

LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR CON INTERLEUCINA 15 UNIDA A MEMBRANA Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 [001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/139,305, presentada el 19 de enero de 2021; solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/153,367, presentada el 24 de febrero de 2021; solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/226,114, presentada el 27 de julio de 2021; solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/244,166, presentada el 14 de septiembre de 2021, que se incorporan al presente por referencia en su totalidad para todos los fines.

10 ANTECEDENTES

[002] Los tumores sólidos presentan grandes desafíos en el desarrollo de terapias celulares adoptivas (ACT) efectivas. Por ejemplo, dirigirse a un único antígeno tumoral puede provocar la pérdida del antígeno o la recurrencia de clones más agresivos. Además, la infiltración de las células terapéuticas en un tumor sólido puede resultar desafiante e, incluso si las células se infiltran en el tumor, el
15 microambiente del tumor puede ser inhóspito debido a los mecanismos inmunosupresores. Las ACT con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés) se han propuesto como una modalidad de tratamiento que aborda estos problemas, al menos para ciertos tumores sólidos. Los TIL, por ejemplo, incluyen células T con múltiples clones de receptores de células T (TCR) y, por lo tanto, son más capaces de reconocer múltiples antígenos tumorales y, por lo tanto, abordar la
20 heterogeneidad tumoral. Además, los TIL reconocen antígenos específicos de tumores y neoantígenos tumorales, lo que les permite dirigirse a tumores, que son antigénicamente distintos del tejido sano circundante.

[003] Para su uso como terapia celular, los TIL se preparan a partir de un sitio tumoral de un sujeto utilizando una biopsia tumoral o una muestra de un tumor extirpado quirúrgicamente. Luego, los TIL
25 se estimulan y expanden *in vitro* en presencia de estimuladores, como la interleucina 2 (IL2) y células alimentadoras, como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés). Después de la expansión, los TIL se vuelven a infundir en el paciente con la administración simultánea de IL2. Sin embargo, la IL2 muestra toxicidad dependiente de la dosis, que puede manifestarse en múltiples sistemas de órganos, más significativamente el corazón, los pulmones, los riñones y el
30 sistema nervioso central. La manifestación más común de toxicidad por IL2 es el síndrome de fuga capilar, que resulta en un estado hipovolémico y acumulación de líquido en el espacio extravascular. Un número significativo de pacientes no tolerará el tratamiento complementario con IL2 y, por lo

tanto, debe excluirse del tratamiento con TIL. Se necesitan mejoras en el campo para hacer que la ACT usando TIL sea un tratamiento seguro y más efectivo para el cáncer.

COMPENDIO

5 **[004]** Esta descripción se refiere a un TIL que se modifica (es decir, se diseña) para expresar una interleucina 15 unida a la membrana (mbIL15). El TIL modificado se puede expandir *in vitro* o *in vivo* en ausencia de una citocina exógena como la interleucina 2 (IL2). La administración sistémica de IL2 a pacientes con cáncer concomitante con o después de la inmunoterapia con TIL a menudo causa toxicidad en pacientes que ya son médicamente frágiles. Muchos pacientes sufren efectos
10 secundarios graves y potencialmente mortales después de la administración de IL2, que incluyen hipotensión y shock debido al síndrome de fuga capilar. La terapia con TIL con dosis bajas de IL2 concomitante fue menos efectiva que con dosis más altas. Por lo tanto, el TIL modificado del presente documento puede usarse en un régimen de tratamiento que es menos tóxico para un sujeto con cáncer que los regímenes de tratamiento actuales que requieren el uso de IL2 exógena.

15 **[005]** El TIL puede diseñarse adicionalmente de manera que la mbIL15 esté unida operativamente a uno o más dominios sensibles a fármacos (DRD, por sus siglas en inglés). Los DRD son polipéptidos que pueden regular la abundancia y/o la actividad de una carga activa, como mbIL15, al unirse a un ligando. Múltiples DRD, por ejemplo, en serie, pueden regular una sola carga activa. El uno o más DRD están unidos operativamente a la carga activa de mbIL15 de manera que la interacción del DRD
20 con una cantidad efectiva de ligando en condiciones apropiadas da como resultado la modificación de la actividad biológica de la carga activa.

[006] También se proporciona una población de TIL modificados. La pluralidad de TIL incluye opcionalmente una subpoblación de TIL modificados que ha experimentado una expansión. Por lo tanto, también se proporciona en este documento un TIL expandido diseñado para expresar una
25 mbIL15, opcionalmente unido operativamente a un DRD. También se describe aquí una población de TIL expandidos. Después de la expansión, la población de TIL sobrevive más de 5 días, más de 10 días o más de 15 días en un cultivo que carece de células alimentadoras, incluso en ausencia de citocinas exógenas. De manera similar, la población de TIL sobrevive *in vivo* sin la administración de citocinas exógenas. Debido a que las citocinas exógenas como IL2 dan como resultado un mayor
30 agotamiento de los TIL, la expansión de los TIL modificados *in vivo* e *in vitro* da como resultado una población más potente de TIL.

[007] La población de TIL expandidos tiene una mayor proporción de células CD8+ y una menor proporción de células CD4+ en comparación con la proporción de células CD8+ y células CD4+ en

una población de control de TIL no expandidos. Por lo tanto, la población de TIL expandidos tiene una proporción de CD4:CD8 inferior a la proporción de CD4:CD8 de una población de control de TIL no expandidos. Además, la población de TIL mbIL15 expandidos tiene una proporción menor de células T_{reg} CD4 en comparación con la proporción de células T_{reg} CD4 en los TIL pre-REP, antes del diseño y expansión en REP. La población de TIL expandidos también tiene una proporción menor de células PD1+ en comparación con la proporción de células PD1+ en una población de control de TIL no expandidos. La población de TIL expandidos como se describe en este documento también tiene una mayor proporción de células que producen factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interferón γ (IFN γ) en comparación con la proporción de TIL que producen factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interferón γ (IFN γ) en una población de control de TIL no expandidos.

[008] También se describe en el presente documento una población mixta de TIL que incluye una subpoblación de TIL no modificados y una subpoblación de TIL modificados que comprende mbIL15, que está, opcionalmente, unido operativamente a un DRD. La subpoblación de TIL modificados se expande en presencia de células alimentadoras K562, ligando 41BB (41BBL) e interleucina 21 (IL21, secretada o unida a la membrana de las células alimentadoras K562) y se expande más que la subpoblación de TIL no diseñados (es decir, sin modificar) en presencia de células alimentadoras K562, 41BBL e IL21. Esta expansión preferencial de la subpoblación de TIL diseñados (es decir, modificados) ocurre en ausencia de citocinas exógenas, como IL2.

[009] Un método para fabricar TIL diseñados para expresar mbIL15 incluye transducir el TIL con un vector, en donde el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica IL15 y un segundo ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana. El vector utilizado para transducir el TIL puede ser un vector viral, tal como un vector gamma-retroviral o un vector lentiviral, más particularmente, un vector pseudotipado gamma-retroviral del virus de la leucemia del simio gibón (GALV) o un vector lentiviral pseudotipado de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV). Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un vector retroviral pseudotipado de GALV o un vector lentiviral pseudotipado de BaEV que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica IL15 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana. Tras la expresión del primer y segundo ácido nucleico, el dominio transmembrana sirve para anclar la IL15 a o dentro de la membrana celular, opcionalmente unida a la IL15 a través de un enlazador o una bisagra.

[0010] También se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquier TIL o población de TIL descrita en el presente documento y un vehículo farmacéutico. Cualquier TIL, cualquier población de TIL o cualquier composición farmacéutica de los mismos puede usarse para

administrarse a un sujeto receptor con cáncer como método para tratar el cáncer. El método opcionalmente comprende además administrar al sujeto receptor un segundo agente, en donde el segundo agente es un ligando que se une a un DRD unido operativamente a mbIL15. Tras la administración de una cantidad eficaz del ligando y la unión del ligando al DRD, la actividad biológica de la mbIL15 aumenta en el sujeto. El método de tratamiento, con o sin un DRD unido operativamente a la mbIL15, no requiere que al sujeto se le administre una citocina exógena, tal como IL2. El método de tratamiento incluye opcionalmente aislar uno o más TIL de un tumor e introducir en uno o más TIL un ácido nucleico que expresa mbIL15. Los TIL se pueden aislar de un tumor del sujeto receptor o de un sujeto donante, en donde el sujeto donante no es el sujeto receptor. Los TIL aislados del tumor del sujeto donante pueden seleccionarse de modo que los TIL aislados del donante comprendan receptores de células T (TCR) que son específicos para uno o más antígenos cancerosos que están presentes en el tumor del sujeto receptor. Opcionalmente, el método comprende además seleccionar un sujeto donante que sea compatible con HLA para el sujeto receptor. En los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, el sujeto receptor opcionalmente se agota linfocitos antes de la administración de los TIL.

[0011] Las modalidades identificadas son solo a modo de ejemplo y, por lo tanto, no son limitativas. Los detalles de una o más modalidades no limitativas de la invención se exponen en las figuras adjuntas y la descripción a continuación. Otras modalidades de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de considerar la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012] La FIG. 1 muestra la frecuencia de las células CD45+ (izquierda) y las células T CD3+ dentro de las células CD45+ (derecha) en el dígido de tumor fresco y después de 3 semanas de cultivo TIL pre-REP.

[0013] La FIG. 2 muestra la eficiencia de transducción de la construcción IL15-293 en dos donantes de TIL de melanoma medida por citometría de flujo el día 5 después de la transducción.

[0014] La FIG. 3A-3B muestran la expansión y supervivencia independientes de antígeno e IL2 de TIL que expresan mbIL15. La FIG. 3A muestra células TIL del donante 006 (TIL 006) transducidas con mbIL15 constitutiva o GFP y expandidas en REP durante 12 días con o sin 6000 IU/ml de IL2. La FIG. 3B muestra TIL 006 transducido con mbIL15 constitutiva (expandido en REP sin IL2) o GFP (expandido en REP con 6000 IU/ml de IL2) y enumerado en un ensayo de supervivencia independiente de antígeno de 14 días, con y sin 6000 IU/ml de IL2.

[0015] La FIG. 4 muestra la expansión de TIL independiente de antígeno después de un protocolo de expansión rápida (REP). Después de REP, se sembraron en placas TIL no diseñados y diseñados con mbIL15 (mbIL15 constitutiva o regulada) con o sin IL2 exógena o acetazolamida (ACZ), y se recolectaron pocillos nuevos cada 3 días para evaluar la enumeración celular y el fenotipo.

5 [0016] La FIG. 5 muestra la expansión de TIL en un entorno dependiente de antígeno. Después de un protocolo de expansión rápida (REP), los TIL no diseñados y diseñados con mbIL15 se colocaron en placas con células de melanoma tratadas con mitomicina C con HLA coincidente en un ensayo de cocultivo TIL:tumor con y sin IL2 exógena, acetazolamida o vehículo (DMSO) y pocillos se recolectaron cada 3 días para evaluar la enumeración celular y el fenotipo.

10 [0017] La FIG. 6A-B muestra la reactividad tumoral de los TIL después de un protocolo de expansión rápida (REP). La FIG. 6A muestra TIL 006 y TIL 005, ambos transducidos con mbIL15 regulada y controles no diseñados y cocultivados durante 24 horas con células de melanoma tratadas con mitomicina C de HLA coincidente. El IFN γ en los sobrenadantes se midió mediante ensayo MSD. La FIG. 6B muestra la citotoxicidad de los TIL en el cocultivo medida por la pérdida de luminiscencia por la línea de melanoma coincidente con HLA marcada con luciferasa.

15 [0018] Las FIG. 7A-B muestran la expansión de TIL y la eficiencia de transducción antes de la infusión en animales para un experimento de terapia celular adoptiva *in vivo*. La FIG. 7A muestra la expansión celular para el donante 006 de TIL, utilizado para la transferencia de células adoptivas (ACT) *in vivo*, de TIL no diseñados y diseñados con mbIL15. La FIG. 7B muestra la eficiencia de transducción después de un protocolo de expansión rápida (REP); se evaluó la expresión de IL15 e IL15RaFc en TIL no diseñados y diseñados con mbIL15 como una medida de la eficiencia de transducción.

20 [0019] Las FIG. 8A-C muestran análisis de enumeración de TIL y expresión de IL15 para experimentos de terapia celular adoptiva *in vivo*. La FIG. 8A muestra la enumeración de TIL no diseñados y diseñados con mbIL15 transferidos adoptivamente mediante citometría de flujo a partir de muestras de sangre periférica. Los TIL se identificaron como células CD3 humanas+CD45-murinas vivas en muestras de sangre de la vena submandibular. La FIG. 8B y la FIG. 8C muestran la enumeración de TIL (hCD3+mCD45-) y la expresión de IL15 (IL15+IL15RaFc+) de muestras de médula ósea y esplénica aisladas 14 días o 53 días después de ACT.

25 [0020] La FIG. 9 muestra la regulación por acetazolamida (ACZ) de la expresión y señalización de IL15 en TIL mbIL15 regulados crioconservados que se produce de una manera dependiente de la dosis. Los TIL mbIL15 regulados de cuatro pacientes (pacientes 1-4) se descongelaron y reposaron en medios libres de ACZ durante 24 horas, luego se regularon en 0,1, 1, 2,5, 5, 10, 25, 100 μ M de

ACZ durante 18 horas. A continuación, se recogieron y analizaron los TIL mbIL15 regulados para determinar la expresión y la señalización de IL15 mediante un ensayo basado en citometría de flujo fosfo. La FIG. 9A muestra la frecuencia de TIL IL15+ como porcentaje de células CD3+. Las FIG. 9B-9E muestran los resultados para cada paciente: aquí, las células se seleccionaron adicionalmente en IL15+ y luego se calculó la intensidad fluorescente media geométrica para cada pSTAT5 (cuadrado abierto) y pS6 (círculo cerrado). Los valores que se muestran se establecen en relación con el control del vehículo. N=4 donantes humanos.

