28 describe varias modalidades y resultados para el proceso de Gen 3 en comparación con el proceso de Gen 2 actual:

Tabla 28: Proceso ilustrativo de Gen 3.

Etapa	Proceso de Gen 2	Proceso de Gen 3 optimizado
Pre REP- día 0	≤50 fragmentos 1X G-Rex 100MCS 1 litro de medio IL-2 (6000 UI/ml) 11 días	≤240 fragmentos ≤60 fragmentos/frasco ≤4 frascos ≤2 L de medio (500 ml/frasco) IL-2 (6000 UI/ml) $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras/frasco

		15 µg de OKT3/frasco
Iniciación de REP	TIL fresco directo a REP Día 11 ≤200e^6 células viables 5 × 10^9 células alimentadoras G-Rex 500MCS 5 L de medio CM2 + IL-2 (3000 UI/ml) 150 µg de OKT3	TIL fresco directo a REP Día 7 Activar todo el cultivo 5 × 10^8 células alimentadoras 30 µg de OKT3/frasco G-Rex 100MCS 500 ml de medio + IL-2 (6000 UI/ml)
Subcultivo o escalado de TIL	≤5 G-REX 500MCS ≤1 × 10 células viables/frasco 5 L/frasco Día 16	≤4 G-REX 500MCS Escalado de todo el cultivo 4 L/frasco Día 10-11
Cosecha	Día de la cosecha 22, Lavadora de células automatizada LOVO 2 ciclos de lavado	Día de cosecha 16 Lavadora de células automatizada LOVO 5 ciclos de lavado
Formulación final	Producto crioconservado IL2 a 300 UI/ml- CS10 en LN_2, alícuotas múltiples	Producto crioconservado IL-2 a 300 UI/ml-CS10 en LN_2, alícuotas múltiples
Tiempo de procesamiento	**22 días**	**16 días**

EJEMPLO 6: UNA MODALIDAD ILUSTRATIVA DE SELECCIÓN Y EXPANSIÓN DE PBL DE PBMCS EN PACIENTES CON CLL.

Las PBMC se recogen de los pacientes y se congelan para su uso posterior o se utilizan frescas. Se recoge suficiente volumen de sangre periférica para producir al menos aproximadamente 400 000 000 (400×10^6) PBMC como material de partida en el método de la presente invención. El día 0 del método, la IL-2 a 6×10^6 UI/ml se prepara fresca o descongelada y se almacena a 4 °C o en hielo hasta que esté lista para su uso. Se preparan 200 ml de medio CM2 mediante la combinación de 100 ml de medio CM1 (que contiene GlutaMAX®), después dilución con 100 ml (1:1) con AIM-V para obtener CM2. El CM2 se protege de la luz y se sella herméticamente cuando no está en uso.

Todas las etapas siguientes se realizan en condiciones de cultivo celular estéril. Se calienta una alícuota de CM2 en un tubo cónico de 50 ml en un baño de agua a 37 °C para descongelar y/o lavar una muestra de PBMC congelada. Si se usa una muestra de PBMC congelada, la muestra se saca del congelador y se mantiene en hielo seco hasta que esté lista para descongelar. Cuando esté listo para descongelar el criovial de PBMC, se colocan 5 ml de medio CM2 en un tubo cónico estéril de 50 ml. El criovial de muestra de PBMC se coloca en un baño de agua a 37 °C hasta que solo queden unos pocos cristales de hielo. Se añade medio CM2 calentado, gota a gota, al vial de muestra en una relación de volumen de muestra:medio de 1:1 (aproximadamente 1 ml). Se extrae todo el contenido del criovial y se transfiere al medio CM2 restante en el tubo cónico de 50 ml. Se utilizan 1-2 ml adicionales de medio CM2 para enjuagar el criovial y todo el contenido del criovial se retira y se transfiere al tubo cónico de 50 ml. A continuación, se ajusta el volumen en el tubo cónico con medio CM2 adicional a 15 ml y se agita suavemente para enjuagar las células. A continuación, el tubo cónico se centrifuga a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente para recoger el sedimento celular.

El sobrenadante se retira del sedimento, el tubo cónico se tapa y después el sedimento celular se rompe, por ejemplo, raspando el tubo a lo largo de una superficie rugosa. Se añade aproximadamente 1 ml de medio CM2 al sedimento celular, y el sedimento y el medio se aspiran hacia arriba y hacia abajo 5-10 veces con una pipeta para romper el sedimento celular. Se añadieron 3-5 ml adicionales de medio CM2 al tubo y se mezclan con una pipeta para suspender las células. En este punto, se registra el volumen de la suspensión celular. Retirar 100 µl de la suspensión celular del tubo para el conteo celular con un contador celular automático, por ejemplo, un medidor de células Nexcelom K2. Determinar el número de células vivas en la muestra y registrar.

Conservar un mínimo de 5 × 10^6 células para fenotipado y otros experimentos de caracterización. Centrifugar las células reservadas a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente para recoger el sedimento celular. Resuspender el sedimento celular en medio de congelación (FBS estéril, inactivado por calor que contiene DMSO al 20 %). Congelar una o dos alícuotas de las células reservadas en medio de congelación y congelar lentamente las alícuotas en un congelador de células (Mr. Frosty™) en un congelador a -80 °C. Transferir al almacenamiento de nitrógeno líquido después de un mínimo de 24 horas a -80 °C.

Para las siguientes etapas, se utilizan soluciones enfriadas previamente, se trabaja rápidamente y se mantienen las células frías. La siguiente etapa es purificar la fracción de células T de la muestra de PBMC. Esto se completa con un kit de aislamiento de células Pan T (Miltenyi, catálogo núm. 130-096-535). Preparar las células para la purificación mediante el lavado de las células con un tampón de lavado filtrado de manera estéril que contiene PBS, BSA al 0,5 % y EDTA 2 mM a pH 7,2. La muestra de PBMC se centrifuga a 400 g durante 5 minutos para recoger el sedimento celular. El sobrenadante se aspira y el sedimento celular se resuspende en 40 uL de tampón de lavado por cada 10^7 células. Agregar 10 µl de cóctel de anticuerpos y biotina para células Pan T por cada 10^7 células. Mezclar bien e incubar durante 5 minutos en el refrigerador o en hielo. Agregar 30 µl de tampón de lavado por cada 10^7 células. Añadir 20 ul de cóctel de microperlas para células Pan T por cada 10^7 células. Mezclar bien e incubar durante 10 minutos en el refrigerador o en hielo. Preparar una columna LS y separar magnéticamente las células de las microperlas. La columna LS se coloca en el campo magnético QuadroMACS. La columna LS se lava con 3 ml de tampón de lavado frío y el lavado se recoge y se desecha. La suspensión de células se aplica a la columna y se recoge el flujo continuo (células sin marcar). Este flujo continuo es la fracción de células T enriquecidas (PBL). Lavar la columna con 3 ml de tampón de lavado y recoger el flujo continuo en el mismo tubo que el flujo continuo inicial. Tape el tubo y colóquelo en hielo. Esta es la fracción de células T o PBL. Retire la columna LS del campo magnético, lave la columna con 5 ml de tampón de lavado y recoja la fracción diferente de células T (células etiquetadas magnéticamente) en otro tubo. Centrifugar ambas fracciones a 400 g durante 5 minutos para recoger los sedimentos celulares. Se aspiran los sobrenadantes de ambas muestras, el sedimento se rompe y las células se resuspenden en 1 ml de medio CM2 suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml a cada sedimento y se pipetean hacia arriba y hacia abajo 5-10 veces para romper los sedimentos. Agregar 1-2 ml de CM2 a cada muestra, mezclar bien cada muestra y guardarla en la incubadora

de cultivo de tejidos para las siguientes etapas. Extraer una alícuota de aproximadamente 50 µl de cada muestra, contar las células y registrar el conteo y la viabilidad.

Las células T (PBL) se cultivan después con Dunabeads™ Human T-Expander CD3/CD28. Un vial de reserva de Dynabeads se agita durante 30 segundos a velocidad media. Se extrae una alícuota de perlas requerida del vial de reserva en un microtubo estéril de 1,5 ml. Las perlas se lavan con una solución de lavado de perlas mediante la adición de 1 ml de lavado de perlas al microtubo de 1,5 ml que contiene las perlas. Mezclar suavemente. Colocar el tubo sobre el imán DynaMag™-2 y dejar reposar durante 30 minutos mientras las perlas se dirigen hacia el imán. Aspirar la solución de lavado de las perlas y retire el tubo del imán. Se añade a las perlas 1 ml de medio CM2 suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml. Todo el contenido del microtubo se transfiere a un tubo cónico de 15 o 50 ml. Llevar las perlas a una concentración final de aproximadamente 500 000/ml mediante el uso de medio CM2 con IL-2.

Las células T (PBL) y las perlas se cultivan juntas de la siguiente manera. El día 0: en una placa G-Rex de 24 pocillos, en un total de 7 ml por pocillo, agregar 500 000 células T, 500 000 Dynabeads CD3/CD28 y CM2 suplementado con IL-2. La placa G-Rex se coloca en una incubadora humidificada a 37 °C con CO_2 al 5 % hasta la siguiente etapa del proceso (el día 4). Las células restantes se congelan en medio de crioconservación CS10 mediante el uso de un congelador de células Mr. Frosty™. La fracción de células que no son células T se congelan en medio de crioconservación CS10 mediante el uso de un congelador de células Mr. Frosty. El día 4, se cambia el medio. Se extrae la mitad del medio (aproximadamente 3,5 ml) de cada pocillo de la placa G-rex. Se añade un volumen suficiente (aproximadamente 3,5 ml) de medio CM4 suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml calentado a 37 °C para reemplazar el medio eliminado de cada pocillo de muestra. La placa G-rex se devuelve a la incubadora.

El día 7, las células se preparan para la expansión mediante REP. La placa G-rex se retira de la incubadora y la mitad del medio se retira de cada pocillo y se desecha. Las células se resuspenden en el medio restante y se transfieren a un tubo cónico de 15 ml. Los pocillos se lavan con 1 ml cada uno de CM4 suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml calentado a 37 °C y el medio de lavado se transfiere al mismo tubo de 15 ml con las células. Se extrae una muestra representativa de células y se cuenta mediante el uso de un contador de células automatizado. Si hay menos de 1×10^6 células vivas, se repite el proceso de expansión con Dynabead en el día 0. El resto de las células se congelan

para la expansión de respaldo o para fenotipado y otros estudios de caracterización. Si hay 1×10^6 células vivas o más, la expansión de REP se configura en réplica de acuerdo con el protocolo del Día 0. Alternativamente, con suficientes células, la expansión puede configurarse en un frasco de cultivo G-rex 10M mediante el uso de $10\text{-}15 \times 10^6$ PBL por frasco y una proporción 1:1 de Dynabeads:PBL en un volumen final de 100 ml/pocillo de medio CM4 suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml. La placa y/o el frasco se devuelven a la incubadora. El exceso de PBL puede dividirse en alícuotas y congelar lentamente en un congelador de células Mr. Frosty™ en un congelador a -80 °C, y después transferirlo a un almacenamiento de nitrógeno líquido después de un mínimo de 24 horas a -80 °C. Estas PBL pueden utilizarse como muestras de respaldo para la expansión o para fenotipado u otros estudios de caracterización.