[0021] La FIG. 10 muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) para pSTAT5 y pS6 en los pacientes 1-4. La FIG. 10A muestra la MFI para pSTAT5. La FIG. 10B muestra la MFI para pS6.

[0022] La FIG. 11 muestra la expresión constitutiva de mbIL15 y la regulación de ACZ de TIL mbIL15 regulados que participan en la vía de señalización de IL15. Aquí, los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados de los pacientes 1 a 3 se descongelaron y reposaron en medios sin ACZ durante 24 horas, luego se regularon con IL2 o ACZ durante 18 horas. Se recogieron y analizaron células para determinar la expresión y la señalización de IL15 mediante un ensayo basado en citometría de flujo fosfo. Los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados + vehículo se seleccionaron en células vivas seguidas de singletes, seguidas de CD3+. Los TIL IL15 constitutivos y los TIL mbIL15 regulados + las condiciones ACZ se seleccionaron adicionalmente en la tinción de IL15+. Se calculó la intensidad fluorescente media geométrica para cada pSTAT5 y pS6. N=3 donantes humanos.

[0023] La FIG. 12 muestra que los TIL modificados con mbIL5 regulados sin citocinas exógenas demuestran una mayor polifuncionalidad que los TIL + IL2 no modificados. Los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados se descongelaron y reposaron en medios libres de ACZ durante 24 horas; a continuación, los TIL no diseñados se trataron con las siguientes concentraciones de IL2: 20, 200, 1000 y 6000 IU/ml, o vehículo; y los TIL mbIL15 regulados se trataron con las siguientes concentraciones de ACZ: 0,1, 1, 5, 10, 25, 100 μ M de ACZ o vehículo. Los tratamientos fueron de 18 horas. Las células se estimularon con PMA e ionomicina durante 6 horas en presencia de brefeldina A y monensina. Se usaron TIL no estimulados como controles (datos no mostrados). Después de la estimulación, se analizó la expresión de IL15 y TNF α e IFN γ intracelulares en las células mediante un ensayo basado en citometría de flujo. Los TIL se seleccionaron en células vivas, seguidos de singletes, seguidos de CD3+, y los TIL mbIL15 regulados se seleccionaron adicionalmente en IL15+. La FIG. 12A muestra poblaciones positivas dobles de TNF α e IFN γ para TIL no diseñados con IL2 y TIL mbIL15 regulados con ACZ. La FIG. 12B muestra la expresión de IL15 en cultivos de TIL mbIL15 regulados. La FIG. 12C muestra una comparación de dosis seleccionadas de IL2 (200 IU/ml) y ACZ (25 μ M).

[0024] La FIG. 13 muestra los resultados de un modelo de eficacia de xenoinjerto derivado del paciente (PDX). Al final del protocolo de expansión rápida (REP), los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados (+/- acetazolamida (ACZ)) se transfirieron adoptivamente a ratones que tenían un PDX de melanoma humano. Se evaluaron los volúmenes tumorales medios (+/- SEM). La FIG. 13A muestra el volumen tumoral medio para un tratamiento dado en los días posteriores a la transferencia celular adoptiva (ACT). La FIG. 13B muestra el volumen del tumor en los días posteriores a la ACT sin TIL (arriba a la izquierda); TIL no diseñados + IL2 (arriba a la derecha); TIL mbIL15 regulados + vehículo (abajo a la izquierda); y TIL mbIL15 regulados +ACZ (abajo a la derecha). Aquí, los TIL mbIL15 regulados + ACZ tenían una eficacia antitumoral significativamente superior en comparación con los TIL no diseñados + IL2 (* $p < 0,05$; Mann U Whitney).

[0025] La FIG. 14 muestra los resultados de un modelo de cáncer de xenoinjerto SK-MEL-1. Al final del protocolo de expansión rápida (REP), los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados (+/- acetazolamida (ACZ)) se transfirieron adoptivamente a ratones que tenían tumores SK-MEL-1. Se evaluaron los volúmenes tumorales medios (+/- SEM). La FIG. 14A muestra el volumen tumoral medio para un tratamiento dado en los días posteriores a la transferencia celular adoptiva (ACT). La FIG. 14B muestra el volumen del tumor en los días posteriores a ACT sin TIL (arriba a la izquierda); TIL no diseñados + IL2 (arriba a la derecha); TIL mbIL15 regulados + vehículo (abajo a la izquierda); y TIL mbIL15 +ACZ regulados (abajo a la derecha). Aquí, los TIL mbIL15 regulados + ACZ muestran una eficacia antitumoral significativamente superior en comparación con los TIL no diseñados + IL2 (* $p < 0,05$; Mann U Whitney).

[0026] La FIG. 15 muestra que los TIL mbIL15 regulados logran una citotoxicidad dependiente de MHC-I mejorada contra el melanoma *in vitro*. Aquí, los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados se crioconservaron al final del protocolo de expansión rápida (REP). Los TIL crioconservados se descongelaron y reposaron en condiciones libres de citocinas durante la noche, y luego se cocultivaron con células de melanoma marcadas con Cell Trace Violet (SK-MEL-1) a una proporción efector-objetivo de 1:1 y 5:1 (TIL: melanoma). Para controlar la citotoxicidad dependiente de MHC-1, las células de melanoma se pretrataron con 80 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo bloqueante HLA ABC MHC durante 2 horas antes del ensayo. Después de 3 horas de cocultivo, se evaluó la expresión de la caspasa 3 escindida intracelular (un marcador del compromiso irreversible con la muerte celular) en las células SK-MEL-1 mediante citometría de flujo. La caspasa 3 escindida cuantificada se normalizó a la de las células objetivo solas (liberación espontánea o de fondo). Los gráficos de barras muestran la expresión de capsasa 3 escindida en células tumorales objetivo cuando se cultivan conjuntamente con TIL de 6 pacientes individuales.

[0027] La FIG. 16 es un gráfico que muestra que la expansión máxima de TIL en REP se produce cuando se generan TIL mbIL15 (constitutivos) con células alimentadoras K562 con coestimulación mediada por IL21 y 41BBL.

[0028] La FIG. 17 es un gráfico que muestra que la expansión máxima de TIL en REP se produce cuando se generan TIL no diseñados con alimentadores de PBMC agrupados o células alimentadoras K562 que expresan IL21 y 41BBL unidos a la membrana.

[0029] La FIG. 18. muestra que la expansión máxima de TIL IL15+ en REP se produce cuando se generan TIL con mbIL15 (constitutivo) con células alimentadoras K562 y reciben coestimulación mediada por IL21 y 41BBL. Los resultados de las células alimentadoras en los días 8, 11, 15 y 18 se muestran de izquierda a derecha: alimentadores de PBMC, alimentadores K562-originales, alimentadores K562 + 41BBL, alimentadores K562 + 41BBL con IL21 humana recombinante, alimentadores K562 + mbIL21, alimentadores K562 + 41BBL +mbIL21.

[0030] La FIG. 19 es un gráfico que muestra que la expresión de IL15 se enriquece a través del proceso REP en TIL mbIL15 (constitutivo) generado con células alimentadoras K562 y que reciben coestimulación mediada por IL21 y 41BBL.

[0031] La FIG. 20 es un gráfico que muestra los TIL expandidos con mbIL15 generados con células alimentadoras K562 con coestimulación mediada por IL21 y 41BBL que tienen una proporción CD4:CD8 reducida a lo largo de REP. Por lo tanto, los TIL con mbIL15 expandidos en presencia de células alimentadoras K562 con estimulación tanto con IL21 como con 41BBL se enriquecen con células efectoras citotóxicas CD8+, en contraste con los TIL expandidos con mbIL15 generados con alimentadores de PBMC agrupados, alimentadores K562 no modificados o alimentadores K562 que expresan 41BBL en la ausencia de IL21. Las proporciones de CD4:CD8 se muestran en los días 8, 11, 15 y 18 de izquierda a derecha: alimentadores de PBMC, alimentadores K562-originales, alimentadores K562 + 41BBL, K562 + 41BBL con IL21 humana recombinante, alimentadores K562 + mbIL21, alimentadores K562 + 41BBL +mbIL21.

[0032] La FIG. 21 es un gráfico que muestra un mayor porcentaje de células TNF α +interferón γ + en TIL mbIL15 expandidos generados con células alimentadoras K562 que expresan tanto mbIL21 como 41BBL, en comparación con TIL mbIL15 generados con células alimentadoras PBMC o células alimentadoras K562 no modificadas. El mayor porcentaje de TIL TNF α +interferón γ + es indicativo de una polifuncionalidad mejorada en los TIL mbIL15 expandidos generados con células alimentadoras K562 que expresan tanto mbIL21 como 41BBL.

[0033] La FIG. 22 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de supervivencia de 10 días para TIL mbIL15 generados con células alimentadoras de PBMC, células alimentadoras K562 no

modificadas, células alimentadoras K562 que expresan solo mb41BBL, células alimentadoras K562 que expresan solo mbIL21, células alimentadoras K562 que expresan ambos 41BBL y mbIL21, y células alimentadoras K562 que expresan 41BBL en presencia de IL21 humana recombinante. Los TIL mbIL15 expandidos generados con células alimentadoras K562 y que recibieron coestimulación mediada por IL21 y 41BBL demostraron una supervivencia independiente del antígeno post-REP mejorada en comparación con los TIL mbIL15 generados con células alimentadoras PBMC o células alimentadoras K562 que no están modificadas o modificadas para expresar mbIL21 o 41BBL de forma independiente.

[0034] La FIG. 23 muestra la proporción relativa de subfamilias TCRV β en TIL no diseñados y TIL mbIL15 expandidos con alimentadores PBMC, alimentadores K562, alimentadores K562+mbIL21, alimentadores K562+41BBL, alimentadores K562+41BBL+mbIL21 o alimentadores K562+41BBL+rhIL21. Los TIL mbIL15 expandidos y los TIL no diseñados mantienen una distribución de subfamilia diversa independientemente de las células de alimentación o las condiciones.

[0035] La FIG. 24 muestra la expresión de PD1 en la superficie de TIL mbIL15, como seleccionada en células CD3⁺ vivas de izquierda a derecha en TIL no expandidos y TIL expandidos generados con alimentadores de PBMC, alimentadores K562-originales, alimentadores K562 + 41BBL, alimentadores K562 + 41BBL con IL21 humana recombinante, alimentadores K562 + mbIL21 y alimentadores K562+41BBL+mbIL21. La expresión de PD1 es más alta en TIL mbIL15 sin expandir, y la expansión de TIL mbIL15 con señalización mediada por 41BBL e IL21 produce TIL con una expresión de PD1 cercana al valor de referencia.

[0036] La FIG. 25 muestra el fenotipado que compara los TIL pre-REP (como se describe en el Ejemplo 1) con los TIL mbIL15 diseñados (como se describe en el Ejemplo 3). Los TIL pre-REP y post-REP se fenotiparon mediante citometría de flujo usando anticuerpos para CD3, CD4, CD8 y PD1 como se describe en el Ejemplo 13. Como se muestra en la FIG. 25A, la frecuencia de células T CD8⁺ es más alta y la frecuencia de células T CD4⁺ es más baja para los TIL mbIL15 post-REP en comparación con los TIL pre-REP correspondientes de los mismos donantes de TIL. En la FIG. 25B, los TIL mbIL15 post-REP expresan niveles más bajos de PD1 que los TIL pre-REP correspondientes de los mismos donantes de TIL. La FIG. 25C muestra los porcentajes de una población de células T reguladoras en TIL mbIL15, identificadas como células T CD3⁺ que se seleccionan como CD4⁺ y se clasifican además como células positivas dobles CD25 y FoxP3. Los TIL mbIL15 tienen una proporción reducida de células T reguladoras en comparación con los TIL preREP antes del paso de diseño.

[0037] La FIG. 26 muestra la expresión de antígenos MART-1 y gp100 asociados a melanoma conservados en la línea celular de melanoma A375 y en células de xenoinjerto (PDX) derivadas de pacientes (PDX163A, descritas en el Ejemplo 11), según se determina mediante citometría de flujo.

[0038] La FIG. 27 muestra el porcentaje de TIL positivos para tetrámeros de MART-1 y TIL positivos para tetrámeros de gp100 en TIL mbIL15 derivados de cuatro donantes de TIL distintos que tienen compatibilidad HLA con PDX 163A. Las poblaciones tetrámeras positivas indican que los TIL contienen una porción de células que son reactivas a los correspondientes antígenos asociados al melanoma, a través del locus HLA:A2:01. Los donantes indicados con un * se utilizaron en el estudio de eficacia de PDX como se muestra en la FIG. 30

[0039] La FIG. 28 muestra la producción de interferón gamma (IFN γ) después del cocultivo de TIL:células tumorales para predecir con precisión los donantes de TIL que son reactivos al PDX. Este ensayo *in vitro* demuestra que los donantes TIL 006, 39A y 41A son los donantes con la mayor cantidad de IFN γ producido en respuesta al PDX, lo que respalda su candidatura como donantes para examinar la eficacia *in vivo* como se describe en el Ejemplo 15.

[0040] La FIG. 29 es un esquema que muestra un modelo de xenoinjerto derivado de un paciente con melanoma ejemplar tratado con TIL expandidos que expresan mbIL15 unida operativamente a un CA2 DRD y al ligando CA2 ACZ.

[0041] La FIG. 30 muestra que el tratamiento de modelos de xenoinjerto derivados del paciente de acuerdo con el paradigma de tratamiento mostrado en la FIG. 29 da como resultado una eficacia antitumoral superior en comparación con el tratamiento con un TIL no diseñado y un tratamiento concomitante con IL2. Al final del protocolo de expansión rápida (REP), los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados (+/- acetazolamida (ACZ)) se transfirieron adoptivamente a ratones que tenían un PDX de melanoma humano. Se evaluaron los volúmenes tumorales medios (+/- SEM).

[0042] La FIG. 31A-B muestra que los TIL expresan mbIL15 unida operativamente a un CA2 DRD muestran una infiltración intratumoral significativamente mayor que los TIL no diseñados + IL2. La FIG. 31A son fotomicrografías de secciones tumorales teñidas inmunohistoquímicamente para CD3 humano y que muestran infiltración intratumoral de TIL en animales tratados con TIL no diseñados e IL2, animales tratados con TIL que expresan mbIL15 unida operativamente a un CA2 DRD en presencia y ausencia del ligando CA2 ACZ. La FIG. 31B son gráficos que muestran números de TIL en estroma + tumor, solo estroma y solo tumor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0043] Los procesos actuales para expandir TIL requieren una expansión TIL basada en interleucina 2 (IL2) (protocolo de expansión pre-rápida o pre-REP) seguida de un protocolo de expansión rápida (REP). Durante la etapa pre-REP, los TIL se cultivan con IL2 exógena y la presencia de antígenos tumorales en los trozos de tejido tumoral disecado. Por lo tanto, pre-REP requiere IL2 en ausencia de células alimentadoras. El paso REP generalmente requiere células alimentadoras adicionales para admitir la expansión rápida de TIL. La estimulación de células alimentadoras REP y TIL suele ser células mononucleares de sangre periférica (PBMC) irradiadas, dosis altas de IL2 y, opcionalmente, anticuerpo anti-CD3 (OKT3). La IL2 durante REP, sin embargo, tiende a agotar los TIL, dando como resultado un producto de TIL menos potente. Después de la REP *ex vivo* utilizando los procesos actuales, se administran TIL expandidos al paciente junto con IL2, que puede administrarse antes, durante y/o después de la administración de TIL, lo que lleva de nuevo a los TIL al agotamiento. El protocolo general actual para la terapia con TIL requiere la administración de dosis altas de IL2 a partir del mismo día o el día posterior a la infusión de TIL. A modo de ejemplo, un régimen de dosis altas de IL2 puede consistir en infusiones intravenosas en bolo cada ocho horas hasta tolerancia, durante un máximo de 14 dosis, nueve días de descanso y una repetición de otras 14 dosis. Otros regímenes de IL2 pueden consistir en un ciclo de cuatro días de administración de IL2 que se repite cada 28 días durante un máximo de cuatro ciclos o un régimen de IL2 PEGilada que dura hasta 21 días.

[0044] Además de promover el agotamiento de los TIL, las dosis altas de IL2 pueden causar efectos secundarios graves en pacientes con cáncer y, a menudo, no pueden ser toleradas por aquellos pacientes que necesitan ACT. Las presentes composiciones y métodos proporcionan una terapia con TIL que opcionalmente no requiere la administración de citocinas exógenas, como interleucinas como IL2, antes, durante o después de la administración con TIL. Dicho de otra manera, con el presente método, no hay necesidad de una terapia concomitante de interleucina con infusión de TIL. Por ejemplo, opcionalmente el sujeto no requiere la administración de IL2 exógena antes de la infusión de TIL, o durante 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días o 28 días después de la infusión de TIL. De manera similar, el presente método elimina la necesidad de infusión de IL2 modificada u otra citocina modificada (tal como IL7 o IL15 modificada). A modo de ejemplo, una interleucina modificada puede ser un mutante o un fragmento de IL2, IL7 o IL15 que retiene una o más funciones de IL2, IL7 o IL15 pero tiene una unión reducida a ciertos receptores, como los receptores que pueden promover la proliferación de células Treg CD4⁺ (p. ej., al tener una afinidad reducida).

[0045] Como se usa aquí, expansión se refiere a un aumento en número o cantidad. Cuando el término expansión se usa aquí en referencia a una población o subpoblación de TIL, el término se refiere a

una población de células después de REP. El tamaño de la población expandida (es decir, la cantidad de TIL después de REP) es mayor que una población no expandida (es decir, la cantidad de TIL antes de REP o la cantidad de TIL después de una REP fallida que resulta en ausencia de una expansión funcional de las células). Cuando se usa en referencia a una célula, como un TIL expandido, se refiere a una célula que se ha sometido y es el producto o resultado de REP (es decir, cultivo con células alimentadoras y factores estimulantes seleccionados) que resultó en la expansión funcional de la población TIL. Por lo tanto, como se usa aquí, un TIL expandido es la progenie de los TIL (por ejemplo, los TIL que se modifican para expresar mbIL15) cultivados bajo REP que dan como resultado una expansión funcional. De manera similar, un TIL no expandido como se usa aquí se refiere a un TIL que no ha experimentado una expansión funcional en REP. Sin embargo, dicho TIL no expandido puede haber pasado por un paso inicial pre-REP de IL2 o una REP fallida que resultó en la ausencia de una expansión funcional de las células.

[0046] Como se usa aquí, el término expansión puede usarse cuantitativamente, tal como se expande más, se expande menos, mayor expansión, menor expansión y similares. Dichos términos relativos generalmente se refieren a un aumento mayor o menor en el número de TIL en una población o subpoblación en comparación con una población o subpoblación diferente (por ejemplo, la expansión de un TIL modificado en comparación con la expansión de un TIL no modificado). Así, por ejemplo, una mayor expansión de una subpoblación de TIL modificados en comparación con los TIL no modificados significa un aumento mayor, como de 1,5 veces en comparación con un aumento de 1,25 veces, un aumento de 2 veces en comparación con un aumento de 1,5 veces, un aumento de 5 veces en comparación con un aumento de 2 veces, un aumento de 10 veces en comparación con un aumento de 5 veces, un aumento de 40 veces en comparación con un aumento de 10 veces, y similares de los TIL modificados en comparación con los TIL no modificados.

Linfocitos infiltrantes de tumores modificados (TIL)

[0047] Los TIL descritos en este documento están diseñados para expresar mbIL15. Por lo tanto, los TIL comprenden una secuencia de ácido nucleico exógeno que codifica IL15, un ácido nucleico exógeno que codifica un dominio transmembrana y, opcionalmente, un ácido nucleico exógeno que codifica un enlazador, bisagra y/o secuencia líder. IL15 generalmente no se expresa como una molécula unida a la membrana, por lo tanto, para expresar mbIL15, la IL15 debe estar asociada con un dominio transmembrana, por ejemplo, una proteína transmembrana o parte de una proteína transmembrana. IL15 como se usa aquí se refiere a un polipéptido IL15 (p. ej., UniProtKB - P40933

(IL15_HUMAN)). En una modalidad, la carga activa de IL15 comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 12) o un polipéptido que tiene al menos 85, 90, 95 o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 12 que retiene una o más funciones de IL15 (p. ej., promover la expansión de TIL modificados *in vivo*, promover la citotoxicidad de las células T y NK).

5 [0048] Ejemplos de proteínas transmembrana a partir de las cuales se pueden seleccionar dominios transmembrana y/o regiones bisagra para su uso en la unión de IL15 a la membrana incluyen MHC1, CD8, B7-1, CD4, CD28, CTLA-4, PD-1, IgG4 humana o una subunidad del receptor de IL15 (p. ej., IL15 α R). La IL15 se puede unir directamente al dominio transmembrana o se puede conectar a través de un enlazador y/o bisagra.

10 [0049] Se conocen en la técnica numerosas secuencias enlazadoras (enlazadores). Los enlazadores incluyen, sin limitación, enlazadores GS, enlazadores GSG y enlazadores GGSG. Estos enlazadores son repeticiones de la subunidad una o más veces. Así, un enlazador GS es un enlazador GS_n donde n es un número numérico que es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. De forma similar, un enlazador GSG es un enlazador GS_n en donde n es un número numérico que es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. Un
15 enlazador GGSG es un enlazador GGSG_n donde n es un número numérico que es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. La selección del enlazador o la longitud del enlazador pueden influir en el nivel de actividad de la carga activa de IL15 (es decir, la actividad basal en ausencia de ligando), y el enlazador y la longitud específicos se pueden elegir para maximizar el estado activado (por ejemplo, el nivel máximo de actividad) mientras se mantiene un nivel bajo de actividad basal y una capacidad de
20 respuesta del ligando (p. ej., fármaco).

[0050] Como otro ejemplo más, la bisagra específica puede permitir cambios conformacionales y, por lo tanto, influir en la capacidad de respuesta del ligando y, por lo tanto, se elige para dar como resultado un rango dinámico suficiente para obtener un rango deseado de abundancia de carga activa y actividad biológica (es decir, un rango de actividad de carga activa aceptable que corresponde a la
25 variación en el ligando de cero o mínima a máxima saturación).

[0051] Una secuencia bisagra es una secuencia corta de aminoácidos que facilita la flexibilidad entre los componentes conectados. La secuencia bisagra puede ser cualquier secuencia adecuada derivada u obtenida a partir de cualquier molécula adecuada. La secuencia bisagra puede derivar de toda o parte de una región bisagra de inmunoglobulina (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), es decir, la secuencia que
30 se encuentra entre los dominios CH1 y CH2 de una inmunoglobulina (p. ej., una bisagra Fc de IgG4), o las regiones extracelulares de proteínas de membrana de tipo 1 tales como CD8 α , CD4, CD28 y CD7, que pueden ser una secuencia de tipo salvaje o un derivado de la misma. Algunas regiones

bisagra incluyen un dominio CH3 de inmunoglobulina o tanto un dominio CH3 como un dominio CH2. En algunas modalidades, la bisagra se deriva de un dominio transmembrana.

[0052] Los TIL modificados descritos en el presente documento comprenden opcionalmente además una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica una cola intracelular/citoplásmica o transmembrana. Opcionalmente, la cola intracelular/citoplásmica o transmembrana es una cola intracelular B7.1, CD8, CD40L, LIGHT o NKG2C.

[0053] Los TIL modificados descritos en el presente documento comprenden además opcionalmente una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica una secuencia señal (secuencia líder). Ejemplos de secuencias líder incluyen MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC (SEQ ID NO:10), MDWTWILFLVAAATRVHS (IgEss; SEQ ID NO:58), MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEA (IL15 LS nativa; SEQ ID NO:59), MGLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMA (CD34: SEQ ID NO:60).

[0054] Además, cierto TIL comprende además una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica un DRD. IL15 es importante para la proliferación de células T y NK, pero la exposición continua a niveles altos de IL15 puede conducir al agotamiento de estas células *in vivo*, lo que disminuiría la eficacia de los TIL que expresan IL15. Por lo tanto, en ciertas modalidades, un DRD se une operativamente a la mbIL15 para proporcionar la regulación de la actividad de IL15 durante la inmunoterapia con TIL.

[0055] Los dominios sensibles a fármacos (DRD) son polipéptidos que regulan la expresión o el nivel de actividad de una carga activa. Aunque se denominan dominios sensibles a fármacos, el ligando al que responde un DRD no necesita ser una molécula pequeña aprobada o un "fármaco" biológico. Más específicamente, los DRD interactúan con un ligando de tal manera que, cuando el DRD se une operativamente a una carga activa, confiere una regulación reversible dependiente del ligando de una característica de la carga activa (por ejemplo, actividad o abundancia). Patente de EE. UU. n.º 9,487,787 y 10,137,180, publicación de EE. UU. n.º: 2019/0192691; 2020/0101142; 2020/0172879; 2021/0069248 y las solicitudes de patente de EE. UU. n.º: 17,251,635; y 17/288,373, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad por referencia en la presente, proporcionan ejemplos de DRD (y sus ligandos emparejados) según esta descripción. Algunos de estos y otros ejemplos de DRD adecuados para su uso según esta descripción también se proporcionan en otra parte de esta memoria descriptiva.

Los DRD, a modo de ejemplo, se pueden elegir entre FKBP (SEQ ID NO: 4), ecDHFR (SEQ ID NO: 1), hDHFR (SEQ ID NO: 2), ER (SEQ ID NO: 9), PDE5 de longitud completa (SEQ ID NO: 6), dominio de unión al ligando PDE5 (SEQ ID NO: 5) y CA2 (SEQ ID NO: 7) o una porción de cualquiera de los anteriores que mantiene la función DRD o una secuencia de aminoácidos que tiene

al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 6, 7 o 9 o la parte funcional de DRD del mismo. Una o más mutaciones (incluidos truncamientos, sustituciones y eliminaciones) en la secuencia de aminoácidos de FKBP, ecDHFR, hDHFR, ER, PDE5 y CA2, por ejemplo, pueden ser ventajosas para desestabilizar aún más el DRD. Los DRD adecuados, que pueden denominarse dominios desestabilizadores o dominios de unión a ligandos, también se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, WO2018/161000; WO2018/231759; WO2019/241315; US8,173,792; US8,530,636; WO2018/237323; WO2017/181119; US2017/0114346; US2019/0300864; WO2017/156238; Miyazaki et al., J Am Chem Soc, 134:3942 (2012); Banaszynski et al. (2006) Cell 126:995-1004; Stankunas, K. et al. (2003) Mol. Cell 12:1615-1624; Banaszynski et al. (2008) Nat. Med. 14:1123-1127; Iwamoto et al. (2010) Chem. Biol. 17:981-988; Armstrong et al. (2007) Nat. Methods 4:1007-1009; Madeira da Silva et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:7583-7588; Pruett-Miller et al. (2009) PLoS Genet. 5:e1000376; y Feng et al. (2015) Elife 4:e10606, los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[0056] Sin pretender estar limitado por la teoría, se cree que los DRD son polipéptidos inestables que se degradan en ausencia de su correspondiente ligando estabilizador (también denominado ligando emparejado o ligando), pero cuya estabilidad se rescata al unirse al ligando estabilizador. Debido a que la unión del ligando al DRD es reversible, la eliminación posterior del ligando da como resultado que el DRD se despliegue, se vuelva inestable y, en última instancia, sea marcado para su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma ("UPS"). En consecuencia, se cree que cuando un DRD está unido operativamente a una carga activa como mbIL15, la construcción completa (es decir, DRD más IL15) en sí misma se vuelve inestable y degradada por el UPS. Sin embargo, en presencia del ligando emparejado, la construcción se estabiliza y la carga activa de mbIL15 permanece disponible. Además, se cree que la naturaleza condicional de la estabilidad de DRD permite un cambio rápido y sin perturbaciones de proteína estable a sustrato de UPS inestable y puede facilitar la regulación o modulación del nivel de actividad de una carga activa y/o la modulación del nivel de actividad de una carga activa.