El día 11, se cambia el medio. La mitad del medio se retira de cada pocillo de la placa G-rex o del frasco y se reemplaza con la misma cantidad de medio CM4 fresco suplementado con IL-2 a 3000 UI/ml a 37 °C.

El día 14, se cosechan las PBL. Si se usa la placa G-rex, aproximadamente la mitad del medio se retira de cada pocillo de la placa y se desecha. Las PBL y las perlas se suspenden en el medio restante y se transfieren a un tubo cónico estéril de 15 ml (Tubo 1). Los pocillos se lavan con 1-2 ml de medio AIM-V fresco calentado a 37 °C y el lavado se transfiere al tubo 1. El tubo 1 se tapa y se coloca en el imán DynaMag™-15 durante 1 minuto para permitir que las perlas sean atraídas hacia el imán. La suspensión celular se transfiere a un nuevo tubo de 15 ml (Tubo 2) y las perlas se lavan con 2 ml de AIM-V fresco a 37 °C. El tubo 1 se vuelve a colocar en el imán durante 1 minuto más y después se transfiere el medio de lavado al tubo 2. Los pocillos pueden combinarse si se desea, después de la última etapa de lavado. Extraer una muestra representativa de células y contar, registrar el conteo y la viabilidad. Los tubos pueden colocarse en la incubadora mientras se cuenta. Puede añadirse medio AIM-V adicional al Tubo 2 si las células parecen muy densas. Si se utiliza un frasco, el volumen del frasco debe reducirse a aproximadamente 10 ml. El contenido del frasco se mezcla y se transfiere a un tubo cónico de 15 ml (Tubo A). El frasco se lava con 2 ml del medio AIM-V como se describe anteriormente y el medio de lavado también se transfiere al tubo A. El tubo A se tapa y se coloca en el imán DynaMag™-15 durante 1 minuto para permitir que las perlas sean atraídas al imán. La suspensión celular se transfiere a un nuevo tubo de 15 ml (Tubo B) y las perlas se lavan con 2 ml de AIM-V fresco a 37 °C. El tubo A se vuelve a colocar en el imán durante 1 minuto más y el medio de lavado se transfiere al tubo B. Los pocillos

pueden combinarse si se desea, después de la etapa de lavado final. Extraer una muestra representativa de células y contar, registrar el conteo y la viabilidad. Los tubos pueden colocarse en la incubadora mientras se cuenta. Puede añadirse medio AIM-V adicional al tubo B si las células parecen muy densas. Las células pueden usarse frescas o congeladas en medio de conservación CS10 a las concentraciones deseadas.

EJEMPLO 7: UNA MODALIDAD ILUSTRATIVA DE EXPANSIÓN DE CÉLULAS T DE NEOPLASIAS HEMATOPOYÉTICAS CON EL USO DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN DE GEN 3.

En el día 0, se aísla una fracción de linfocitos T (CD3+, CD45+) de un producto de aféresis enriquecido con linfocitos, sangre completa o digestión tumoral (fresca o descongelada) mediante el uso de métodos de selección positiva o negativa, es decir, eliminación de los linfocitos T mediante el uso de un marcador de linfocitos T (CD2, CD3, etc., o eliminación de otras células que abandonan las células T), o centrifugación en gradiente.

El proceso de Gen 3.1 se inició mediante la siembra de ~ 1 x 10^7 células/frasco de acuerdo con el proceso de Gen3 descrito en la presente descripción.

En el día 7, las células se reactivan según el proceso de Gen 3.1.

En el día 9-11, las células se someten a escalado según el proceso de Gen 3.1.

En el día 14-16, las células se cosechan según el proceso de Gen 3.1.

La Figura 42 proporciona un diagrama esquemático de una modalidad ilustrativa para expandir TIL a partir de neoplasias hematopoyéticas mediante el uso del proceso de Gen 3.

EJEMPLO 8: UNA MODALIDAD ILUSTRATIVA DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN DE GEN 3 EN EL DÍA 0

Se prepararon los medios de lavado de tumores. Se calentaron los medios antes de comenzar. Se añadieron 5 ml de gentamicina (50 mg/ml) al frasco de 500 ml de HBSS. Se añadieron 5 ml de medio de lavado de tumores a un cono de 15 ml que se usó para la dilución de OKT3. Se almacenaron a temperatura ambiente (RT)

Se prepararon bolsas de células alimentadoras. Se transfirieron de manera estéril las células alimentadoras a bolsas de células alimentadoras y se almacenaron a 37 °C hasta

su uso o congelación. Se contaron las células alimentadoras si están a 37 °C. Se descongelaron y después se contaron las células alimentadoras si se congelaron.

El intervalo óptimo para la concentración de células alimentadoras está entre 5 x 10^4 y 5 x 10^6 células/ml. Se prepararon cuatro tubos cónicos con 4,5 ml de AIM-V. Se añadió 0,5 ml de fracción celular para cada conteo celular.

Si el número total de células alimentadoras viables era ≥ 1 x 10^9 células, se procedió al siguiente paso para ajustar la concentración de células alimentadoras. Se calculó el volumen de células alimentadoras a retirar de la primera bolsa de células alimentadoras para agregar 1 x 10^9 células a una segunda bolsa de células alimentadoras.

Con el uso de la micropipeta p1000, se transfirieron 900 µl de medio de lavado de tumores a la alícuota de OKT3 (100 µl). Con el uso de una jeringa y una técnica estéril, se extrajeron 0,6 ml de OKT3 y se añadió a la segunda bolsa de células alimentadoras. Se ajustó el volumen del medio a un volumen total de 2 L. Se transfirió la segunda bolsa de células alimentadoras a la incubadora.

Detalles de la formulación de OKT3: OKT3 puede dividirse en alícuotas y congelar en la concentración de reserva original del vial (1 mg/ml) en alícuotas de 100 ul. Alícuotas de ~ 10X por vial de 1 ml. Se almacenaron a -80 C. Día 0: 15 ug/frasco, es decir, 30 ng/ml en 1 alícuota de 500 ml - 60 ul máximo.

Se prepararon las muestras tumorales. Se obtuvo una placa de 6 pocillos y placas Petri de 100 mm (4 en total). Se etiquetó la placa de 6 pocillos como "Exceso de piezas tumorales". Se etiquetó una de cada una de las cuatro placas Petri de 100 mm como “Lavado_01”, “Lavado_02”, “Lavado_03”, “Lavado_04” y “Mantenimiento”.

Se añadieron 5 ml de medio de lavado de tumores en todos los pocillos de la placa de 6 pocillos etiquetada con Exceso de piezas tumorales. Se mantuvo disponible el medio de lavado de tumores para su uso posterior a fin de mantener el tumor hidratado durante la disección.

Se añadieron 50 ml de medio de lavado de tumores a cada placa Petri de 100 mm etiquetada como Lavado_01, Lavado_02, Lavado_03 y Mantenimiento (Lavado_04). Con un marcador, se marcó cada placa Petri como Disección 1 a Disección 4. Se incubó el tumor a temperatura ambiente en Lavado_01 durante ≥ 3 min. Se incubó el tumor a temperatura ambiente en Lavado_02 durante ≥ 3 min. Se incubó el tumor a temperatura ambiente en Lavado_03 durante ≥ 3 min. El Lavado_04 fue para mantener el tumor

después de que se completaron tres lavados. Una vez que se completaron los lavados, se trasladó el tumor a la placa de “mantenimiento” para garantizar que el tejido permanezca hidratado.

Mientras se realizaban las incubaciones de tumores, se transfirieron 10 ml de medio de transporte de tumores a un tubo etiquetado como Medio de transporte de tumores. Se extrajeron 10 ml del medio de transporte de tumores en una jeringa y se inoculó uno de cada frasco de esterilidad anaeróbica y aeróbica con 5 ml de medio de transporte de tumores.

Se colocó una regla debajo de la tapa de la placa Petri durante todo el proceso de disección. Se midió y registró la longitud del tumor y el número de fragmentos. Se cortó el tumor en cuatro piezas intermedias o agrupar en cuatro grupos de volumen equivalente y conservar la estructura tumoral de cada pieza intermedia. Las piezas tumorales se mantuvieron hidratadas.

Se transfirieron las piezas tumorales intermedias que no se cortaron activamente al plato de mantenimiento para mantener el tejido hidratado.

Se cortó el tumor en fragmentos de 27 mm^3 (3x3x3 mm), con el uso de la regla debajo de la tapa de la placa de disección como referencia. El fragmento intermedio se cortó hasta alcanzar 60 fragmentos. Se contó el número total de fragmentos finales y se prepararon frascos G-Rex 100MCS de acuerdo con el número de fragmentos finales generados (generalmente 60 fragmentos por frasco).

Los fragmentos de tejido favorables se mantuvieron en los tubos cónicos etiquetados como Tubo 1 con Fragmentos a Tubo 4 con Fragmentos. Se calculó el número de frascos G-Rex 100MCS a sembrar con suspensión de células alimentadoras de acuerdo con el número de tubos de fragmentos originados.

Se retiró la bolsa de células alimentadoras de la incubadora y se sembró el G-Rex 100MCS. Etiqueta como D0 (día 0).

CULTIVO DE LA ADICIÓN DE FRAGMENTOS TUMORALES EN G-REX100MCS

En condiciones estériles, se desenroscó la tapa de G-Rex 100MCS etiquetado como Cultivo de fragmentos tumorales (D0) 1 y el tubo cónico de 50 ml etiquetado como Tubo de fragmentos. Se giró el tubo de fragmentos 1 abierto y, al mismo tiempo, se levantó ligeramente la tapa del G-Rex100MCS. Se añadió el medio con los fragmentos al G-

Rex100MCS mientras se giraba. Se registró el número de fragmentos transferidos al G-Rex100MCS.

Una vez que los fragmentos se ubicaron en el fondo del frasco GREX, se extrajeron 7 ml de medio y se crearon siete alícuotas de 1 ml: 5 ml para la caracterización adicional y 2 ml para muestras de esterilidad. Las 5 alícuotas (sobrenadante de cultivo de fragmentos final) se almacenaron a -20 °C hasta que se necesitó para una caracterización adicional.

Se inoculó un frasco de BacT/Alerta anaeróbica y un frasco de BacT/Alerta aeróbica cada uno con 1 ml de sobrenadante de cultivo de fragmentos final. Se repitió para cada frasco muestreado.

EJEMPLO 9: UNA MODALIDAD ILUSTRATIVA DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN DE GEN 3 EN LOS DÍAS 7-8

Se prepararon bolsas de células alimentadoras. Las bolsas de células alimentadoras se descongelaron durante 3-5 minutos en un baño de agua a 37 °C en caso de estar congeladas. Las células alimentadoras se contaron si estaban congeladas.