[0057] Debido a que la abundancia y disponibilidad de una carga activa están relacionadas con la actividad de una carga activa, para los fines de esta descripción, los términos abundancia, disponibilidad, actividad y la frase abundancia y/o actividad (y de manera similar nivel de abundancia, nivel de disponibilidad, nivel de actividad y nivel de abundancia y/o actividad) se usan indistintamente a lo largo de esta descripción y generalmente se los denomina actividad, a menos que se indique explícitamente lo contrario o no tenga sentido en el contexto. Además, las medidas de abundancia o

disponibilidad se usan como sustitutos del nivel de actividad y pueden usarse aquí para reflejar el nivel de actividad. En consecuencia, los cambios en la abundancia o disponibilidad de una carga activa en presencia de una cantidad efectiva de ligando en comparación con la ausencia de ligando sirven opcionalmente como un indicador para medir los cambios en el nivel de actividad.

5 [0058] En el presente documento se describen numerosos DRD, pero un experto en la técnica podría identificar DRD adicionales. A modo de ejemplo, los DRD pueden identificarse utilizando la selección de bibliotecas y el diseño guiado por estructuras para seleccionar la variante de DRD óptima con suficiente inestabilidad en ausencia del ligando y suficiente estabilidad en presencia del ligando. Se puede generar una biblioteca de variantes mediante el cribado de mutagénesis aleatoria mediante
10 la transducción de células (p. ej., células Jurkat) con candidatos DRD mutantes. Para producir una biblioteca enriquecida, las células con las características deseadas (actividad/expresión basal baja y alto rango dinámico) se seleccionan analizando la expresión de un gen indicador en un rango de concentraciones de ligando. A continuación, se producen clones de células individuales y se caracterizan para identificar DRD candidatos. El DRD es capaz de afectar una característica, por
15 ejemplo, la abundancia o el nivel de actividad, de una carga activa a la que está unido operativamente. Además, uno o más DRD interactúan con un ligando para proporcionar una regulación reversible dependiente del ligando de la característica de la carga activa. Los DRD descritos en el presente documento responden a un ligando emparejado. Opcionalmente, los DRD responden a un ligando emparejado que es un fármaco de molécula pequeña, como una molécula pequeña aprobada por la
20 FDA. Sin embargo, un experto en la técnica puede seleccionar el DRD y su ligando emparejado para satisfacer las necesidades específicas del sistema. Los ejemplos de ligandos estabilizadores y sus usos para DRD específicos descritos en este documento se muestran en la Tabla 1 y en la Patente de EE. UU. n.º 9,487,787 presentada el 33 de marzo de 2012, la Patente de EE. UU. n.º 10,137,180, presentada el 6 de septiembre de 2013, solicitud PCT n.º PCT/US2018/037005, presentada el 12 de
25 junio, 2018, la solicitud PCT n.º PCT/US2019/036654 presentada el 12 de junio de 2019, solicitud PCT n.º PCT/US2019/057698 presentada el 23 de octubre de 2019, solicitud PCT n.º PCT/US2020/021596 presentada en marzo 6, 2020 y la solicitud de EE. UU. n.º 16/558,224 presentada el 2 de septiembre de 2019, las descripciones de todas las solicitudes mencionadas anteriormente se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

30

Tabla 1. Listado de DRD y ligandos ejemplares

Proteína DRD	SEQ ID NO:	Ligandos ejemplares
<i>E. coli</i> dihidrofolato reductasa (ecDHFR) (Uniprot ID: P0ABQ4)	1	Metotrexato (MTX) Trimetoprima (TMP)
Dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) (Uniprot ID: P00374)	2	Metotrexato (MTX) Trimetoprima (TMP)
FKBP humana (proteína de unión a FK506) (Uniprot ID: P62942)	4	Shield-1
Fosfodiesterasa 5 (PDE5), dominio de unión al ligando (Uniprot ID: Uniprot ID O76074)	5	Sildenafil; Vardenafilo; Tadalafilo
Fosfodiesterasa 5 (PDE5), de longitud completa (Uniprot ID: Uniprot ID O76074)	6	Sildenafil; Vardenafilo; Tadalafilo
Anhidrasa carbónica II (CA2) (Uniprot ID: P00918)	7	Celecoxib Acetazolamida
Receptor de estrógeno humano (ER) (Identificación Uniprot: P03372.2)	9	Bazedoxifeno Raloxifeno

[0059] Opcionalmente, un DRD de la presente descripción puede derivar de la anhidrasa carbónica humana 2 (hCA2), que es un miembro de las anhidrasas carbónicas, una superfamilia de metaloenzimas. Un DRD de la presente descripción se puede derivar de los aminoácidos 1-260 de CA2 (Uniprot ID: P00918) (SEQ ID NO: 7). Opcionalmente, los DRD se derivan de CA2 que comprende los aminoácidos 2-260 de la secuencia original de CA2 (p. ej., los aminoácidos 2-260). Esto se denomina en el presente documento mutación CA2 M1del (CA2; SEQ ID NO: 55). Opcionalmente, un DRD de la presente descripción comprende una región de la totalidad de la anhidrasa carbónica humana 2, y además comprende una o más mutaciones relativas a la secuencia de longitud completa seleccionada de M1del, L156H y S56N. Opcionalmente, el DRD se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 26, 55, 56 y 57.

[0060] A modo de ejemplo, el TIL modificado puede comprender un ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana que es de extremo C para el componente polipeptídico de IL15 y una cola intracelular que es de extremo C para el dominio transmembrana.

[0061] En la Tabla 2 se muestran ejemplos no limitantes de construcciones y componentes de construcciones para los TIL modificados. La construcción denominada OT-IL15-292 incluye desde el extremo N una secuencia señal, IL15, enlazador (GS)₁₅, una región bisagra, una región transmembrana y una cola intracelular. La construcción denominada OT-IL15-293 incluye un DRD (específicamente, un CA2 DRD (M1del, L156H)) en el extremo C.

Tabla 2: Ejemplos de construcciones y componentes de construcciones

Descripción	Secuencia de aminoácidos (AA)	Secuencia de ácido nucleico (NA)	Aminoácido SEQ ID NO	Ácido nucleico o SEQ ID NO
Secuencia líder	MDMRVPA QLLGLLLL WLSGARC	ATGGACATGCGGGTGCCTGCAC AACTTCTGGGCCTGCTGTTGTTG TGGCTGTCTGGAGCCCGGTGT	10	11
Interleucina-15 (IL15)	NWVNVISD LKKIEDLIQ SMHIDATL YTESDVHP SCKVTAMK CFLLELQVI SLESGDASI HDTVENLII LANNSLSS NGNVTESG CKECEELE EKNIKEFLQ SFVHIVQM FINTS	AATTGGGTAAATGTTATCAGTG ATCTCAAGAAGATAGAGGATCT CATCCAGTCCATGCATATTGATG CCACGCTGTACACAGAAAGCGA TGTGCATCCTAGCTGTAAGGTG ACAGCGATGAAGTGTTTTCTTTT GGAGCTGCAGGTAATTAGTCTT GAGTCCGGCGATGCCAGCATTC ATGATACCGTAGAAAACCTTGAT TATCCTGGCCAACAATTCTCTGT CCTCAAACGGAAACGTAACCGA GAGCGGTTGTAAAGAATGTGAA GAACTGGAAGAAAAGAACATCA AGGAGTTTCTGCAATCATTCGTT CACATCGTACAAATGTTTCATAA ATACGTCA	12	13
Enlazador (GS) ₁₅	GSGSGSGS GSGSGSGS	GGATCTGGTTCTGGTTCCGGAA GTGGATCTGGTTCAGGGTCCGG	14	15

Descripción	Secuencia de aminoácidos (AA)	Secuencia de ácido nucleico (NA)	Aminoácido SEQ ID NO	Ácido nucleico o SEQ ID NO
	GSGSGSGS GSGSGS	TAGTGGATCTGGGTCAGGAAGT GGAAGCGGTAGTGGGTCTGGAT CT		
Bisagra	KQEHFPDN	AAACAAGAGCACTTTCCTGATA AC	16	17
Transmembrana	LLPSWAITL ISVNGIFVI CCL	CTGTTGCCGAGCTGGGCGATTA CGCTTATCAGTGTAACGGCAT CTTTGTAATATGCTGTCTG	18	19
Cola intracelular	TYCFAPRC RERRRNER LRRESVRP V	ACCTACTGCTTCGCACCAAGGT GCCGGGAGAGAAGGAGAAATG AAAGACTGAGAAGGGAGAGCGT GAGACCTGTG	20	21
Cola intracelular	TYCFAPRC RERARNER LRRETVRP V	ACCTACTGCTTCGCACCAAGGT GCCGGGAGAGAGCAAGAAATG AAAGACTGAGAAGGGAGACCGT GAGACCTGTG	22	23
Enlazador (GS)	GS	GGATCC	24	25
Dominio de respuesta a fármacos (CA2 (M1del, L156H))	SHHWGYG KHNGPEH WHKDFPIA KGERQSPV DIDHTAK YDPSLKPLS VSYDQATS LRILNNGH AFNVEFDD SQDKAVLK	TCCCATCACTGGGGGTACGGCA AACACAACGGACCTGAGCACTG GCATAAGGACTTCCCCATTGCC AAGGGAGAGCGCCAGTCCCCTG TTGACATCGACACTCATAACAGC CAAGTATGACCCTTCCCTGAAG CCCCTGTCTGTTTCCTATGATCA AGCAACTTCCCTGAGAATCCTC AACAATGGTCATGCTTTCAACGT GGAGTTTGATGACTCTCAGGAC	26	27

Descripción	Secuencia de aminoácidos (AA)	Secuencia de ácido nucleico (NA)	Aminoácido SEQ ID NO	Ácido nucleico o SEQ ID NO
	GGPLDGTY RLIQFHFH WGSLDGQ GSEHTVDK KDSIKTKG KSADFTNF DPRGLLPES LDYWTYPG SLTTPPLLE CVTWIVLK EPISVSSEQ VLKFRKLN FNGEPEPE ELMVDNW RPAQPLKN RQIKASFK	AAAGCAGTGCTCAAGGGAGGAC CCCTGGATGGCACTTACAGATT GATTCAGTTTCACTTTCCTGGG GTTCACTTGATGGACAAGGTTC AGAGCATACTGTGGATAAAAAG AAATATGCTGCAGAACTTCACTT GGTTCCTGGAACACCAAATAT GGGGATTTTGGGAAAGCTGTGC AGCAACCTGATGGACTGGCCGT TCTAGGTATTTTTTTGAAGGTTG GCAGCGCTAAACCGGGCCATCA GAAAGTTGTTGATGTGCTGGATT CCATTAAAACAAAGGGCAAGAG TGCTGACTTCACTAACTTCGATC CTCGTGGCCTCCTTCCTGAATCC CTGGATTACTGGACCTACCCAG GCTCACTGACCACCCCTCCTCTT CTGGAATGTGTGACCTGGATTGT GCTCAAGGAACCCATCAGCGTC AGCAGCGAGCAGGTGTTGAAAT TCCGTAACTTAACTTCAATGGG GAGGGTGAACCCGAAGAACTGA TGGTGGACAACCTGGCGCCCAGC TCAGCCACTGAAGAACAGGCAA ATCAAAGCTTCCTTCAAA		
OT-IL15-292	MDMRVPA QLLGLLLL WLSGARN	ATGGACATGCGGGTGCCTGCAC AACTTCTGGGCCTGCTGTTGTTG TGGCTGTCTGGAGCCCGGTGTA	28	29

Descripción	Secuencia de aminoácidos (AA)	Secuencia de ácido nucleico (NA)	Aminoácido SEQ ID NO	Ácido nucleico o SEQ ID NO
	WVNVISDL KKIEDLIQS MHIDATLY TESDVHPS CKVTAMK CFLLELQVI SLESGDASI HDTVENLII LANNSLSS NGNVTESG CKECEELE EKNIKEFLQ SFBVHIVQM FINTSGSGS GSGSGSGS GSGSGSGS GSGSGSGS GSKQEHFP DNLLPSWA ITLISVNGIF VICCLTYCF APRCRERR RNERLRRE SVRPVGS	ATTGGGTAAATGTTATCAGTGAT CTCAAGAAGATAGAGGATCTCA TCCAGTCCATGCATATTGATGCC ACGCTGTACACAGAAAGCGATG TGCATCCTAGCTGTAAGGTGAC AGCGATGAAGTGTTTTCTTTTGG AGCTGCAGGTAATTAGTCTTGA GTCCGGCGATGCCAGCATTCAT GATACCGTAGAAAACCTTGATTA TCCTGGCCAACAATTCTCTGTCC TCAAACGGAAACGTAACCGAGA GCGGTTGTAAAGAATGTGAAGA ACTGGAAGAAAAGAACATCAAG GAGTTTCTGCAATCATTCGTTCA CATCGTACAAATGTTTCATAAAT ACGTCAGGATCTGGTTCTGGTTC CGGAAGTGGATCTGGTTCAGGG TCCGGTAGTGGATCTGGGTCAG GAAGTGGAAGCGGTAGTGGGTC TGGATCTAAACAAGAGCACTTT CCTGATAACCTGTTGCCGAGCTG GGCGATTACGCTTATCAGTGTA AACGGCATCTTTGTAATATGCTG TCTGACCTACTGCTTCGCACCAA GGTGCCGGGAGAGAAGGAGAA ATGAAAGACTGAGAAGGGAGA GCGTGAGACCTGTGGGATCC		