El intervalo óptimo para la concentración de células alimentadoras está entre 5×10^4 y 5×10^6 células/ml. Se prepararon cuatro tubos cónicos con 4,5 ml de AIM-V. Se añadieron 0,5 ml de fracción celular para cada conteo celular en un nuevo tubo criovial. Se mezclaron bien las muestras y se procedió con el conteo de células.

Si el número total de células alimentadoras viables era $\geq 2 \times 10^9$ células, se procedió a la siguiente etapa para ajustar la concentración de células alimentadoras. Se calculó el volumen de células alimentadoras para retirar de la primera bolsa de células alimentadoras para agregar 2×10^9 células a la segunda bolsa de células alimentadoras.

Con la micropipeta p1000, se transfirieron 900 µl de HBSS a una alícuota de 100 µl de OKT3. Se mezcló por pipeteo hacia arriba y hacia abajo 3 veces. Se prepararon dos alícuotas.

Detalles de la formulación de OKT3: OKT3 puede dividirse en alícuotas y congelar en la concentración de reserva original del vial (1 mg/ml) en alícuotas de 100 ul. Alícuotas de ~ 10X por vial de 1 ml. Se almacenaron a -80 C. Día 7/8: 30 ug/frasco, es decir, 60 ng/ml en 500 ml - 120 ul máx. ~ 2 alícuotas.

Con el uso de una jeringa y una técnica estéril, se extrajeron 0,6 ml de OKT3 y se añadió a la bolsa de las células alimentadoras, asegurándose de que todo se añadiera. Se ajustó el volumen del medio a un volumen total de 2 L. Se repitió con la segunda alícuota de OKT3 y se añadió a la bolsa de células alimentadoras. Se transfirió la segunda bolsa de células alimentadoras a la incubadora.

PREPARACIÓN DEL FRASCO G-REX100MCS CON SUSPENSIÓN DE CÉLULAS ALIMENTADORAS

Se registró el número de frascos G-Rex 100MCS a procesar de acuerdo con el número de frascos G-Rex generados el día 0. Se retiró el frasco G-Rex de la incubadora y se sacó la segunda bolsa de células alimentadoras de la incubadora.

Eliminación del sobrenadante antes de la adición de la suspensión de células alimentadoras:

Se conectó una jeringa de 10 ml al frasco G-Rex100 y se extrajeron 5 ml de medio. Se crearon cinco alícuotas de 1 ml - 5 ml para una caracterización adicional y se almacenaron las 5 alícuotas (sobrenadante del cultivo de fragmentos final) para una caracterización adicional a -20 °C hasta que lo solicite el patrocinador. Se etiquetó y repitió para cada frasco G-Rex100.

5-20 muestras de 1 ml para caracterización, según el número de frascos:

- 5 ml = 1 frasco
- 10 ml = 2 frascos
- 15 ml = 3 frascos
- 20 ml = 4 frascos

Se continuó la siembra de células alimentadoras en el G-Rex100 MCS y se repitió para cada frasco G-Rex100 MCS. Con el uso de métodos de transferencia estériles, se transfirió por gravedad 500 ml de la segunda bolsa de células alimentadoras por peso (se supone 1 g = 1 ml) a cada frasco G-Rex 100MCS y se registró la cantidad. Se etiquetó como cultivo del día 7 y se repitió para cada frasco G-Rex100. Se transfirieron los frascos G-Rex 100MCS a la incubadora.

EJEMPLO 10: UNA MODALIDAD ILUSTRATIVA DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN DE GEN 3 EN LOS DÍAS 10-11

Se retiró el primer frasco G-Rex 100MCS y con el uso de condiciones estériles se retiraron 7 ml de sobrenadante de cultivo previo al proceso con una jeringa de 10 ml. Se crearon siete alícuotas de 1 ml: 5 ml para una caracterización adicional y 2 ml para muestras de esterilidad.

Se mezcló el frasco con cuidado y con una jeringa nueva de 10 ml se retiraron 10 ml de sobrenadante y se transfirieron a un tubo de 15 ml etiquetado como Sobrenadante de micoplasmas D10/11.

El frasco se mezcló con cuidado agitándolo suavemente para poner las células en suspensión. Con una jeringa nueva, se extrajo el volumen a continuación de acuerdo con el número de frascos a procesar y se añadió a un tubo cónico de 50 ml. Las muestras extraídas de cada frasco se mantuvieron separadas y no agrupadas.

- 1 frasco = 40 ml
- 2 frascos = 20 ml/frasco
- 3 frascos = 13,3 ml/frasco
- 4 frascos = 10 ml/frasco

Cada tubo cónico se etiquetó Muestra de QC del Día 10/11 Frasco #. Se almacenó en la incubadora hasta que se necesitó en la sección 14. Se repitió para cada frasco.

Debe extraerse un total de 40 ml de todos los frascos y combinarse en un tubo cónico de 50 ml etiquetado como "Muestra de QC del día 10/11" y almacenarse en la incubadora hasta que se necesite. Se realizó un conteo de células y se asignaron las células.

Se almacenaron las 5 alícuotas (sobrenadante de cultivo previo al proceso) para una caracterización adicional a ≤-20 °C hasta que se necesitó. Se inoculó un frasco de BacT/Alerta anaeróbica y un frasco de BacT/Alerta aeróbica cada una con 1 ml de sobrenadante de cultivo previo al proceso.

Se continuó con la transferencia de la suspensión celular al G-Rex 500MCS y se repitió para cada G-Rex 100MCS. Con el uso de condiciones estériles, se transfirió el contenido de cada G-Rex 100MCS a un G-Rex 500MCS, controlando aproximadamente 100 ml de transferencia de líquido a la vez. La transferencia se detuvo cuando el volumen del G-Rex 100MCS se redujo a 500 ml (o en algunos casos a unos 100 ml).

Durante la etapa de transferencia, se usó una jeringa de 10 ml y se extrajeron 10 ml de suspensión celular en la jeringa del G-Rex 100MCS. Se siguieron las instrucciones de acuerdo con el número de frascos en cultivo. Si solo es 1 frasco: se extrajeron 20 ml en total con dos jeringas. Si son 2 frascos: se extrajeron 10 ml por frasco. Si son 3 frascos: se extrajeron 7 ml por frasco. Si son 4 frascos: se extrajeron 5 ml por frasco. Se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico común de 50 ml. Mantener en la incubadora hasta la etapa del conteo de células y la muestra de QC. El número total de células necesarias para QC fue de ~ 20e6 células: conteo de 4 x 0,5 ml de células (los conteos de células no se diluyeron primero).

Células necesarias para los ensayos:

- Mínimo de 10e6 células para el ensayo de IFN-G
- 1e6 células para micoplasma
- 5e6 células flujo CD3+/CD45+

Los frascos G-Rex 500MCS se transfirieron a la incubadora.

Preparación de las muestras de control de calidad

Se necesitaron al menos 15 x 10^8. Los ensayos incluyeron: conteo y viabilidad celular; micoplasmas (1 x 10^6 células/concentración viable promedio); citometría de flujo y fenotipado (5 x 10^6 células/concentración viable promedio); y ensayo de IFN-g (**5 x 10^6 células - 1 x 10^6 células**; se requieren 8-10 x 10^6 células para el ensayo de IFN-γ.

Se calculó el volumen de la fracción de células para crioconservación en 10 x 10^6 células/ml y se calculó el número de viales a preparar.

EJEMPLO 11: UNA MODALIDAD ILUSTRATIVA DE LA PLATAFORMA DE EXPANSIÓN DE GEN 3 DÍAS 16-17

Preparación del tampón de lavado (HAS al 1 % PLASMALYTE A)

Se transfirieron HSA y PLasmalyte a una bolsa de 5 L para preparar el tampón de lavado LOVO. Con el uso de condiciones estériles, se transfirió un volumen total de 125 ml de HSA al 25 % a la bolsa de 5 L. Se almacenó a temperatura ambiente.

Se retiraron y transfirieron 10 ml o 40 ml de tampón de lavado en el tubo “IL-2 6 x 10^4 UI/ml” (10 ml si se preparó IL-2 por adelantado o 40 ml si la IL-2 se preparó recientemente). Cuando la IL-2 se preparó recientemente: se mezcló la bolsa de tampón

de lavado LOVO y mediante el uso de una jeringa de tamaño apropiado, se retiraron y transfirieron 40 ml de tampón de lavado en el tubo “IL-2 6 x 10^4 UI/ml”. Cuando la IL-2 se preparó por adelantado la IL-2 era una alícuota de 6 x 10^4 UI/ml.

Se calculó el volumen de IL-2 reconstituida para agregar a Plasmalyte + HSA al 1 %: volumen de IL-2 reconstituida = (concentración final de IL-2 x volumen final)/actividad específica de la IL-2 (basada en el ensayo estándar y el protocolo de fabricación). La concentración final de IL-2 fue de 6 x 10^4 UI/ml. El volumen final fue de 40 ml.

Se eliminó el volumen inicial calculado de IL-2 necesaria de la IL-2 reconstituida y se transfirió al tubo “IL-2 6 x 10^4 UI/ml”. Se añadieron 100 µl de IL-2 6 x 10^6 UI/ml de la alícuota preparada por adelantado al tubo etiquetado como “IL-2 6 x 10^4 UI/ml” que contenía 10 ml de tampón de lavado LOVO.

Se eliminaron aproximadamente 4500 ml de sobrenadante de los frascos G-Rex 500MCS. El sobrenadante restante se giró y las células se transfirieron a la bolsa del grupo de recolección de células. Se repitió con todos los frascos G-Rex 500MCS.

Se retiraron 60 ml de sobrenadante y se agregaron a los tubos de sobrenadante para los ensayos de control de calidad, que incluye la detección de micoplasmas. Se almacenó a +2-8 °C.

Recolección de células

Conteo de células. Preparar cuatro tubos cónicos de 15 ml con 4,5 ml de AIM-V. Estos pueden prepararse por adelantado. Intervalo óptimo = está entre 5 x 10^4 y 5 x 10^6 células/ml. (Se recomendó una dilución 1:10). Para una dilución 1:10, a 4500 µl de AIM V preparado previamente, agregar 500 µl de CF. Se registró el factor de dilución.

Se calculó el TC (Total de células) pre-LOVO (vivas + muertas) =

Total de células promedio

Concentración (conc TC pre LOVO)

(vivas + muertas)

X

Volumen de la bolsa de fuente

Se calculó el TVC (Total de células viables) pre-LOVO (vivas) =

Total de células viables promedio

Concentración (TVC pre LOVO)

(vivas)

X

Volumen de la bolsa de fuente LOVO

Cuando el número total de células (TC) fue > 5 x 10^9, se retiraron 5 x 10^8 células para crioconservarlas como muestras de retención de MDA. 5 x 10^8 ÷ concentración promedio de TC (etapa 14.44) = volumen a eliminar

Cuando el número total de células (TC) fue ≤ 5 x 10^9, se retiraron 4 x 10^6 células para crioconservarlas como muestras de retención de MDA. 4 x 10^6 ÷ concentración promedio de TC = volumen a eliminar.

Se utilizó una jeringa de tamaño adecuado para eliminar el volumen requerido de la bolsa de fuente LOVO. Se retuvo en la incubadora hasta las etapas de crioconservación.

Cuando se determinó el número total de células, el número de células a eliminar debería permitir la retención de 150 x 10^9 células viables. Confirmar TVC pre-LOVO 5 x 10^8 o 4 x 10^6 o no aplicable. Se calculó el volumen de células a eliminar.

Se calculó el total de células restantes que quedan en la bolsa. Se calculó el TC (Total de células) pre-LOVO. [Concentración promedio de células totales X Volumen restante = TC pre-LOVO restante]

De acuerdo con el número total de células restantes, se seleccionó el proceso correspondiente en la siguiente tabla:

Total de células:	***Retenido* (*ml)***
0 < Total de células ≤ 31 x 10^9	**115**
31 x 10^9 < Total de células ≤ 71 x 10^9	**165**
71 x 10^9 <Total de células ≤ 110 x 10^9	**215**
110 x 10^9 <Total de células ≤ 115 x 10^9	**265**

Elegir el volumen de IL-2 a agregar correspondiente al proceso utilizado. El volumen se calculó como: Volumen retenido x 2 x 300 UI/ml = UI de IL-2 requerida. UI de IL-2 requerida/6 x 10^4 UI/ml = Volumen de IL-2 a agregar la bolsa Post LOVO. Se registraron todos los volúmenes añadidos. Las muestras se obtuvieron en viales de crioconservación para análisis posteriores.

Se mezcló bien el producto celular. Se sellaron todas las bolsas para su posterior procesamiento, que incluye para crioconservación cuando corresponda.

Se realizaron los ensayos de Enodxoton, IFN-γ, esterilidad y otros según fue necesario en muestras que se obtienen de viales de criopreservación.

EJEMPLO 12: PROCESO DE GEN 3 ILUSTRATIVO (TAMBIÉN REFERIDO COMO GEN 3.1)

PROPÓSITO

Este ejemplo describe estudios adicionales sobre la "Comparación entre los procesos de Gen 2 y Gen 3 para la expansión de TIL". El proceso de Gen 3 se modificó para incluir una etapa de activación temprana en el proceso con el objetivo de aumentar la producción final de células viables totales (TVC) para que sea comparable (o mejor) que la de Gen 2, manteniendo los perfiles fenotípicos y funcionales como se observó anteriormente.

ALCANCE

Se evaluó la producción de TVC mediante la introducción de una etapa de activación a los fragmentos tumorales cultivados en el día 0.

Comparabilidad demostrada en términos de caracterización fenotípica funcional y extendida con el estándar Gen 3, así como un brazo de control, en dos tumores de pacientes independientes.

El consumo de medios analizados y la producción de metabolitos para confirmar los parámetros de procesamiento se mantuvieron en condiciones fisiológicas.

Todos los experimentos para este ejemplo se realizaron en la plataforma a escala completa mediante el uso de tejido tumoral de donante comercial como material de partida.

INFORMACIÓN

La modalidad del Proceso de Gen 3 se modificó como una modalidad adicional y en este ejemplo se hace referencia a ella como Gen 3.1.

El concepto de producción de TIL por Gen 3.1 tiene cuatro intervenciones del operario:

1. Aislamiento y activación de fragmentos tumorales: El día 0 del proceso, el tumor se extirpó y se generaron los fragmentos finales de impresión ~ 3 x 3 mm cada uno (hasta 240 fragmentos en total) y se cultivaron en 1-4 frascos G-Rex100MCS. Cada frasco contenía hasta 60 fragmentos, 500 ml de medio CM1 o DM1, y se suplementaron con 6000 UI de rhIL-2, 15 µg de OKT3, y 2,5 x 10^8 células mononucleares alogénicas irradiadas. El cultivo se incubó a 37 °C durante 6-8 días.

2. Reactivación del cultivo de TIL: En el Día 7-8 el cultivo se complementó a través de la adición lenta de medios CM2 o DM1 suplementado con 6000 UI de rhIL-2, 30 µg de OKT3, y 5 x 10^8 células mononucleares alogénicas irradiadas en ambos casos. Se tuvo cuidado de no perturbar las células existentes en el fondo del frasco. El cultivo se incubó a 37 °C durante 3-4 días.

3. Escalado del cultivo: ocurre en los días 10-11. Durante el escalado del cultivo, todo el contenido del G-Rex100MCS se transfirió a un frasco G-Rex500MCS que contenía 4 L de CM4 o DM2 suplementado con 3000 UI/ml de IL-2 en ambos casos. Los frascos se incubaron a 37 °C durante 5-6 días hasta la cosecha.

4. Cosecha/Lavado/Formulación: El día 16-17 se reduce el volumen de los frascos y se agrupan. Las células se concentraron y lavaron con PlasmaLyte A pH 7,4 que contenía HSA al 1 %. La suspensión celular lavada se formuló en una proporción de 1:1 con CryoStor10 y se complementó con rhIL-2 hasta una concentración final de 300 UI/ml.

El DP se crioconservó con una velocidad de congelación controlada y se almacenó en nitrógeno líquido en fase de vapor. * Los medios de TIL estándar completos 1, 2 o 4 (CM1, CM2, CM4) pueden sustituirse por el medio de expansión libre de suero para células T CTS™ OpTmizer™, denominado medio definido (DM1 o DM2), como se indicó anteriormente. Para obtener una descripción general del proceso, consulte, por ejemplo, las Figuras 70 y 71.

Descripción del proceso

El día 0, el tumor se lavó 3 veces y después se fragmentó en fragmentos finales de 3 x 3 x 3. Una vez que se fragmentó todo el tumor, los fragmentos finales se aleatorizaron por igual y se dividieron en tres grupos. Se introdujo un grupo de fragmentos al azar en

cada brazo, mediante la adición del mismo número de fragmentos por las tres matrices experimentales.

La expansión del tumor L4063 se realizó con medio estándar y la expansión del tumor L4064 se realizó con medio definido (CTS OpTmizer) para todo el proceso de expansión de TIL. Los componentes de los medios se describen en la presente descripción.

CM1 medio completo 1: RPMI + glutamina suplementado con Glutamax 2 mM, suero AB humano al 10 %, gentamicina (50 ug/ml), 2-mercaptoetanol (55 uM). Formulación de medio final complementada con 6000 UI/ml de IL-2

CM2 Medio completo 2: 50 % de medio CM1 + 50 % de medio AIM-V. Formulación de medio final complementada con 6000 UI/ml de IL-2

CM4 Medio completo 4: AIM-V suplementado con Glutamax (2 mM). Formulación de medio final complementada con IL-2 a 3000 UI/ml

Medio basal de expansión de células T CTS OpTmizer CTS™ OpTmizer™ suplementado con suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/L).

DM1: medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ suplementado con suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/L) y SR de células inmunitarias CTS™ (3 %), con Glutamax (2 mM). Formulación final complementada con 6000 UI/ml de IL-2.

DM2: medio basal de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ suplementado con suplemento de expansión de células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/L) y SR de células inmunitarias CTS™ (3 %), con Glutamax (2 mM). Formulación final complementada con 3000 UI/ml de IL-2.

Todos los tipos de medios utilizados, es decir, medios completos (CM) y definidos (DM), se prepararon por adelantado, se mantuvieron a 4 °C hasta el día anterior a su uso y se calentaron a 37 °C en una incubadora hasta 24 horas por adelantado antes del día del proceso.

La reactivación del cultivo de TIL se produjo el día 7 para ambos tumores. El escalado se produjo el día 10 para L4063 y el día 11 para L4064. Ambos cultivos se cosecharon y crioconservaron el día 16.

Resultados previstos

Gen 3.1 puede alcanzar un número de células viables totales más alto en la cosecha en el día 16-17 en comparación con Gen 3.0.

Gen 3.1 puede producir niveles similares de IFNɣ después de la reestimulación, en relación con Gen 3.0.

Gen 3.1 y Gen 3.0 pueden tener una diversidad clonal similar, medida por las secuencias de CDR3 únicas totales presentes en el producto de TIL final.

Las características fenotípicas en el proceso de Gen 3.1 pueden ser similares a las de Gen 3.0.

RESULTADOS ALCANZADOS

Se determinó el conteo de células y el % de viabilidad para los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1. La expansión en todas las condiciones siguió los detalles descritos en este ejemplo.

Conteo de células viables totales y expansión en veces

Para cada tumor, los fragmentos se dividieron en tres grupos de igual número. Debido al pequeño tamaño de los tumores, no se alcanzó el número máximo de fragmentos por frasco. Para los tres procesos diferentes, las células viables totales y la viabilidad celular se evaluaron para cada condición. Los conteos de células se determinaron como TVC el día 7 para la reactivación, TVC el día 10 (L4064) o el día 11 (L4063) para el escalado y TVC en la cosecha el día 16/17.

Los conteos de células para el día 7 y el día 10/11 se tomaron FIO. La expansión en veces se calculó dividiendo las TVC del día de cosecha 16/17 por las TVC del día 7 de reactivación. Para comparar los tres brazos, las TVC el día de la cosecha se dividió por el número de fragmentos añadidos en el cultivo el día 0 para calcular un promedio de células viables por fragmento.

Se realizaron conteos celulares y ensayos de viabilidad para L4063 y L4064. Como se indica en la Figura 73, el proceso de prueba de Gen 3.1 produjo más células por fragmento que el proceso de Gen 3.0 en ambos tumores.

Figura 74: Conteo de células viables totales y expansión en veces % de viabilidad durante el proceso

En la reactivación, el escalado y la cosecha, el porcentaje de viabilidad se realizó en todas las condiciones. El día 16/17 de la cosecha, las TVC finales se compararon con

los criterios de liberación para el % de viabilidad. Todas las condiciones evaluadas superaron el criterio de viabilidad del 70 % y fueron comparables entre procesos y tumores, como se muestra en la Figura 74.

Inmunofenotipado

Caracterización fenotípica del producto final de TIL.

Los productos finales se sometieron a análisis de citometría de flujo para analizar la pureza, diferenciación y los marcadores de memoria. Los por cientos de las poblaciones fueron consistentes para las células TCRα/β, CD4+ y CD8+ para todas las condiciones.

Se realizó un análisis fenotípico extendido de TIL REP. El producto de TIL mostró un mayor porcentaje de células CD4+ para las condiciones de Gen 3.1 en comparación con Gen 3.0 en ambos tumores, y un mayor porcentaje de células CD28+ de la población CD8+ para Gen 3.0 en comparación con las condiciones de Gen 3.1 en ambas condiciones.

Los TIL cosechados de los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 mostró marcadores fenotípicos comparables como la expresión de CD27 y CD56 en células CD4+ y CD8+, y una expresión de CD28 comparable en la población de células en el portal de salida de CD4+. La Figura 75 muestra los marcadores fenotípicos del producto de TIL final para los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1. Figura 75: Caracterización fenotípica del producto de TIL final para L4063 y L4064.