Descripción	Secuencia de aminoácidos (AA)	Secuencia de ácido nucleico (NA)	Aminoácido SEQ ID NO	Ácido nucleico o SEQ ID NO
OT-IL15-293	MDMRVPA QLLGLLLL WLSGARCN WVNVISDL KKIEDLIQS MHIDATLY TESDVHPS CKVTAMK CFLLELQVI SLESGDASI HDTVENLII LANNSLSS NGNVTESG CKECEELE EKNIKEFLQ SFBVHIVQM FINTSGSGS GSGSGSGS GSGSGSGS GSGSGSGS GSKQEHFP DNLLPSWA ITLISVNGIF VICCLTYCF APRCRERR RNERLRRE SVRPVGSS HHWGYGK	ATGGACATGCGGGTGCCTGCAC AACTTCTGGGCCTGCTGTTGTTG TGGCTGTCTGGAGCCCGGTGTA ATTGGGTAAATGTTATCAGTGAT CTCAAGAAGATAGAGGATCTCA TCCAGTCCATGCATATTGATGCC ACGCTGTACACAGAAAGCGATG TGCATCCTAGCTGTAAGGTGAC AGCGATGAAGTGTTTTCTTTTGG AGCTGCAGGTAATTAGTCTTGA GTCCGGCGATGCCAGCATTCAT GATACCGTAGAAAACCTTGATTA TCCTGGCCAACAATTCTCTGTCC TCAAACGGAAACGTAACCGAGA GCGGTTGTAAAGAATGTGAAGA ACTGGAAGAAAAGAACATCAAG GAGTTTCTGCAATCATTCGTTCA CATCGTACAAATGTTTCATAAAT ACGTCAGGATCTGGTTCTGGTTC CGGAAGTGGATCTGGTTCAGGG TCCGGTAGTGGATCTGGGTCAG GAAGTGGAAGCGGTAGTGGGTC TGGATCTAAACAAGAGCACTTT CCTGATAACCTGTTGCCGAGCTG GGCGATTACGCTTATCAGTGTA AACGGCATCTTTGTAATATGCTG TCTGACCTACTGCTTCGCACCAA GGTGCCGGGAGAGAAGGAGAA	30	31

Descripción	Secuencia de aminoácidos (AA)	Secuencia de ácido nucleico (NA)	Aminoácido SEQ ID NO	Ácido nucleico o SEQ ID NO
	HNGPEHW HKDFPIAK GERQSPVDI DHTAKYD PSLKPLSVS YDQATSLR ILNNGHAF NVEFDDSQ DKAVLKG GPLDGTyr LIQFHFHW GSLDGQGS EHTVDKKD SIKTKGKS ADFTNFDp RGLLPESL DYWTYPGS LTPPLLEC VTWIVLKE PISVSSEQV LKFRKLNF NGEGEPEE LMVDNWR PAQPLKNR QIKASFK	ATGAAAGACTGAGAAGGGAGA GCGTGAGACCTGTGGGATCCTC CCATCACTGGGGGTACGGCAAA CACAACGGACCTGAGCACTGGC ATAAGGACTTCCCCATTGCCAA GGGAGAGCGCCAGTCCCCTGTT GACATCGACACTCATACAGCCA AGTATGACCCTTCCCTGAAGCCC CTGTCTGTTTCCTATGATCAAGC AACTTCCCTGAGAATCCTCAAC AATGGTCATGCTTTCAACGTGG AGTTTGATGACTCTCAGGACAA AGCAGTGCTCAAGGGAGGACCC CTGGATGGCACTTACAGATTGA TTCAGTTTCACTTTCACTGGGGT TCACTTGATGGACAAGGTTcAG AGCATACTGTGGATAAAAAGAA ATATGCTGCAGAACTTCACTTGG TTCACTGGAACACCAAATATGG GGATTTTGGGAAAGCTGTGCAG CAACCTGATGGACTGGCCGTTCT AGGTATTTTTTTGAAGGTTGGCA GCGCTAAACCGGGCCATCAGAA AGTTGTTGATGTGCTGGATTCCA TTAAAACAAAGGGCAAGAGTGC TGACTTCACTAACTTCGATCCTC GTGGCCTCCTTCCTGAATCCCTG GATTACTGGACCTACCCAGGCT		

Descripción	Secuencia de aminoácidos (AA)	Secuencia de ácido nucleico (NA)	Aminoácido SEQ ID NO	Ácido nucleico o SEQ ID NO
		CACTGACCACCCCTCCTCTTCTG GAATGTGTGACCTGGATTGTGCT CAAGGAACCCATCAGCGTCAGC AGCGAGCAGGTGTTGAAATTCC GTAAACTTAACTTCAATGGGGA GGGTGAACCCGAAGAACTGATG GTGGACAACCTGGCGCCCAGCTC AGCCACTGAAGAACAGGCAAAT CAAAGCTTCCTTCAA		

[0062] Para crear una citocina anclada a la membrana como IL15 operativamente unida a un DRD que puede estar regulado con un rango dinámico suficiente (es decir, un rango de actividad aceptable que corresponde a la variación en el ligando desde cero hasta la saturación máxima), el polipéptido incluye opcionalmente desde el extremo N la carga activa (IL15), un enlazador, una bisagra, una región transmembrana, una cola y un DRD. La cola y/o enlazador y la longitud de la cola y del enlazador pueden influir en el nivel de actividad en ausencia de ligando y, en algunas modalidades, la cola y/o enlazador y la longitud específicos se eligen para maximizar el estado activado (p. ej., el nivel máximo de actividad) mientras se mantiene bajo nivel de actividad de referencia y capacidad de respuesta del ligando. La bisagra específica puede permitir cambios de conformación y, por lo tanto, influir en la capacidad de respuesta del ligando en un rango dinámico suficiente.

[0063] Los TIL modificados que expresan mbIL15 como se describe aquí tienen una serie de ventajas. Primero, los TIL modificados pueden expandirse *in vitro* en presencia de células alimentadoras (tales como células alimentadoras K562 que expresan 41BBL e IL21 (opcionalmente, mbIL21)). Significativamente, después del paso pre-REP, los TIL modificados pueden expandirse *in vitro* en ausencia de citocina exógena y los TIL expandidos se activan y pueden expandirse aún más *in vivo* sin la administración de una citocina exógena, como IL2.

[0064] Una población de TIL que comprende una pluralidad de TIL modificados puede incluir una subpoblación de TIL que ha sufrido expansión (es decir, REP con células alimentadoras y moléculas estimuladoras, como IL21 y 41BBL). Los TIL expandidos demuestran una serie de ventajas. Por

ejemplo, los TIL expandidos que se han sometido a REP son capaces de sobrevivir en un cultivo que carece de células alimentadoras. Más particularmente, los TIL diseñados para expresar mbIL15 pueden sobrevivir más tiempo que las células no diseñadas en ausencia de una citocina exógena, por ejemplo, una interleucina como IL2. Los TIL diseñados para expresar mbIL15 ligada operativamente a un DRD sobreviven mejor en presencia del ligando pero en ausencia de citocina exógena que los TIL no diseñados. Además, una población de TIL expandidos muestra una expansión preferencial de ciertos TIL y, por lo tanto, menos o más subtipos de TIL en comparación con una población de control de TIL no expandidos. Una población de control de TIL no expandidos como se usa en el presente documento se refiere a TIL que se modifican de manera similar a los TIL expandidos pero que no se han sometido a REP.

[0065] Una población de TIL expandidos, por ejemplo, tiene una mayor proporción de células CD8+, una menor proporción de células CD4+ y una proporción CD4+:CD8+ más baja en comparación con una población de control de TIL no expandidos. Los TIL CD8+ se consideran clave en la eliminación de células cancerosas mediante la liberación de moléculas citotóxicas y citocinas, y se ha encontrado que la cantidad de TIL CD8+ en comparación con la cantidad de TIL CD4+ (es decir, la relación CD4+:CD8+) en un tumor se correlaciona con un resultado positivo.

[0066] Además, en ciertas modalidades, la población de TIL expandidos tiene una proporción menor de células T_{reg} CD4 en comparación con la proporción de células T_{reg} en una población de control de TIL no expandidos. Las células T_{reg} CD4 desempeñan un papel en la tolerancia inmunológica y la homeostasis inmunitaria al suprimir las reacciones inmunitarias. Por lo tanto, es deseable una menor proporción de células T_{reg} en inmunoterapia, como ACT con TIL.

[0067] La población de TIL expandidos también muestra menos TIL agotados y más TIL polifuncionales. La población de TIL expandidos tiene una proporción menor de células PD1+ en comparación con la proporción de células PD1+ en una población de control de TIL no expandidos. Además, la población de TIL expandidos tiene una mayor proporción de células que producen para ambos el factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interferón γ (IFN γ) en comparación con la proporción de TIL que producen tanto TNF α como IFN γ en una población de control de TIL no expandidos.

[0068] En el presente documento se proporciona una población mixta de TIL que comprende una subpoblación de TIL no modificados y una subpoblación de TIL modificados que comprende una mbIL15, que está opcionalmente unida operativamente a un DRD. La subpoblación de TIL modificados se expande en presencia de células alimentadoras K562 que expresan 41BBL e IL21 (por ejemplo, mbIL21). La subpoblación de TIL modificados se expande más que la subpoblación de TIL

no diseñados en presencia de células alimentadoras K562 que expresan 41BBL e IL21. Esta expansión preferencial de TIL modificados ocurre en ausencia de IL2 exógena durante el REP.

5 Métodos para fabricar linfocitos infiltrantes de tumores modificados (TIL)

[0069] Los TIL se pueden aislar a partir de un tumor o una biopsia del mismo utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las piezas del tumor (p. ej., de 1 a 5 mm de tamaño) se someten a digestión enzimática (p. ej., colagenasa (0,5 a 5 mg/ml), ADNasa, o hialuronidasa) o disociación mecánica. Las células disociadas se incuban en medios de cultivo celular en condiciones que favorecen la proliferación de TIL sobre otras células (es decir, en presencia de IL2). Esta etapa es el paso pre-REP. En el paso pre-REP, las células se pueden cultivar (p. ej., de 3 a 28 días) en presencia de 2000-8000 IU/ml de IL2 (p. ej., 6000 IU/ml) y, opcionalmente, en presencia de suero AB humano inactivado. En algunas modalidades, las células se cultivan durante un período de días, generalmente de 3 a 28 días. En algunas modalidades, esta población de células pre-REP se cultiva durante un período de 7 a 21 días.

[0070] Los TIL pre-REP pueden criopreservarse. Las células criopreservadas se descongelan y descansan antes de la activación. Las células se pueden activar utilizando, por ejemplo, OKT3 unido a placa, OKT3 soluble, anticuerpos coestimuladores (p. ej., anticuerpos contra CD28 o 41BB) +OKT3, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a perlas o fragmentos, etc. El paso de activación puede ser de 1 a 2 días o más. Después de la activación, uno o más TIL se diseñan para expresar una interleucina 15 unida a la membrana (mbIL15) mediante la transducción de uno o más TIL con un vector que tiene una primera secuencia de ácido nucleico que codifica IL15 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana. Opcionalmente, el vector comprende además una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un péptido señal, un enlazador, una bisagra, una cola intracelular o un DRD. El vector se puede configurar de varias maneras para lograr la mbIL15 deseada. Los ejemplos de construcciones de ácidos nucleicos incluyen las secuencias de ácidos nucleicos que codifican OT-IL15-293 y OT-IL15-292, con y sin DRD, respectivamente. Por lo tanto, el vector comprende opcionalmente SEQ ID NO: 29, 31, 53 o 54. El vector incluye o codifica elementos adicionales, como una secuencia promotora y otros elementos reguladores (potenciadores, elementos de control de la traducción (p. ej., IRES) y elementos que controlan la vida media). El

vector opcionalmente comprende o puede comprender secuencias de ácido nucleico que codifican elementos que controlan la traducción (p. ej., IRES, WPRE y similares).

[0071] El vector puede elegirse entre vectores virales, plásmidos, cósmidos y cromosomas artificiales. A modo de ejemplo, el vector puede ser un vector viral, como un vector lentiviral o un vector retroviral. A modo de ejemplo, el vector viral puede ser un vector lentiviral pseudotipado de envoltura de mandril que comprende un ácido nucleico que codifica IL15 y un ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana. Tras la expresión, la IL15 se asocia con el dominio transmembrana y está unida a la membrana por el dominio transmembrana.

[0072] Los vectores se transfieren opcionalmente a las células mediante métodos no virales como agujas, electroporación, sonoporación, hidroporación, portadores químicos (como partículas inorgánicas (por ejemplo, fosfato de calcio, sílice, oro)) y/o métodos químicos. En algunas modalidades, se usan agentes biodegradables sintéticos o naturales para la administración, como lípidos catiónicos, nanoemulsiones de lípidos, nanopartículas, vectores basados en péptidos o vectores basados en polímeros.

[0073] El ácido nucleico que codifica IL15 puede ser un ácido nucleico genómico o no genómico. Es decir, el sistema de administración usado para administrar el ácido nucleico que codifica IL15 puede integrarse en el genoma del TIL o puede no estar integrado (es decir, episomal) o transferirse como ARN al citoplasma usando vectores de ARN.