Comparación de marcadores de memoria en el producto final de TIL:

La Figura 76 muestra los marcadores de memoria del producto final de TIL que se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Las muestras congeladas de TIL cosechados el día 16 se tiñeron para su análisis. El estado de memoria de TIL fue comparable entre los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1. Figura 76: Análisis de marcadores de memoria del producto de TIL para L4063 y L4064.

Comparación de marcadores de activación y agotamiento en el producto final de TIL:

Las Figuras 77 y 78 muestran la activación y el agotamiento del producto final de TIL que se determinaron mediante citometría de flujo multicolor. Los marcadores de activación y agotamiento fueron comparables entre los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 en el portal de salida de células CD4+ (Figura 77) y CD8+ (Figura 78). Figura 77: Marcadores de activación y agotamiento en el portal de salida de células CD4+ para

L4063 y L4064. Tabla 78: Marcadores de activación y agotamiento en el portal de salida de células CD8+ para L4063 y L4064.

Secreción de interferón gamma tras la reestimulación:

Los TIL cosechados se sometieron a una reestimulación durante la noche con placas anti-CD3 recubiertas para L4063 y L4064. Se observó una mayor producción de IFNγ del proceso de Gen 3.1 en los dos tumores analizados en comparación con el proceso de Gen 3.0. La producción de IFNγ en cada condición se muestra en la Figura 79. Figura 79: Producción de IFN-γ (pg/ml) para el producto final en los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1.

Medición de los niveles de IL-2 en los medios de cultivo

Para comparar los niveles de consumo de IL-2 entre todas las condiciones y procesos, se recolectaron los sobrenadantes celulares al inicio de la reactivación el día 7, en el escalado el día 10 (L4064)/11 (L4063) y en la cosecha el día 16/17, y se congelaron. Los sobrenadantes se descongelaron posteriormente y después se analizaron. La cantidad de IL-2 en el sobrenadante del cultivo celular se midió mediante el protocolo del fabricante. Los datos se muestran en la Figura 80.

Los procesos generales de Gen 3 y Gen 3.1 fueron comparables en términos de consumo de IL-2 durante el proceso completo evaluado en las mismas condiciones de los medios. Figura 80: Análisis de la concentración de IL-2 (pg/ml) en los medios metabolizados recolectados para L4063 y L4064.

Análisis de metabolitos

Los sobrenadantes de los medios metabolizados se recogieron de L4063 y L4064 en el inicio de la reactivación el día 7, el escalado el día 10 (L4064) o el día 11 (L4063) y en la cosecha los días 16/17 para L4063 y L4064, para cada condición. Los sobrenadantes se analizaron en un bioanalizador CEDEX para determinar las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina, glutamax y amoniaco. La Figura 81 muestra la concentración de glucosa en los medios metabolizados recolectados para los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 para los tumores L4063 y L4064.

El medio definido tiene una concentración de glucosa más alta de 4,5 g/L en comparación con el medio completo (2 g/L). En general, la concentración y el consumo de glucosa fueron comparables para los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 dentro de cada

tipo de medio. Figura 81: Concentración de glucosa (g/L) en los medios metabolizados para L4063 y L4064.

Se observó un aumento en el lactato para ambos tumores, L4063 y L4064, para todas las condiciones de prueba. El aumento de lactato fue comparable entre las condiciones de Gen 3.0 y Gen 3.1 y entre los dos medios utilizados para la expansión de reactivación (medio completo para L4063 y medio definido para L4064).

La Figura 82 muestra la concentración de lactato en los medios metabolizados recolectados para las condiciones de los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 para ambos tumores L4063 y L4064. Figura 82: Concentración de lactato (g/L) en medios metabolizados de L4063 y L4064.

En el caso de L4063, el medio basal estándar contenía L-glutamina 2 mM y se suplementó con glutamax 2 mM para compensar la degradación natural de L-glutamina en condiciones de cultivo a L-glutamato y amoniaco.

Para el tumor L4064, el medio definido (libre de suero) utilizado no contenía L-glutamina en el medio basal y se suplementó solo con glutamax hasta una concentración final de 2 mM. Glutamax es un dipéptido de L-alanina y L-glutamina, es más estable que la L-glutamina en soluciones acuosas y no se degrada espontáneamente en glutamato y amoniaco. En cambio, el dipéptido se disocia gradualmente en los aminoácidos individuales, manteniendo así una concentración más baja pero suficiente de L-glutamina para sostener un crecimiento celular robusto. La Figura 83 y la Figura 84 muestran la concentración de glutamina y glutamax respectivamente en los medios metabolizados recogidos en las condiciones de los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 para ambos tumores L4063 y L4064.

Para L4063, la concentración de glutamina y glutamax disminuyó ligeramente en el día de escalado, pero el día de la cosecha mostró un aumento a niveles similares o más cercanos en comparación con el día de la reactivación. Para L4064, la concentración de glutamina y glutamax mostró una leve degradación en una tasa similar entre diferentes condiciones, durante todo el proceso. Figura 83: Concentración de glutamina (mmol/L) en medios metabolizados para L4063 y L4064. Figura 84: Concentración de glutamax (mmol/L) en medios metabolizados para L4063 y L4064.

La Figura 85 muestra la concentración de amoníaco en los medios metabolizados recolectados para los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 para ambos tumores L4063 y L4064. Como se esperaba, las concentraciones de amoniaco fueron más altas para

L4063 (cultivado en medio estándar que contiene glutamina 2 mM + glutamax 2 mM) que L4064 (cultivado en medio definido que contiene glutamax 2 mM). Además, como se esperaba, hubo un aumento o acumulación gradual de amoníaco durante el transcurso del cultivo. No hubo diferencias en las concentraciones de amoníaco en las tres condiciones de prueba diferentes. Figura 85: Concentración de amoníaco (mmol/L) en medios metabolizados para L4063 y L4064.

Repeticiones de telómeros por Flow - FISH:

La tecnología Flow-FISH se utilizó para medir la longitud promedio de la repetición de los telómeros en L4063 y L4064 en los procesos de Gen 3 y Gen 3.1. La determinación de la longitud relativa de los telómeros (RTL) se calculó mediante el uso del kit de telómeros PNA/FITC para el análisis de citometría de flujo de DAKO. Se realizó un ensayo de telómeros.

La longitud de los telómeros en muestras de L4063 y L4064 se comparó con una línea celular de control (leucemia 1301). La línea celular de control es una línea celular tetraploide que tiene telómeros estables largos, lo que permite calcular la longitud relativa de los telómeros. Los procesos de Gen 3 y Gen 3.1 evaluados en ambos tumores mostraron una longitud de telómeros comparable, como se muestra en la Figura 86. Figura 86: Resumen de la longitud relativa de los telómeros (RTL) en comparación con la línea celular de control (1301).

Análisis del repertorio TCR Vβ

Para determinar la diversidad clonal de los productos celulares generados en cada proceso, se ensayaron los productos finales de TIL para el análisis de diversidad clonal mediante la secuenciación de la porción CDR3 de los receptores de células T.

Se compararon tres parámetros entre las tres condiciones:

- Índice de diversidad de CDR3 única (uCDR3)
- % de uCDR3 compartida
- Para el 80 % superior de uCDR3:
  - Comparar el % de copias de uCDR3 compartidas
  - Comparar la frecuencia de clonotipos únicos

Figura 87: Resumen del repertorio de TCR Vβ para L4063 y L4064. Describe la clonalidad de TIL para el producto de TIL final en los tumores L4063 y L4064 en las condiciones de Gen 3 y Gen 3.1 según lo medido por el repertorio TCR Vβ.

Figura 89: Comparación entre el control de Gen 3 y Gen3.1 y la prueba de Gen 3.1, porcentaje compartido de secuencias de CDR3 únicas en L4063 en el producto celular de TIL cosechados para: 975 secuencias se comparten entre el producto final de la prueba de Gen 3 y Gen 3.1, equivalente al 88 % del 80 % superior de secuencias de CDR3 únicas de Gen 3 compartidas con el producto final de prueba de Gen 3.1.

Figura 88: Comparación de frecuencias de L4063 de las secuencias de CDR3 únicas en el producto celular final de TIL cosechados entre los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1.

Figura 90: Comparación entre el Control de Gen 3 y Gen3.1 y la prueba de Gen 3.1, porcentaje compartido de secuencias de CDR3 únicas en L4064 en el producto celular de TIL cosechados para: 2163 secuencias se comparten entre el producto final de la prueba de Gen 3 y Gen 3.1, equivalente al 87 % del 80 % superior de secuencias de CDR3 únicas de Gen 3 compartidas con el producto final de prueba de Gen 3.1.

Figura 91: Comparación de frecuencias de L4064 de secuencias de CDR3 únicas en el producto celular final de TIL cosechados entre los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1.

El número de secuencias CD3 únicas se identificó a partir de 1 x 10^6 células recogidas el día 16 de la Cosecha, para los diferentes procesos. La condición de la prueba de Gen 3.1 mostró una diversidad clonal ligeramente mayor en comparación con Gen 3.0 según el número de péptidos de CDR únicos dentro de la muestra.

El índice de diversidad de entropía de Shanon es una métrica más confiable y común para la comparación, ya que las condiciones de Gen 3.1 en ambos tumores mostraron una diversidad ligeramente mayor que el proceso de Gen 3, lo que sugiere que el repertorio de TCR Vβ para la condición de prueba de Gen 3.1 es más policlonal que el proceso de Gen 3.0.

Además, el repertorio de TCR Vβ para la condición de prueba de Gen 3.1 mostró más del 87 % de superposición con el repertorio correspondiente para el proceso de Gen 3.0 en el tumor L4063 y

L4064.

INFORMACIÓN ADICIONAL

El valor de la concentración de IL-2 en los medios metabolizados para la prueba de Gen 3.1 de L4064 el día de la reactivación estuvo por debajo del valor esperado (similar al control de Gen 3.1 y la condición de Gen 3.0).

El valor bajo podría deberse a un error de pipeteo, pero debido a la mínima muestra tomada no fue posible repetir el ensayo.

Los medios metabolizados del escalado el día 10/11 en la muestra L4064 no se recogieron y no se incluyeron en el análisis de la concentración de IL-2 y el análisis de metabolitos en el sobrenadante.

CONCLUSIONES

La condición de prueba de Gen 3.1, que incluye las células alimentadoras y OKT-3 en el día 0, mostró una mayor TVC de las dosis de células en la cosecha el día 16 en comparación con el control de Gen 3.0 y Gen 3.1. TVC en el producto final para la condición de prueba de Gen 3.1 fue alrededor de 2,5 veces más alto que en Gen 3.0.

La condición de prueba de Gen 3.1 con la adición de OKT-3 y células alimentadoras el día 0, para ambos tumores L4063 y L4064, alcanzó una capacidad máxima del frasco en la cosecha. En estas condiciones, si se inicia un máximo de 4 frascos el día 0, la dosis celular final podría estar entre 80 - 100E + 09 TIL.

Todos los atributos de calidad, tales como la caracterización fenotípica, que incluye la pureza, los marcadores de agotamiento, activación y memoria en el producto de TIL final, se mantuvieron y fueron comparables entre la prueba de Gen 3.1 y el proceso de Gen 3.0. La longitud de los telómeros en el producto final de TIL y el consumo de IL-2 en los medios metabolizados fueron comparables entre los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1.