[0074] Los TIL que comprenden mbIL15 se expanden en el paso REP (p. ej., 5-21 días o cualquier cantidad intermedia, incluidos 7-14 días). Como se describe más detalladamente en los Ejemplos, los TIL modificados para expresar IL15 se expanden en presencia de células alimentadoras K562 así como 41BBL e IL21. En ciertas modalidades, las células alimentadoras K562 están diseñadas para expresar 41BBL e IL21, que pueden ser IL21 unidas a la membrana (mbIL21). Este método de expandir los TIL de mbIL15 reduce o elimina la necesidad de citocinas exógenas como IL2, IL7 o IL15 durante el REP. En algunas modalidades, los TIL modificados se cultivan con células K562 modificadas para expresar mbIL21 y 41BBL en una proporción de 1:1 a 100:1, 1:1 a 50:1, 1:1 a 20:1, 1:1 a 10:1, o 2:1 a 5:1 (TIL: célula alimentadora).

[0075] Antes de que se utilicen células alimentadoras en el presente método, primero se vuelven incompetentes para la replicación. En la técnica se conocen varios medios para tratar las células alimentadoras. Dichos métodos incluyen irradiación (p. ej., con rayos gamma o X), tratamiento con mitomicina-C, pulsos eléctricos, fijación química suave (p. ej., con formaldehído o glutaraldehído) o transducción de las células alimentadoras con un gen suicida. En algunas modalidades, las células

alimentadoras son células humanas. A modo de ejemplo, la irradiación puede ser de 25-300 Gy suministrada, por ejemplo, por una fuente de cesio o una fuente de rayos X.

[0076] Después de la expansión en las células alimentadoras, los TIL se aíslan opcionalmente de las células alimentadoras. Como se usa aquí, el término aislamiento no pretende sugerir que los TIL estén completamente libres de otros componentes, tales como células alimentadoras, solo sugiere que los TIL están relativamente libres de células alimentadoras.

[0077] En el presente documento se proporciona un método para hacer un TIL, una población de TIL o una subpoblación de TIL que comprenden mbIL15. También se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican mbIL15, vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico que codifica mbIL15, células alimentadoras K562 incompetentes para la replicación que se modifican para expresar 41BBL e IL21, y TIL elaborados mediante el método descrito en este documento.

Composiciones farmacéuticas

[0078] En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica adecuada para su uso en ACT. La composición farmacéutica puede comprender TIL, como TIL expandidos, y un portador farmacéuticamente aceptable. La población de TIL en la composición farmacéutica es opcionalmente una población mixta de TIL que comprende una subpoblación de TIL modificados (es decir, TIL diseñados para expresar IL15) y TIL no modificados (es decir, TIL no transducidos o no diseñados).

[0079] El término portador significa un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando se combina con un compuesto o células, ayuda o facilita la preparación, el almacenamiento, la administración, la eficacia, la selectividad o cualquier otra característica del compuesto o las células para su uso o finalidad prevista. Por ejemplo, se puede seleccionar un portador para minimizar cualquier degradación de los TIL y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos farmacéuticos biocompatibles estériles, que incluyen, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, líquido cefalorraquídeo artificial, dextrosa y agua. Por farmacéuticamente aceptable se entiende un material que no es indeseable desde el punto de vista biológico o de otro tipo, que puede administrarse a un individuo junto con la población de TIL o TIL sin causar efectos biológicos inaceptables o interactuar de manera perjudicial con los TIL.

[0080] Opcionalmente, la composición farmacéutica comprende además un crioprotector (crioconservante). Dicho crioprotector sirve para evitar la lisis celular inaceptable o el daño si los TIL

se congelan para uso futuro. Los crioprotectores son conocidos en la técnica. Dichos crioprotectores pueden seleccionarse entre glicerol, etilenglicol, propilenglicol o dimetilsulfóxido (DMSO).

[0081] Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento opcionalmente comprenden además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables (p. ej., albúmina de suero humano o materiales poliméricos (p. ej., PEG)).

[0082] Las composiciones de la presente descripción se pueden formular de cualquier manera adecuada para su administración. Los TIL se pueden administrar en nanopartículas, microesferas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), lipidoides, lipoplex, liposomas, polímeros, carbohidratos (incluidos los azúcares simples), lípidos catiónicos o combinaciones de los mismos.

[0083] Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a humanos, el experto en la técnica entenderá que tales composiciones son generalmente adecuadas para la administración a cualquier otro animal, por ejemplo, a mamíferos no humanos. Los sujetos a los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, tales como vacas, caballos, pollos y cerdos; animales domésticos, como gatos, perros; o animales de investigación como ratones, ratas, conejos, perros y primates no humanos.

Métodos de tratamiento

[0084] En este documento se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un sujeto administrando al sujeto (es decir, el sujeto receptor) un TIL modificado que expresa mbIL15 o una población del mismo, incluida una población o subpoblación de TIL expandidos, o una composición farmacéutica del mismo. El cáncer puede ser, entre otros, melanoma, melanoma uveal (ocular), cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer del sistema nervioso central, cáncer gastrointestinal (p. ej., cáncer colorrectal).

[0085] La terapia con TIL hasta la fecha ha requerido la administración concomitante de altas dosis de IL2 simultáneamente y después de la administración de TIL. Pero a diferencia del tratamiento convencional con TIL, el presente método no requiere la administración de IL2. Más bien, los TIL modificados al expresar mbIL15 proporcionan una fuente suficiente de citocinas para estimular la proliferación y la actividad de los TIL.

[0086] El método de tratamiento del cáncer puede comprender además aislar uno o más TIL de un tumor como se describe en el presente documento e introducir en uno o más TIL un ácido nucleico que exprese mbIL15. Los TIL pueden aislarse de un tumor del sujeto receptor (fuente autóloga). El tumor del que se aíslan los TIL puede ser un tumor primario o un tumor metastásico. Por lo tanto, si se crioconservan los TIL de una biopsia o parte de un tumor primario, se pueden descongelar y utilizar para el tratamiento de un tumor metastásico resultante o de un tumor primario diferente en una fecha posterior. Alternativamente, los TIL se pueden aislar de un tumor de un donante (fuente alogénica), en donde el sujeto donante no es el sujeto receptor. Los TIL aislados del mismo tumor a tratar tienen la ventaja de tener neoantígenos y heterogeneidad que son iguales al tumor. Los TIL aislados de un tumor diferente del mismo sujeto o del tumor del sujeto donante pueden seleccionarse por reactividad con antígenos cancerosos que están presentes en el tumor del sujeto receptor mediante métodos conocidos en la técnica, como la tinción con tetrámero del TCR. Si los TIL se aíslan de un sujeto donante, el método puede comprender además seleccionar un sujeto donante que sea compatible con HLA para el sujeto receptor, para reducir las respuestas del injerto contra el hospedador.

[0087] Los TIL se pueden obtener a partir de una resección quirúrgica de muestra de tumor, biopsia de tejido, biopsia con aguja u otros medios como paso inicial. Luego, los TIL se transducen como se describe aquí y luego se expanden *ex vivo* para proporcionar una mayor población de células para ACT.

[0088] La administración de TIL puede incluir una cantidad de aproximadamente 1000 células/inyección hasta aproximadamente 10 mil millones de células/inyección, tal como 2×10^{11} , 1×10^{11} , 1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^3 , 5×10^3 , células por inyección, o cualquier rango entre cualquiera de los dos números, incluso los extremos. Opcionalmente, se administran al sujeto alrededor de 1×10^8 a alrededor de 1×10^{11} células.

[0089] Los TIL de la presente descripción pueden administrarse por cualquier vía adecuada. En algunas modalidades, los TIL se administran mediante infusión intravenosa, infusión intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intralinfática. En algunas modalidades, los TIL se administran por infusión intravenosa o intraarterial. Opcionalmente, los TIL se administran localmente, por ejemplo, directamente en un tumor o vaso sanguíneo que irriga un tumor.

[0090] Los TIL se pueden administrar en una dosis única, pero en ciertos casos se pueden administrar en dosis múltiples.

[0091] El método de tratamiento puede comprender además el agotamiento de los linfocitos del sujeto receptor antes de la administración de los TIL. Las investigaciones en humanos y modelos murinos de melanoma sugieren que el agotamiento de linfocitos agota las células reguladoras negativas,

incluidas las células T reguladoras (células T_{reg}) y las células supresoras derivadas de mieloides periféricos, que pueden suprimir la proliferación de células T. Por lo tanto, el agotamiento de linfocitos ayuda en la proliferación de TIL transferidos adoptivamente. El régimen de acondicionamiento de agotamiento de linfocitos incluyen, por ejemplo, el pretratamiento del sujeto receptor con irradiación de cuerpo completo o agentes de agotamiento de linfocitos antes de la transferencia adoptiva de los TIL. Este preacondicionamiento permite que los TIL se expandan eliminando las células T_{reg} y eliminando los posibles sumideros de citocinas mediante los cuales las células normales compiten con los TIL recién infundidos.

[0092] Un ejemplo de un agente de agotamiento de linfocitos es la fludarabina (p. ej., a una dosis de 0,5 µg/ml - 10 µg/ml). En algunas modalidades, la fludarabina se administra a una concentración de 1 µg/ml diariamente durante 1-7 días antes de la administración de TIL. 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.

[0093] En algunas modalidades, se administra ciclofosfamida para proporcionar mafosfamida, su forma activa, a una concentración de 0,5 µg/ml -10 µg/ml. En algunas modalidades, se administra ciclofosfamida para proporcionar mafosfamida a una concentración de 1 µg/ml diariamente durante 1-7 días antes de la administración de TIL. En algunas modalidades, la ciclofosfamida se administra a una dosis de 50 mg/m²/día, 75 mg/m²/día, 100 mg/m²/día, 150 mg/m²/día, 175 mg/m²/día, 200 mg/m²/día, 225 mg/m²/día, 250 mg/m²/día, 275 mg/m²/día o 300 mg/m²/día. En algunas modalidades, la ciclofosfamida se administra por vía intravenosa (iv). En algunas modalidades, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 2-7 días a 35 mg/kg/día iv. En algunas modalidades, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4-5 días a 250 mg/m²/día iv. En algunas modalidades, el tratamiento con ciclofosfamida se administra durante 4 días a 250 mg/m²/día iv.

[0094] En ciertas modalidades, el agotamiento de linfocitos que comprende la administración de una combinación de agentes de agotamiento de linfocitos, como ciclofosfamida a 60 mg/kg durante 2 días y fludarabina a 25 mg/m² durante 5 días o ciclofosfamida a 250 mg/m²/día durante 4 días y fludarabina a 25 mg/m² durante 4 días.

[0095] Si la IL15 expresada por el TIL se une operativamente a un DRD, el método puede comprender además administrar al sujeto receptor un segundo agente (ligando) que se une al DRD en una cantidad eficaz para aumentar la actividad de IL15 del TIL. El ligando se puede administrar usando un régimen

de dosificación que proporcione una cantidad seleccionada de actividad de IL15 al sujeto. El ligando se puede administrar para lograr una actividad de IL15 continua o intermitente en el sujeto. La determinación de la frecuencia y la duración de la dosificación al sujeto la determina un experto en la técnica considerando, por ejemplo, proporcionar una dosis mayor o una duración más prolongada de la administración del ligando cuando se desea una mayor actividad de IL15 y se reduce o elimina la administración de ligando cuando se desea menos actividad. La dosis y la duración de la administración del ligando y la actividad resultante de IL15 también se seleccionan para evitar efectos secundarios inaceptables o toxicidad en el sujeto. Por lo tanto, al sujeto se le administra una cantidad efectiva del ligando para lograr una cantidad efectiva de IL15. El término cantidad efectiva se define como cualquier cantidad necesaria para producir una respuesta fisiológica deseada. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente las cantidades y los programas efectivos para administrar el ligando basándose en la cantidad de IL15 resultante, la actividad de la IL15 o basándose en uno o más signos del efecto de la actividad de la IL15. Los rangos para la administración del ligando van desde cero hasta una dosis de saturación y la actividad de IL15 resultante varía desde un nivel basal en ausencia de ligando hasta un nivel máximo en presencia de una cantidad de ligando saturante. En algunas modalidades, el método comprende poner en contacto la célula con una cantidad seleccionada de ligando, en donde la cantidad seleccionada de ligando da como resultado un nivel de actividad seleccionado de la carga activa de IL15. En ciertas modalidades, el método comprende alternativamente poner en contacto la célula con cantidades seleccionadas variables de ligando, para lograr niveles de actividad seleccionados variables que van desde el nivel basal hasta el nivel máximo. Opcionalmente, con un rango dinámico suficiente que permita la dosis-respuesta deseada para el ligando y el rango de actividad concomitante para la carga activa (p. ej., para un ligando y una carga activa dados, el rango de diferencia en el estado desactivado y la actividad máxima de la carga activa resultaría de al menos un rango de 10 veces de ligando). Este rango dinámico suficiente permite un ajuste fino y una curva de respuesta a la dosis que no es inaceptablemente pronunciada.

[0096] El ligando se puede administrar para lograr una actividad de carga activa de IL15 continua o intermitente. La actividad de carga activa continua puede ser un nivel de actividad sustancialmente consistente, o el nivel de actividad puede modularse. La actividad intermitente, entre el estado desactivado y el estado activado incluye la actividad de modulación entre el estado desactivado y un estado activado sustancialmente consistente, o entre el estado desactivado y niveles variables de actividad del estado activado. Se administra una dosis mayor o una duración más prolongada de la administración del ligando cuando se desea una mayor actividad de la carga activa de IL15, y se elige la reducción o eliminación de la dosis del ligando cuando se desea una menor actividad. La

dosificación o frecuencia de la administración del ligando y la cantidad y actividad resultantes de la carga activa de IL15 no deben ser tan grandes como para causar efectos secundarios adversos inaceptables y variarán con la edad, condición, sexo, tipo de cáncer que se está tratando del paciente, la extensión del cáncer y si se incluyen otros agentes terapéuticos en el régimen de tratamiento. Se puede encontrar orientación en la bibliografía para las dosis apropiadas para clases dadas de ligandos.

[0097] En algunas modalidades, los TIL modificados con mbIL15 o con mbIL15 regulable (es decir, unidos operativamente a DRD) pueden administrarse en combinación con uno o más reguladores de puntos de control inmunitarios. Los inhibidores de puntos de control incluyen anticuerpos que se dirigen a PD-1 o inhiben la unión de PD-1 a PD-L1, incluidos, entre otros, nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475 o MK-3475, Merck; Keytruda®), anticuerpo anti-PD-1 humanizado JS001 (ShangHai JunShi), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 TSR-042 (Tesar, Inc.), Pidilizumab (anti-PD-1 mAb CT -011, Medivation), anticuerpo monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) y/o anticuerpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), anticuerpo monoclonal humano REGN2810 (Regeneron), anticuerpo monoclonal humano MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb), y/o anticuerpo IgG4 anti-PD-1 humanizado PDR001 (Novartis). El sujeto es monitoreado opcionalmente para el resultado del tratamiento. Así, por ejemplo, se puede detectar el número de células malignas en una muestra, el ADN tumoral circulante en una muestra o el tamaño de un tumor sólido tras la obtención de imágenes. Si se logra el criterio de valoración deseado (p. ej., mostrando un tratamiento exitoso del cáncer), el ligando se puede reducir o discontinuar para reducir o eliminar la IL15. De manera similar, si el sujeto desarrolla una tormenta de citocinas, una reacción alérgica u otro efecto adverso debido a la IL15, el ligando puede reducirse o interrumpirse.

Definiciones

[0098] Los términos alrededor de y aproximado, cuando se usan para referirse a un valor medible como una cantidad, concentración, dosis, tiempo, temperatura, actividad, nivel, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, peso, posición, longitud y similares, está destinado a tener en cuenta las variaciones debidas a errores experimentales, que podrían abarcar variaciones de $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$ o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad, concentración, dosis, tiempo, temperatura, actividad, nivel, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, peso, posición, longitud y similares. Todas las medidas o números se entienden implícitamente modificados por la palabra alrededor de, incluso si la medida o el número no se modifican explícitamente por la palabra alrededor

de. En los casos en que los términos alrededor de y aproximado se utilizan en relación con la ubicación o posición de las regiones dentro de un polipéptido de referencia, estos términos abarcan variaciones de $\pm$ hasta 20 residuos de aminoácidos, $\pm$ hasta 15 residuos de aminoácidos, $\pm$ hasta 10 residuos de aminoácidos, $\pm$ hasta 5 residuos de aminoácidos, $\pm$ hasta 4 residuos de aminoácidos, $\pm$ hasta 3 residuos de aminoácidos, $\pm$ hasta 2 residuos de aminoácidos, o incluso $\pm$ 1 residuo de aminoácidos.

[0099] Tal como se usa en este documento, unido operativamente significa que, en presencia de un ligando emparejado, el DRD está unido a la IL15 directa o indirectamente para alterar una característica medible de la IL15 (por ejemplo, altera el nivel de actividad de la IL15 en comparación al nivel de actividad en ausencia del ligando emparejado). En algunas modalidades, el nivel medido de cantidad y/o actividad de la IL15 aumenta en presencia de una cantidad eficaz de ligando en comparación con el nivel medido de expresión o actividad en ausencia de ligando. Una cantidad efectiva del ligando significa la cantidad de ligando necesaria para ver un aumento en la medida de la cantidad o actividad de la IL15. En algunas modalidades, la cantidad efectiva no es tan grande como para producir una toxicidad inaceptable o efectos fuera del objetivo. Opcionalmente, la característica medible es un resultado terapéutico, una cantidad de carga activa en una muestra o un nivel de actividad biológica de la carga activa (para lo cual la medición de la cantidad de carga activa puede servir como indicador).

[00100] Siempre que se utilice la frase unido o vinculado o similar, se entiende que la frase sigue directa o indirectamente a menos que se indique explícitamente lo contrario o no tenga sentido en el contexto. Por lo tanto, la referencia a un DRD unido, vinculado o asociado con mbIL15 significa en cada caso que un DRD está directa o indirectamente unido a una IL15.

[00101] Como se usa aquí, los términos supervivencia de TIL y persistencia de TIL se usan indistintamente. La supervivencia se determina sobre la base de un efecto persistente de los TIL.

[00102] Como se usa aquí, la expansión se usa para referirse a un aumento funcional en el número de células que ocurre durante un REP funcional. Un REP funcional da como resultado una población celular expandida que proporciona un número suficiente de células para uso terapéutico. Un REP fallido, por otro lado, daría como resultado la ausencia de un aumento funcional en el número de células. Las células no expandidas incluyen células pre-REP y aquellas que no han experimentado una expansión funcional en REP en comparación con una población celular expandida. Una expansión no funcional incluye una expansión del 10 % o menos de una población celular expandida. Por ejemplo, una población TIL que se multiplicó por 100 en un período de tiempo determinado se puede comparar con una población no expandida que se multiplicó por 10 o menos. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, una célula expandida o una población celular expandida se refiere a

una célula o población de células que se ha sometido a REP funcional. Una célula o población de células no expandida se refiere a una célula o población de células pre-REP o post-REP que no dio como resultado una expansión funcional de la población de células. A modo de ejemplo, ciertos TIL modificados se expandirán en las células alimentadoras K562 modificadas, pero la expansión de veces en las PBMC será inferior al 10 % de la expansión de veces en las células alimentadoras K562 modificadas. Por lo tanto, los TILS no expandidos pueden ser TIL modificados pre-REP o TIL modificados después de REP en PBMC.

[00103] El término identidad, como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre dos o más secuencias, según se determina comparando las secuencias. En la técnica, identidad también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias, determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos (aminoácido o ácido nucleico). La identidad mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre dos o más secuencias con alineamientos separados (si los hay) abordados por un modelo matemático o programa de computadora en particular (es decir, algoritmos). La identidad de las secuencias relacionadas se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988). En general, las variantes de un polinucleótido o polipéptido particular de la descripción tendrán al menos alrededor de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % pero menos del 100 % de identidad de secuencia con ese polinucleótido o polipéptido de referencia en particular según lo determinado por los programas de alineamiento de secuencias y los parámetros descritos en este documento y conocido por los expertos en la técnica. Dichas herramientas para la alineación incluyen las de la suite BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madren, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI- BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.)

[00104] El término célula alimentadora como se usa aquí se refiere a células que soportan la expansión de TIL en cultivo, como secretando en el cultivo celular o presentando en la membrana de

la célula alimentadora factores de crecimiento o supervivencia. En algunas modalidades, el crecimiento de las células alimentadoras se detiene (es decir, la replicación es incompetente).

[00105] Como se usa en este documento, sujeto y paciente se usan como sinónimos y no pretenden limitarse a sujetos o pacientes humanos.

5 **[00106]** El tratamiento, como se usa aquí, se refiere a una reducción o retraso en uno o más signos o síntomas del cáncer. Como ejemplo, un cambio favorable de al menos el 10 % en un parámetro medible de la enfermedad, y preferiblemente al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más, puede ser indicativo de un tratamiento eficaz. Por lo tanto, se puede evaluar la eficacia del tratamiento o la mejora de la enfermedad, por ejemplo, midiendo la progresión de la enfermedad, la remisión de
10 la enfermedad, la gravedad de los síntomas, la reducción del dolor, la calidad de vida, la dosis de un medicamento necesaria para mantener el efecto del tratamiento, el nivel de un marcador de enfermedad, o cualquier otro parámetro medible apropiado para una enfermedad determinada que se está tratando o que se desea tratar. En relación con la administración de las composiciones de la presente descripción, la cantidad eficaz para el tratamiento del cáncer indica que la administración de
15 una manera clínicamente apropiada da como resultado un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, como una mejora de los síntomas, una cura, una reducción en la carga de la enfermedad, reducción en la masa tumoral o el número de células, extensión de la vida, mejora en la calidad de vida u otro efecto generalmente reconocido como positivo por médicos familiarizados con el tratamiento del tipo particular de cáncer.

20 **[00107]** Cuando se dan rangos, se incluyen los extremos. Además, debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente del contexto y la comprensión de un experto en la técnica, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor específico o subrango dentro de los rangos establecidos en diferentes modalidades de la descripción, al décimo de la unidad del límite inferior del rango, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 **[00108]** Los detalles de una o más modalidades de la presente descripción se exponen en la descripción y las figuras adjuntas. Debe entenderse que se pueden utilizar otras modalidades y realizar cambios estructurales o de proceso sin apartarse del alcance de la descripción. En otras palabras, se describen modalidades y aspectos ilustrativos. Pero se apreciará que, en el desarrollo de cualquier
30 modalidad real de este tipo, se pueden tomar numerosas decisiones específicas de implementación para lograr los objetivos específicos del desarrollador, como el cumplimiento de restricciones clínicamente relevantes, que pueden variar de una implementación a otra. Además, se apreciará que

dicho esfuerzo de desarrollo podría ser complejo y requerir mucho tiempo, pero sin embargo sería una tarea rutinaria para los expertos en la técnica que se benefician de esta descripción.

[00109] Las publicaciones citadas en este documento y el material por el cual se citan se incorporan específicamente por referencia en su totalidad.

- 5 [00110] Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de los métodos y composiciones descritos en este documento y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

10

Ejemplo 1: Aislamiento y expansión de TIL a partir de muestras tumorales de pacientes (cultivo pre-REP)

- [00111] Las muestras de melanoma y de tumores de cabeza y cuello se obtuvieron de
15 Cooperative Human Tissue Network. Las muestras tumorales se cortaron en fragmentos de 1-3 mm en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y los fragmentos se colocaron en placas de múltiples pocillos a 1 fragmento/pocillo en 2 ml de medio de cultivo TIL (RPMI-1640 complementado con GlutaMAX (Thermo Fisher), penicilina/estreptomicina al 1 %, piruvato de sodio 1 mM, HEPES al 1 %, 2-mercaptoetanol 50 μ M (Invitrogen) y suero AB humano inactivado por calor al 10 % (Valley
20 Bio)) que contiene 6000 IU/ml de IL2 (Peprotech) y 0,1 mg/ml de normocina (InvivoGen). La mitad de los medios se reemplazó con medio fresco que contenían IL2 a partir del día 5 y las células se dividieron en múltiples pocillos o matraces a medida que se volvían confluentes durante 3 semanas. Este proceso de cultivo se conoce como protocolo de expansión pre-rápida (pre-REP). Después de pre-REP, los TIL se dividieron en alícuotas, se congelaron en medios de congelación de células
25 (Bambanker, Bulldog Bio o Cryostor-10, STEMCELL Technologies) y se almacenaron a largo plazo en nitrógeno líquido.

- [00112] Para determinar el cambio en la frecuencia de las células T antes y después del cultivo pre-REP, una parte de los fragmentos tumorales se digirieron con colagenasa y ADNasa I para generar una suspensión de células individuales antes del cultivo pre-REP y se compararon con las células
30 obtenidas después del cultivo pre-REP. La frecuencia de las células T se analizó mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD45 y anti-CD3 conjugados con fluorocromo. Como se muestra en la FIG. 1, casi la mitad de las células ($44,29 \pm 21,67$ %) en la suspensión de células tumorales precultivadas eran CD45+ y, entre ellas, solo aproximadamente el 40 % ($\sim 39,85 \pm 23,69$ %) eran

células T CD3+. Después de 3 semanas de cultivo en presencia de IL2 (pre-REP), la mayoría de las células eran CD45+ (90,35±7,28 %), lo que indica un enriquecimiento de células hematopoyéticas, y CD3+ (80,64±15,19 %), lo que indica un enriquecimiento de células T

[00113] Los TIL de otros tipos de tumores humanos, incluidos los tumores de melanoma y los tumores malignos de mama, pulmón, riñón, endometrio, hígado, páncreas y ovario, se aislaron de la misma manera descrita anteriormente.

Ejemplo 2: Generación de células K562 que expresan 4-1BBL e IL21 unida a membrana

Ensamblaje de construcción vectorial 4-1BBL e IL21 unida a membrana

[00114] El inserto IL21-41BBL-001 comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia líder, IL21 unida a membrana (mbIL21), una secuencia P2A y 4-1BBL. La secuencia de ácido nucleico de mbIL21 codifica, en orden, una secuencia de IL21, una bisagra de IgG, una cadena de IgG4, un dominio transmembrana de CD4 y un enlazador de glicina-serina (GS) (ver Tabla 3). OT-IL21-41BBL-001, que comprende el inserto IL21-41BBL-001, se construyó en un vector pELNS (un vector de expresión lentiviral autoinactivante de tercera generación) utilizando técnicas estándar de biología molecular. Los fragmentos de genes (Gblocks) se insertaron en el vector pELNS y se colocaron bajo el control del promotor EF1a utilizando el ensamblaje Gibson (NEBuilder Hifi). El plásmido ensamblado se transformó en *E. coli* (NEB estable) para la amplificación y la secuencia se confirmó antes de proceder con la producción del virus.