La producción de IFN gamma en el producto de TIL final fue 3 veces mayor en Gen 3.1 con la adición de células alimentadoras y OKT-3 el día 0, en comparación con Gen 3.0 en los dos tumores analizados, lo que sugiere que el proceso de Gen 3.1 generó un potente producto de TIL.

No se observaron diferencias en los niveles de glucosa o lactato en las condiciones de prueba. No se observaron diferencias en la glutamina y el amoníaco entre los procesos de Gen 3.0 y Gen 3.1 en las condiciones de los medios. Los bajos niveles de glutamina en el medio no limitan el crecimiento celular y sugieren que la adición de glutamax solo

en el medio es suficiente para proporcionar los nutrientes necesarios para que las células proliferen.

El día de escalado para L4063 y L4064 fue el día 11 y el día 10 respectivamente y no mostró diferencias importantes en términos de número de células alcanzado el día de la cosecha del proceso y el consumo de metabolitos fue comparable en ambos casos durante todo el proceso. Esta observación sugiere que el proceso optimizado de Gen 3.0 puede tener flexibilidad en los días de procesamiento, lo que facilita la flexibilidad en el programa de fabricación.

El proceso de Gen 3.1 con adición de células alimentadoras y OKT-3 el día 0 mostró una mayor diversidad clonal medida por el análisis de secuencia de CDR3 TCRab en comparación con Gen 3.0.

La Figura 92 describe una modalidad del proceso de Gen 3 (proceso optimizado de Gen 3). Pueden usarse medios estándar y medios libres de suero CTS Optimizer para la expansión de TIL del proceso optimizado de Gen 3. En el caso del medio libre de suero CTS Optimizer, se recomienda aumentar el glutamax en el medio hasta una concentración final de 4 mM.

Factibilidad y comparabilidad:

Factibilidad:

Se estableció la factibilidad para todas las condiciones de estudio en todos los experimentos. En todos los experimentos y condiciones y entre el tejido tumoral del donante, todos los experimentos se realizaron mediante el uso de los mismos lotes de materia prima crítica como IL-2, suero AB humano, células alimentadoras alogénicas, OKT-3.

Comparabilidad:

La comparabilidad se determinó por la capacidad de cualquier brazo del estudio para cumplir con los criterios de liberación de nuestro producto clínico de acuerdo con LFP-002 linfocitos infiltrantes de tumor autólogos (TIL) crioconservados del día 22, como se describe en la Figura 93.

EJEMPLO 13: PROCESOS DE EXPANSIÓN TUMORAL CON MEDIO DEFINIDO.

Los procesos descritos en los Ejemplos 5 a 12 se realizan con la sustitución de los medios CM1 y CM2 por un medio definido de acuerdo con la presente invención (por

ejemplo, SFM para la expansión de células T CTS™ OpTmizer™, ThermoFisher, que incluyen por ejemplo DM1 y DM2).

EJEMPLO 14: EXPANSIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR A PARTIR DE BIOPSIA CON AGUJA GRUESA DE TEJIDOS DE UN SUJETO CON CÁNCER PANCREÁTICO

Este ejemplo describe un estudio realizado para expandir TIL a partir de una biopsia con aguja gruesa de un tumor de cáncer de páncreas que se obtiene de un paciente (P7055). El ejemplo proporciona una modalidad ilustrativa de un método para expandir TIL a partir de muestras de biopsias tisulares con aguja gruesa.

Se obtuvo una biopsia con aguja gruesa del tumor pancreático que incluía 3 fragmentos tumorales y se procesó de acuerdo con el método de procesamiento de tumores de tipo Gen 2 descrito a continuación. La Figura 111 representa las etapas del proceso de un protocolo de tipo Gen 2 ilustrativo.

Día 0 - Procesamiento del tumor

La biopsia del tumor con aguja gruesa se recibió y se lavó como se describe en la presente descripción el día 0 del método. La longitud y la masa teórica del núcleo de tejido se midieron mediante el uso de una regla y se registró.

Día 0 - Tipo Gen 2 (pre-REP)

Un G-Rex 100M fue etiquetado con "ID del tumor, Gen 2, iniciales, formulación del medio y fecha". Se añadieron 0,5 L de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml que se calentó a 37ºC (durante al menos 24-30 h) al G-Rex 100M. Se usó una placa de 6 pocillos y se añadieron 5 ml de tampón de lavado de tumor a tres pocillos etiquetados como “# 1”, “# 2” y “# 3”. Brevemente, todo el contenido de la solución del recipiente de la biopsia con aguja gruesa se transfirió a una placa Petri (tal como una de 100 mm o 150 mm).

La muestra se lavó tres veces mediante la transferencia de la muestra de biopsia con aguja gruesa al pocillo 1 con una pipeta Pasteur. La muestra se incubó durante 3 min. Después, las muestras se transfirieron al pocillo # 2 durante 3 min y después las muestras se transfirieron al pocillo # 3 durante 3 min.

Con el uso de una pipeta de transferencia o fórceps, las muestras de biopsia se añadieron directamente del pocillo # 3 en el G-Rex 100M etiquetado que contenía 0,5 L

de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml preparado en la etapa anterior. El G-Rex 100M se colocó en una incubadora a 37 ºC/ CO_2 al 5 % hasta el día 11.

Día 3 - Tipo Gen 2 (Cosecha/Activación de pre-REP)

El día 3 del proceso de tipo Gen 2 se realizó de la siguiente manera. Se prepararon células alimentadoras (células alimentadoras PBMC alogénicas) a partir de una población combinada de PBMC de 2 o más donantes diferentes. Las células alimentadoras se manipularon mínimamente y se congelaron hasta que se necesitaron. Se descongelaron 2 viales de 1 ml de células alimentadoras (células alimentadoras PBMC alogénicas) y se pipetearon en 48 ml de CM-1 + IL-2 a 6000 UI/ml que se calentó a 37 ºC.

Las células alimentadoras PBMC se mezclaron bien mediante el uso de una pipeta serológica y se extrajeron de 4 x 1 ml alícuotas. Las células alimentadoras descongeladas se contaron sin dilución de acuerdo con procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. A continuación, se calculó el volumen requerido para 100e6 células alimentadoras PBMC de acuerdo con la ecuación: 100e6/concentración promedio de células vivas = Volumen requerido para 100e6 PBMC.

El (los) frasco(s) G-Rex 100M que contenían el cultivo pre-REP se retiraron de la incubadora y se colocaron en una cabina de seguridad biológica (BSC).

Se añadió el volumen calculado anteriormente y 30 µl de solución de reserva de OKT3 (30 ng/ml) a cada frasco G-Rex 100M que contenía 500 ml de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml. Se añadió al frasco el volumen total en cantidad suficiente (QS) hasta 1 L: 500 ml - volumen calculado de PPBMC añadidas a cada frasco = volumen total de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml.

Día 11 - Tipo Gen 2 (REP)

El día 11 del proceso de tipo Gen 2 se realizó de la siguiente manera. Para la cosecha de TIL pre-REP, se utilizó un frasco de sistema abierto. El frasco G-Rex 100M que contenía el cultivo se retiró de la incubadora y se extrajeron alícuotas de 2 x 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y se almacenaron a -80 ºC. Se pesó un frasco estéril de 150 ml y se registró el peso. Se aspiraron aproximadamente 900 ml de sobrenadante del frasco G-Rex 100M. Se utilizó una pipeta serológica para transferir el cultivo de TIL pre-REP al frasco estéril de 150 ml ya pesado.

El cultivo de TIL pre-REP se mezcló bien con una pipeta serológica y se recogieron alícuotas de 4 x 1 ml para el conteo celular. Se realizaron cuatro conteos de células sin dilución según los procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. El cultivo de TIL pre-REP se colocó en la incubadora mientras se realizaban los conteos.

Las células que exceden la cantidad máxima (200e6 TIL) que se sembrarán en el cultivo REP se retiraron del cultivo de TIL pre-REP mediante el uso de una jeringa de 100 ml con una pipeta Ashton. 200e6 TIL se transfirieron a una bolsa EV-1000N a través del puerto NIS azul.

La bolsa EV-1000N que contenía los TIL pre-REP se soldó de manera estéril a la línea ROJA del G-Rex 500MCS y los TIL se drenaron por gravedad en el frasco. Después de drenar, la línea roja se selló térmicamente.

5e9 células alimentadoras PBMC se descongelaron como se describió anteriormente. Después de realizar 4 conteos de células, el volumen del cultivo de células alimentadoras se ajustó en función del conteo de células para agregar 5e9 células alimentadoras en la bolsa de células alimentadoras EV1000N. Después de añadir las células alimentadoras, se añadieron 150 uL de OKT3 a la bolsa de células alimentadoras. La bolsa de células alimentadoras se soldó de manera estéril a la línea roja del G-Rex 500MCS y las 5e9 células alimentadoras se drenaron por gravedad en el G-Rex. Se añadieron 4,5 L de CM2 e IL-2 a 3000 UI/ml al G-Rex 500MCS.

Día 16 - Tipo Gen 2 (División)

El día 16 del proceso de tipo Gen 2 se realizó de acuerdo con el método del día 16 de Gen 2 (véase, por ejemplo, la Tabla 21 del Ejemplo 5).

En primer lugar, se extrajeron alícuotas de 2 x 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y se almacenaron a -80 ºC. Brevemente, se redujo el volumen y el cultivo de células REP se dividió en hasta 5 G-REX 500MCS. En cada G-REX 500MCS, el volumen de cultivo fue de 4,5 L de medio CM4 + IL-2 (3000 UI/ml) y $\geq 1 \times 10^9$ TVC/frasco.

Día 22 - Tipo Gen 2 (Cosecha)

El día 22 del proceso de tipo Gen 2 se realizó de acuerdo con el método del día 22 de Gen 2 (véase, por ejemplo, la Tabla 21 del Ejemplo 5).

Las células del día 22 se cosecharon, se procesaron a través de LOVO (cosecha de TIL 2cy) y se congelaron en 30 crioviales de 1 ml (en 1:1 CS10/PLLA HSA al 1 %) mediante

el uso del programa CRF # 1. En algunos casos, solo estaba presente 1 frasco y los frascos secundarios adicionales se extrapolaron para el rendimiento hipotético.

Se guardaron 10e6 células post-LOVO para la tinción de identidad antes de la congelación. Antes de desechar los residuos de sobrenadantes, se extrajeron 2 alícuotas de 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y se almacenaron a -80 ºC.

Resultados

El conteo de TVC en el día 11 (activación) arrojó 47,3e6 células. El conteo de TVC en el día 22 (REP) Post LOVO produjo 10,4e9 células con una viabilidad del 93 %. Como tal, hubo 8,4 duplicaciones de células desde el Día 11 al Día 22 del proceso de tipo Gen 2.

EJEMPLO 15: PROCESOS DE TIPO GEN 2 Y GEN 3 PARA LA EXPANSIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR DE BIOPSIAS TISULARES CON AGUJA GRUESA

Este ejemplo describe un estudio que compara la expansión de TIL de muestras de biopsias con aguja gruesa de tumor de cáncer de páncreas mediante el uso de un proceso de tipo Gen 2 y un proceso de Gen 3. El estudio utiliza una biopsia con aguja gruesa del tumor de un paciente con cáncer de páncreas (P7057). Esta muestra de tumor incluye 3 núcleos y los productos de TIL se producen de acuerdo con el proceso de tipo Gen 2 descrito en la presente descripción. El estudio también utiliza una biopsia con aguja gruesa del tumor de un paciente con cáncer de páncreas (P7058). Esta muestra de tumor incluye 8 núcleos y los productos de TIL se producen a partir de 4 núcleos de acuerdo con el proceso de tipo Gen 2 y 4 núcleos de acuerdo con el proceso de Gen 3 descrito en la presente descripción.

Introducción

Las punciones biópsicas con aguja gruesa son procedimientos de diagnóstico preliminar estándar que se utilizan para muestrear crecimientos tisulares aberrantes cuando se diagnostica un cáncer. El procedimiento utiliza agujas de gran calibre (18, 16, 14, etc.) por vía percutánea para tomar muestras del área sospechosa, que después se analizan y prueban para determinar si el tejido es canceroso. Como la punción biópsica con aguja no requiere incisión ni cirugía, es un medio mucho menos intrusivo para obtener muestras de tumor. Por lo tanto, es conveniente comprobar si las biopsias con aguja

gruesa podrían usarse como una alternativa al tumor extirpado como material de partida en los procesos de producción de TIL descritos.

Antecedentes

Se han desarrollado dos procesos de producción (Gen 2 y Gen 3), que se utilizan en la producción clínica, para la expansión ex vivo de linfocitos infiltrantes de tumor autólogos (TIL) derivados de tumores recién extirpados. Los procesos de Gen 2 y Gen 3 utilizan los mismos biorreactores (G-Rex100 MCS y G-Rex500 MCS). El proceso de Gen 2 incluye una etapa del Protocolo previa a la expansión rápida (pre-REP), y esta etapa se ha reemplazado por una etapa de Activación en el proceso de Gen 3. La expansión rápida (REP) y el escalado del cultivo de TIL en los procesos de expansión del cultivo celular Gen 2 y Gen 3 se realizan en presencia de interleucina 2 (IL-2), el anticuerpo monoclonal OKT3 y células mononucleares de sangre periférica irradiadas ("alimentadoras"), todos los cuales promueven la expansión de TIL. Gen 3 tiene una duración del proceso más corta que el proceso de Gen 2. Los procesos de Gen 2 y Gen 3 se utilizaron como base de diseño para un proceso para punción biópsica con aguja gruesa.

Propósito

El propósito de este estudio es desarrollar un proceso de producción de TIL mediante el uso de una muestra de biopsia con aguja gruesa como material de partida. El diseño de este proceso de producción se basa en los diseños de los procesos de producción clínica Gen 2 y Gen 3 descritos en la presente descripción.

Alcance

Los estudios a gran escala se realizan mediante el uso del proceso tipo Gen 2 y los procesos de Gen 3 (ver, por ejemplo, los ejemplos anteriores). Hay dos cambios en el proceso de tipo Gen 2 en comparación con el proceso de Gen 2, que incluyen 3 días de pre-REP (frente a 11 días para Gen 2) y una etapa de activación en el día 3 al agregar células alimentadoras y OKT-3 en el día 3.

Las principales diferencias de diseño de procesos entre el proceso de tipo Gen 2 y Gen 3 son las siguientes. La presencia de un Protocolo previo a la expansión rápida (pre-REP) en el proceso de tipo Gen 2 en el que las células se extravasan del tejido central o biopsia durante un período de incubación de 3 días en presencia de IL-2, pero en la ausencia de OKT-3 y células alimentadoras. La etapa correspondiente en el proceso de

Gen 3 combina la extravasación de TIL del tumor en combinación con su activación mediante la adición de OKT-3 y células alimentadoras en el día 0.

El Protocolo de expansión rápida en el proceso de Gen 2 incluye una activación única mediante la adición de OKT3, células alimentadoras a los TIL pre-REP durante un período de 11 días con la división el Día 16. La REP correspondiente en el proceso de Gen 3 también usa OKT3 y células alimentadoras añadidas en el día 7/8 con el escalado en el día 11.

El proceso de Gen 2 usa G-Rex 100 MCS para pre-REP y G-Rex 500 MCS para REP. El proceso de Gen 3 utiliza G-Rex 100 MCS para la activación y reactivación y G-Rex 500 MCS para el escalado.

La duración del proceso de Gen 3 es de 16-17 días frente a 22 días para el proceso de Gen 2 (por ejemplo, Gen 3 es 5-6 días más corto que Gen 2).

El proceso de Gen 3 usa medio definido (es decir, sin suero AB humano) mientras que el proceso de Gen 2 usa medio completo que contiene suero AB humano.

La Figura 111 proporciona una comparación de los procesos de tipo Gen 2 y Gen 3 descritos en la presente descripción.

Procedimientos

Esta sección del ejemplo describe el proceso de tipo Gen 2 que se utilizará para producir el producto de TIL a partir de núcleos de la muestra de biopsia con aguja gruesa del tumor pancreático P7057. El proceso tipo Gen 2 y el proceso de Gen 3 descritos a continuación se utilizan para producir el producto de TIL a partir de núcleos de la muestra de biopsia con aguja gruesa del tumor pancreático P7058.

Este estudio utiliza núcleos de tejido/muestras tumorales de biopsia procedentes de proveedores comerciales, colaboradores o socios. Las células alimentadoras PBMC alogénicas se combinan de 2 o más donantes diferentes. Las células alimentadoras se manipulan mínimamente y se añaden directamente al cultivo de TIL en la matriz de crioconservación que consiste en células mononucleares suspendidas en CS10.

Descripción general del proceso tipo Gen 2

Día 0 – Tipo Gen 2 (procesamiento de tumores)

El procesamiento de tumores del método de tipo Gen 2 se realiza de la siguiente manera. Las biopsias del tumor con aguja gruesa se reciben y se lavan 3 veces. La longitud y la masa teórica de cada núcleo de tejido se miden con una regla y se registra.

Día 0 - Tipo Gen 2 (pre-REP)

El día 0 del proceso tipo Gen 2, la fase pre-REP se inicia de la siguiente manera. Etiquetar G-Rex 100M con "ID del tumor, Gen 2, iniciales, formulación del medio y fecha". Agregar 0,5 L de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml que se calienta a 37 ºC (durante al menos 24-30 h) a un G-Rex 100M. Usar una placa de 6 pocillos y agregar 5 ml de tampón de lavado de tumores a 3 pocillos etiquetados como 1, 2 y 3. Brevemente, transferir todo el contenido de la solución del recipiente de biopsia con aguja gruesa a una placa Petri (100 mm o 150 mm). Lavar la muestra 3 veces transfiriendo la muestra de biopsia con aguja gruesa al pocillo 1 con una pipeta Pasteur. Incubar durante 3 min. Después transferir las muestras al pocillo 2 durante 3 min y después transferir las muestras al pocillo 3 durante 3 min. Con una pipeta de transferencia o fórceps, agregar las muestras de biopsia directamente del pocillo 3 al G-Rex 100M etiquetado que contiene 0,5 L de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml preparado en la etapa anterior. Colocar G-Rex 100M en una incubadora a 37 ºC/CO_2 al 5 % hasta el día 11.

Día 3 - Tipo Gen 2 (Cosecha/Activación de pre-REP)

En el día 3 del proceso de tipo Gen 2, la cosecha/activación de pre-REP se realiza de la siguiente manera. Descongelar 2 viales de 1 ml de PBMC y pipetear en 48 ml de CM-1 + IL-2 a 6000 UI/ml que se calienta a 37 ºC. Mezclar bien con una pipeta serológica y retirar 4 alícuotas de 1 ml y contar las células alimentadoras descongeladas según los métodos estándar sin dilución. Calcular el volumen requerido para 100e6 PBMC: (100e6/concentración promedio de células vivas = Volumen requerido para 100e6 PBMC). Retirar el (los) frasco(s) G-Rex 100M que contienen el cultivo de la incubadora y colocarlos en BSC. Agregar el volumen calculado de arriba y 30 µl de solución de reserva de OKT3 (30 ng/ml) a cada frasco que contiene 500 ml de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml volumen total de QS hasta 1 L: 500 ml - volumen añadido en 10.5.6. = volumen total de CM1 + IL-2 a 6000 UI/ml se añadió al frasco.

Día 11 - Tipo Gen 2 (REP)

En el día 11 del proceso tipo Gen 2, la fase REP se inicia según el proceso de Gen 2 del día 11, con la excepción de la cosecha de TIL pre-REP y la siembra en el G-Rex 500MCS. Para la cosecha de TIL pre-REP, se utiliza un frasco de sistema abierto.

Retirar el frasco de la incubadora y extraer 2 alícuotas de 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y almacenar a -80 ºC. Pesar un frasco estéril de 150 ml y registrar el peso. Aspirar ~ 900 ml de sobrenadante. Usar una pipeta serológica para transferir los TIL pre-REP al frasco estéril de 150 ml pesado. Mezclar bien con pipeta serológica y obtener 4 alícuotas de 1 ml para el conteo celular. Realizar 4 conteos de células sin dilución en NC-200 según métodos estándar. Mantener los TIL pre-REP en la incubadora mientras se realiza el conteo celular.

Si es necesario, retirar un volumen apropiado del frasco para dejar 200e6 TIL (la cantidad máxima a sembrar en el REP) y use una jeringa de 100 ml con una pipeta Ashton para transferir los TIL restantes (200e6 TIL) a una bolsa EV-1000N a través del puerto NIS azul. Soldar de manera estéril la bolsa EV-1000N que contiene los TIL pre-REP en la línea ROJA del G-Rex 500MCS y drenar por gravedad los TIL en el frasco. Después de drenar, sellar la línea roja con calor.

Descongelar 5e9 células alimentadoras de acuerdo con el método descrito anteriormente. Después de realizar 4 conteos de células, ajustar el volumen si es necesario para lograr 5e9 células en la bolsa de células alimentadoras EV1000N. Agregar 150 uL de OKT3 a la bolsa de células alimentadoras. Soldar de manera estéril la bolsa de células alimentadoras a la línea roja del G-Rex 500MCS y drenar por gravedad 5e9 células alimentadoras en el G-Rex. Agregar 4,5 L de CM2 + IL-2 a 3000 UI/ml al G-Rex 500MCS.

Día 16 - Tipo Gen 2 (División)

El día 16 del proceso de tipo Gen 2, la etapa de división se realiza según la etapa del día 16 de Gen 2 (ver, Tabla 21 del Ejemplo 5). Se extrajeron 2 alícuotas de 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y se almacenaron a -80 ºC. El día 16 del proceso de tipo Gen 2 se realiza según el proceso del día 16 de Gen 2, con la siguiente excepción. Si solo se mueve 1 frasco hacia adelante al escalado/división la escala, el número de frascos secundarios se añade en la cosecha para extrapolar a escala completa. Por ejemplo, si se necesitan 5 frascos, solo 1 se mueve hacia adelante y el TVC del producto final se multiplica por 5 para extrapolar para el rendimiento esperado a escala completa.

Día 22 - Tipo Gen 2 (Cosecha)

El día 22 del proceso de tipo Gen-2, la etapa de cosecha se realiza según el proceso del día 22 de Gen 2 (véase, por ejemplo, la Tabla 21 del Ejemplo 5). Las células del día

22 para el tipo Gen 2 se cosechan, se procesan a través del sistema de procesamiento de células LOVO y se congelan en 30 crioviales de 1 ml (en 1:1 CS10/PLLA HSA al 1 %). En algunos casos, solo hay 1 frasco y los frascos secundarios adicionales se extrapolan para obtener el rendimiento hipotético. Se guardan 10e6 células post-LOVO para la tinción de identidad antes de la congelación. Antes de desechar los residuos sobrenadantes, se extraen 2 alícuotas de 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y se almacenan a -80 ºC.

Descripción general del proceso de Gen 3

Día 0 - Gen 3 (procesamiento de tumores)

El procesamiento de tumores del método Gen 3 se realiza como se describe en la presente descripción. Las biopsias del tumor con aguja gruesa se reciben y se lavan 3 veces. La longitud y la masa teórica de cada núcleo de tejido se miden con una regla y se registra.

Día 0 - Gen 3 (Activación)

El día 0 de Gen 3 se realiza de acuerdo con el proceso descrito (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 5-8). Asignar las muestras de biopsia restantes como se mencionó anteriormente en un frasco G-Rex 100M que contiene 500 ml de DM + IL-2 a 6000 UI/ml que se calienta a 37 ºC. Para cada frasco utilizado, descongelar 4 viales de 1 ml de PBMC irradiadas en un baño de agua a 37 ºC. Usar una pipeta de transferencia para transferir las PBMC a un tubo cónico de 50 ml con 46 ml de DM caliente + IL-2 a 6000 UI/ml. Mezclar bien con una pipeta serológica y retirar 4 alícuotas de 1 ml y contar a una dilución 1:10 en NC-200 según el protocolo descrito en la presente descripción. Calcular el volumen requerido para 250e6 PBMC: (250e6/concentración promedio = Volumen requerido para 250e6 PBMC). Agregar el volumen calculado de la etapa anterior a cada frasco que contiene 500 ml de DM + IL-2 a 6000 UI/ml y los fragmentos tumorales. Añadir 15 uL de solución de reserva de OKT-3 (1 mg/ml) a cada frasco que contiene 500 ml de DM + IL-2 a 6000 UI/ml, fragmentos tumorales y células alimentadoras PBMC. Etiquetar cada frasco con "ID del tumor, Gen 3, número de frasco, iniciales, fecha". Colocar en una incubadora a 37 ºC/CO2 al 5 % hasta el día 8.

Día 7/8 - Gen 3 (Reactivación)

El día 7/8 del proceso de Gen 3 se realiza como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 5-9. Retirar el (los) frasco(s) G-Rex 100M que contienen el cultivo de la

incubadora y colocarlos en BSC. Retirar 2 alícuotas de 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y almacenar a -80 ºC. Agregar 500 ml de DM + IL-2 a 6000 UI/ml que se calienta a 37 ºC al frasco G-Rex 100M. Agregar 25 ml de DM + IL-2 a 6000 UI/ml que se calienta a 37 ºC a un tubo cónico de 50 ml. Descongelar 1 bolsa de 25 ml de PBMC en un baño de agua a 37 ºC, pinchar la bolsa con un juego de extensión de plasma, extraer los 25 ml con una jeringa y dispensar en el tubo cónico de 50 ml preparado. Realizar 4 conteos de células a 1:10 (100 uL de PBMC en 900 uL de AIM-V) o 1:100 (preparar 1:10 como se describe y después transferir 100 uL a otros 900 uL de AIM-V) contar células alimentadoras descongeladas según métodos estándar. Calcular el volumen requerido para 500e6 PBMC: (500e6/concentración promedio = Volumen requerido para 500e6 PBMC). Agregar el volumen calculado de PBMC de las etapas anteriores al G-Rex 100M que contiene 1 L de DM + IL-2 a 6000 UI/ml y las biopsias con aguja gruesa. Agregar 30 uL de OKT3 de reserva (30 ng/ml) al frasco. Colocar el frasco en incubadora a 37 ºC/CO2 al 5 %.

Día 10/11 - Gen 3 (Escalado)

El escalado del Día 10/11 del proceso de Gen 3 se realiza como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 5-10. Se retira(n) el (los) frasco(s) de la incubadora y se extraen 2 alícuotas de 1 ml de sobrenadante para el análisis de metabolitos y se almacenan a -80 ºC. Soldar de manera estéril un juego de transferencia de fluido en la línea ROJA de un G-Rex 500MCS, pasar el juego de transferencia de fluido a través de la bomba Baxter y conectar asépticamente una pipeta Ashton al otro extremo dentro de un BSC. Transferir ~ 700 ml de medio del G-Rex 100MCS al G-Rex 500MCS, detener la bomba, agitar para disociar la capa celular y transferir el cultivo celular restante al G-Rex 500MCS. Después de transferir todos los TIL, soldar de manera estéril la línea ROJA del G-Rex en una bolsa de 5 L o 10 L de DM + IL-2 a 3K UI/ml que se calienta a 37 ºC. Drenar el medio por gravedad hasta la marca de 5 L del G-Rex 500MCS. Una vez que se haya completado el drenaje, vuelva a colocar el frasco en la incubadora.

Día 16/17 - Gen 3 (Cosecha)

El día 16/17 del proceso de Gen 3 se realizó como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 5-1. Las células del día 17 para Gen 3 se cosechan, se procesan a través de LOVO (cosecha de TIL 5cy) y se congelan en 30 crioviales de 1 ml (en una proporción de 1:1 de CS10:Plasmalyte con HSA al 1 %) mediante el uso del programa CRF núm. 1. En algunos casos, solo 1 o 2 frascos están presentes para la cosecha, según el

número de fragmentos sembrados en el día 0. Se guardan 10e6 células post-LOVO para la tinción de pureza antes de la congelación.

Caracterización del producto final y de las materias primas:

Pueden evaluarse las materias primas y los productos finales de TIL producidos de acuerdo con los procesos de Gen 2 y Gen 3. La identidad (% de CD45+/CD3+) se mide en el producto de TIL fresco antes de congelar mediante el uso de protocolos estándar. Por ejemplo, se mide la función TIL en términos de producción de interferón gamma y liberación de granzima B. La estimulación de TIL se mide de acuerdo con la liberación de IFN-gamma. La estimulación de TIL se mide de acuerdo con la liberación de Granzima B mediante ELISA. Puede evaluarse el fenotipo de CD107a, el fenotipo extendido, la tinción de antígenos de superficie de TIL mediante el uso de un panel de diferenciación y/o un panel de activación/agotamiento. Puede realizarse la secuenciación de TCRvβ. Puede medirse la actividad telomerasa y la longitud de los telómeros. Los metabolitos pueden medirse en el sobrenadante del cultivo mediante el bioanalizador CEDEX.

Resultados esperados o criterios de aceptación

Los resultados esperados de las células pre-REP y el Producto final del proceso de tipo Gen 2, así como el Producto final del proceso de Gen 3, se proporcionan en las Tablas 30 y 31.

Tabla 30. Pruebas de pre-REP y resultados esperados para el proceso de tipo Gen 2

Tipo de prueba	**Método**	**Criterios de aceptación**
Conteo de células/viabilidad	Fluorescencia	> 5 x 10e6 células viables

Tabla 31. Pruebas del producto final y criterios de aceptación (procesos de tipo Gen 2 y Gen 3)

Tipo de prueba	**Método**	**Criterios de aceptación**
Prueba de liberación		
Viabilidad celular	Fluorescencia	$\geq$ 70 %

Tipo de prueba	Método	Criterios de aceptación
Conteo de células viables totales	Fluorescencia	1e9 a 150e9
Identidad (% de CD45+/CD3+)	Citometría de flujo	Tipo Gen 2: ≥ 90 % de TIL CD45+ CD3+ para todas las indicaciones Gen 3: ≥ 90 % de TIL CD45+ CD3+ para no ováricos ≥ 85 % CD45+ CD3+ TIL para ováricos
Producción de interferón gamma (estimulada - no estimulada)	Estimulación y ELISA	≥ 500 pg/ml

En algunas modalidades, la prueba del producto final congelado se realiza en los productos producidos en el método descrito en la presente descripción, tales como los métodos tipo GEN 2 y Gen 3. En algunas modalidades, las pruebas comprenden la evaluación de uno o más de los siguientes: marcadores de diferenciación, activación y agotamiento, granzima B, CD107A, secuenciación de TCR vβ, longitud de los telómeros, actividad telomerasa y metabolitos. En algunos casos, la diferenciación se evalúa mediante citometría de flujo, por ejemplo, mediante citometría de flujo de un panel de TIL 1. En algunos casos, los marcadores de activación y agotamiento se evalúan mediante citometría de flujo, por ejemplo, mediante citometría de flujo de un panel de TIL 2. En algunos casos, la granzima B se evalúa mediante estimulación con perlas y ELISA. En algunos casos, CD107A se evalúa mediante estimulación con mitógenos y citometría de flujo intracelular. En algunos casos, la secuenciación de TCR vβ se realiza mediante secuenciación profunda. En algunos casos, la longitud de los telómeros se mide mediante el uso de un ensayo TAT. En algunos casos, la actividad telomerasa se determina por Q-TRAP. En algunos casos, la longitud de los telómeros se mide

mediante el uso de un ensayo TAT. En algunos casos, el metabolito se determina mediante el uso de un analizador de metabolitos CEDEX.

Los ejemplos expuestos anteriormente se suministran para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción y descripción completas de cómo se realizan y se usan las modalidades de las composiciones, sistemas y métodos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se pretende que las modificaciones de los modos descritos anteriormente para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en la técnica estén comprendidos dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la descripción son indicativas de los niveles de habilidad de los expertos en la técnica a las cuales se refiere la invención.

Todos los encabezados y designaciones de sección se usan para fines de claridad y referencia únicamente y no deben considerarse limitantes en modo alguno. Por ejemplo, los expertos en la técnica podrán apreciar la utilidad de combinar varios aspectos de diferentes encabezados y secciones según sea apropiado de acuerdo con el espíritu y el alcance de la invención descrita en la presente.

[0004] Todas las referencias citadas en la presente se incorporan a la presente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos con el mismo alcance como si cada publicación o patente o solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorprada como referencia en su totalidad para todos los propósitos.Pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones de esta solicitud sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Las modalidades y ejemplos específicos descritos en la presente descripción se ofrecen a modo de ejemplo solamente, y la solicitud solo se verá limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los cuales las reivindicaciones tengan derecho.