Tabla 3: Componentes de una construcción mbIL21-41BBL

Descripción del Dominio	Secuencia NA	NA SEQ ID NO	Secuencia AA	AA SEQ ID NO
Péptido señal GM-CSF	ATGTGGCTGCAGTCTCTGCTCCT CTTGGGGACTGTCGCCTGTTCTA TTTCA	32	MWLQSLLLL GTVAC SIS	33
IL21	CAAGGACAGGATCGACATATGA TTCGGATGCGCCAACTGATAGA TATAGTCGATCAACTCAAGAAT TATGTGAATGACTTGGTCCCTGA	34	QGQDRHMIR MRQLIDIVDQ LKNYVNDLV PEFLPAPEDV	35

	GTTTCTGCCGGCTCCAGAGGAC GTTGAAACAAACTGTGAATGGT CAGCGTTTTTCATGTTTTCAAAAG GCACAGCTCAAGTCCGCCAATA CAGGCAATAACGAGCGGATTAT AAATGTCTCAATTAAAAAGCTC AAGCGCAAACCCCCTTCAACGA ATGCTGGTCGCCGCCAGAAACA CAGGTTGACCTGTCCCTCCTGTG ACTCATACGAGAAGAAACCTCC CAAGGAATTTCTCGAACGCTTTA AGTCACTCTTGCAGAAGATGAT TCATCAGCACTTGAGTAGCCGG ACACATGGTTCAGAGGATAGT		ETNCEWSAFS CFQKAQLKS ANTGNNERII NVSIIKKLKRK PPSTNAGRRO KHRLTCPSCD SYEKKPPKEF LERFKSLLQK MIHQHLSSRT HGSEDS	
Bisagra IgG (S228P)	GAGTCTAAGTATGGCCCACCGT GTCCCCCTGCCCA	36	ESKYGPPCPP CP	37
Cadena IgG4	GCACCTGAGTTCCTCGGAGGCC CCTCTGTATTCCTGTTTCCCCCA AAGCCCAAGGATACTCTTATGA TCTCACGCACTCCGGAAGTAAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGAGT CAGGAAGACCCCGAAGTCCAGT TTAATTGGTACGTGGACGGGGT TGAGGTACATAACGCCAAAACG AAACCTCGGGAGGAGCAATTCA ATTCCACTTACCGGGTTGTATCA GTCCTGACTGTACTGCATCAAG ATTGGCTCAACGGGAAAGAGTA CAAGTGTAAGGTTAGTAATAAA GGGCTGCCGTCTAGTATTGAGA AAACGATCAGTAAGGCTAAAGG GCAGCCAAGAGAGCCACAAGTA	38	APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQE DPEVQFNWY VDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNG KEYKCKVSN KGLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESN	39

	TATACCCTGCCACCCTCTCAGGA GGAGATGACTAAAAACCAAGTG TCACTGACCTGCCTTGTTAAGGG TTTTTACCCATCTGATATAGCAG TAGAGTGGGAATCCAATGGACA GCCAGAGAACAATTATAAGACT ACACCTCCCGTCCTTGATAGTGA CGGCTCCTTCTTCTTGATTCTC GACTTACAGTTGATAAGTCCCG CTGGCAGGAGGGTAATGTCTTT AGCTGCAGTGTAATGCACGAAG CTCTTCATAATCACTACACACAA AAATCATTGAGCCTGTCTCTGGG AAAG		GQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNV FSCSVMHEA LHNHYTQKS LSLSLGK	
Transmemb rana CD4	ATGGCCTTGATTGTGCTCGGCGG AGTTGCAGGCCTGCTCCTTTTTA TTGGA CT CGGAATATTTTTC	40	MALIVLGGV AGLLLFIGLGI FF	41
Enlazador	GGATCTGGA	42	GSG	43
P2A	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAA GCAGGCTGGAGACGTGGAGGAG AACCCTGGACCT	44	ATNFSLLKQA GDVEENPGP	45
4-1BBL	ATGGAGTACGCTAGTGATGCGT CCTTGGACCCCGAGGCGCCATG GCCACCGGCCCCGCGAGCTCGA GCCTGTCGAGTGCTGCCATGGG CTCTGGTCGCTGGGTTGCTCCTC CTTCTGCTTTTGGCCGCGGCTTG TGCAGTGTTTCTTGCTTGCCCGT GGGCAGTTAGCGGTGCTCGCGC ATCTCCCGGAAGCGCGGCGAGT CCTCGACTCAGGGAAGGTCCGG AGCTGAGCCCAGATGACCCCGC	46	MEYASDASL DPEAPWPPAP RARACRVLP WALVAGLLL LLLLAAACA VFLACPWAV SGARASPGSA ASPRLREGPE LSPDDPAGLL DLRQGMFAQ LVAQNVLID	47

	CGGTTTGCTGGACCTCCGCCAA GGAATGTTCGCTCAACTCGTTGC GCAAAACGTACTTCTTATAGAC GGCCCTCTTAGTTGGTACAGTGA CCCAGGATTGGCTGGCGTTAGTT TGACAGGCGGACTCAGTTACAA GGAGGATACTAAGGAACTGGTA GTCGCTAAGGCTGGGGTATACT ACGTGTTCTTTCAACTCGAACTG AGAAGGGTGGTTGCGGGAGAAG GATCTGGAAGTGTATCTCTCGCC CTGCACCTCCAACCCCTCAGAA GTGCCGCCGGAGCGGCCGCCCT TGCCCTTACTGTCGACCTGCCCC CGGCTTCTTCAGAAGCGCGAAA TAGTGCATTCGGCTTCCAGGGG CGCCTTTTGCACTTGAGCGCTGG ACAGCGCCTCGGGGTCCACCTC CACACGGAAGCGCGGGCGAGGC ACGCTTGGCAACTCACACAAGG TGCGACGGTTCTCGGCTTGTTTA GGGTTACGCCTGAGATAACGGC TGGCCTCCCATCTCCAAGATCCG AG		GPLSWYSDP GLAGVSLTG GLSYKEDTK ELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSG SVSLALHLQP LRSAAGAAA LALTVDLPPA SSEARNSAFG FQGRLLHLSA GQRLGVHLH TEARARHAW QLTQGATVL GLFRVTPEIP AGLPSRSE	
Enlazador	GGATCC	25	GS	24
Codón de parada	TAA	48	N/C	
Inserto IL21-41BBL	ATGTGGCTGCAGTCTCTGCTCCT CTTGGGGACTGTCGCCTGTTCTA TTTCACAAGGACAGGATCGACA TATGATTTCGGATGCGCCAACTG ATAGATATAGTCGATCAACTCA	49	MWLQSLLLL GTVACISISQG QDRHMIRM QLIDIVDQLK NYVNDLVPE	50

AGAATTATGTGAATGACTTGGT CCCTGAGTTTCTGCCGGCTCCAG AGGACGTTGAAACAAACTGTGA ATGGTCAGCGTTTTTCATGTTTTC AAAAGGCACAGCTCAAGTCCGC CAATACAGGCAATAACGAGCGG ATTATAAATGTCTCAATTAAAA AGCTCAAGCGCAAACCCCTTC AACGAATGCTGGTCGCCGCCAG AAACACAGGTTGACCTGTCCCT CCTGTGACTCATACGAGAAGAA ACCTCCCAAGGAATTTCTCGAA CGCTTTAAGTCACTCTTGACAGAA GATGATTCATCAGCACTTGAGT AGCCGGACACATGGTTCAGAGG ATAGTGAGTCTAAGTATGGCCC ACCGTGTCCTCCCTGCCAGCAC CTGAGTTCCTCGGAGGCCCTCT GTATTCCTGTTTCCCCCAAAGCC CAAGGATACTCTTATGATCTCAC GCACTCCGGAAGTAACCTGCGT GGTGGTGGATGTGAGTCAGGAA GACCCCGAAGTCCAGTTTAATT GGTACGTGGACGGGGTTGAGGT ACATAACGCCAAAACGAAACCT CGGGAGGAGCAATTCAATTCCA CTTACCGGGTTGTATCAGTCCTG ACTGTACTGCATCAAGATTGGCT CAACGGGAAAGAGTACAAGTGT AAGGTTAGTAATAAAGGGCTGC CGTCTAGTATTGAGAAAACGAT CAGTAAGGCTAAAGGGCAGCCA	FLPAPEDVET NCEWSAFSCF QKAQLKSAN TGNNERIINV SIKKLKRKPP STNAGRROK HRLTCPSCDS YEKKPPKEFL ERFKSLLQK MIHQHLSSRT HGSEDESKEY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDP EVQFNWYVD GVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNK GLPSSIEKTIS KAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESN GQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNV
--	---

AGAGAGCCACAAGTATATACCC TGCCACCCTCTCAGGAGGAGAT GACTAAAAACCAAGTGTCCTG ACCTGCCTTGTTAAGGGTTTTTA CCCATCTGATATAGCAGTAGAG TGGGAATCCAATGGACAGCCAG AGAACAATTATAAGACTACACC TCCCGTCCTTGATAGTGACGGCT CCTTCTTCTTGATTCTCGACTT ACAGTTGATAAGTCCCGCTGGC AGGAGGGTAATGTCTTTAGCTG CAGTGTAATGCACGAAGCTCTT CATAATCACTACACACAAAAAT CATTGAGCCTGTCTCTGGGAAA GATGGCCTTGATTGTGCTCGGCG GAGTTGCAGGCCTGCTCCTTTTT ATTGGACTCGGAATATTTTTTCGG ATCTGGAgctactaacttcagcctgctgaagc aggctggagacgtggaggagaaccctggacctA TGGAGTACGCTAGTGATGCGTC CTTGGACCCCGAGGCGCCATGG CCACCGGCCCCGCGAGCTCGAG CCTGTCGAGTGCTGCCATGGGCT CTGGTCGCTGGGTTGCTCCTCCT TCTGCTTTTGGCCGCGGCTTG CAGTGTTTCTTGCTTGCCCGTGG GCAGTTAGCGGTGCTCGCGCAT CTCCCGGAAGCGCGGCGAGTCC TCGACTCAGGGAAGGTCCGGAG CTGAGCCCAGATGACCCCGCCG GTTTGCTGGACCTCCGCCAAGG AATGTTCGCTCAACTCGTTGCGC	FSCSVMHEA LHNHYTQKS LSLSLGKMA LIVLGGVAGL LLFIGLGIFFG SGATNFSLLK QAGDVEENP GPMEYASDA SLDPEAPWPP APRARACRV LPWALVAGL LLLLLLAAAC AVFLACPWA VSGARASPGS AASPRLREGP ELSPDDPAGL LDLRQGMFA QLVAQNVLLI DGPLSWYSD PGLAGVSLTG GLSYKEDTK ELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSG SVSLALHLQP LRSAAGAAA LALTVDLPPA SSEARNSAFG FQGRLLHLSA GQRLGVHLH TEARARHAW QLTQGATVL
---	--

	AAAACGTACTTCTTATAGACGG CCCTCTTAGTTGGTACAGTGACC CAGGATTGGCTGGCGTTAGTTTG ACAGGCGGACTCAGTTACAAGG AGGATACTAAGGAACTGGTAGT CGCTAAGGCTGGGGTATACTAC GTGTTCTTTCAACTCGAACTGAG AAGGGTGGTTGCGGGAGAAGGA TCTGGAAGTGTATCTCTCGCCCT GCACCTCCAACCCCTCAGAAGT GCCGCCGAGCGGCCGCCCTTG CCCTTACTGTCGACCTGCCCCCG GCTTCTTCAGAAGCGCGAAATA GTGCATTGCGCTTCCAGGGGCG CCTTTTGCATTGAGCGCTGGAC AGCGCCTCGGGGTCCACCTCCA CACGGAAGCGCGGGCGAGGCAC GCTTGGCAACTCACACAAGGTG CGACGGTTCTCGGCTTGTTTAGG GTTACGCCTGAGATAACCGGCTG GCCTCCCATCTCCAAGATCCGA GGGATCC ^{taa}		GLFRVTPEIP AGLPSRSEG S*	
OT-IL21- 41BBL-001	g'gcgctcactggcgcgtgtttacaacgtcgtgact gggaaaaccctggcggtacccaacttaategccttgc agcacatcccccttgcgcagctggcgtaatagcga agaggcccgaccgatgccttcccaacagtgc gcagcctgaatggcgaatgggacgcgccctgtagc ggcgattaagcgcggcggtgtggtggttacgcg cagcgtgaccgtacactgccagcgccttagcgc ccgctccttgcgtttcttcccttcttctgccacgtt cgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggct cccttagggtccgatttagtgccttacggcacctcg	51	N/C	

accccaaaaaacttgattagggatggttcacgtag tgggccatcgccctgatagacgggttttcgcccttga cgttgagtcacgttcttaatagtgactcttgtcc aaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattct tttgattataagggatttgcgatttcggcctattggt taaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaat ttaacaaaatattaacgcttacaatttaggtggcacttt tcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttttt ctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaat aacctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaa gagtatgagtattcaacatttcggtcgcccttattcc ctttttgcggcatttgccttctgttttgcaccag aaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagt tgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctca acagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaag aacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctat gtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaag agcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatga cttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatctta cggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtg ccataaccatgagtataacactgcggccaacttact tctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccg ctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgcctt gatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc aaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaa tggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaact acttactctagcttcccggcaacaattaatagactgga tggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgt cggcccttccggctggctggtttattgctgataaatct ggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgca gcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgta gttatctacacgacggggagtcaggcaactatggat			
--	--	--	--

gaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctca ctgattaagcattggaactgtcagaccaagttactc atatatactttagattgatttaaaacttcattttaattaa aaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatga ccaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcg tcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgag atccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaaca aaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgttgcgg atcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggc ttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttagt gtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgta gcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttacc agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttacc gggttgactcaagacgatagttaccggataaggcg cagcggtcgggctgaacggggggtcgtgcacaca gccagcttgagcgaacgacctacaccgaactga gatactacagcgtgagctatgagaaagcgccacg cttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggt aagcggcagggcggaaacaggagagcgcacgag ggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatagt cctgtcgggttccgccacctctgacttgagcgtcgatt tttgtatgctcgtcaggggggaggagcctatggaa aaacgccagcaacgcggccttttacggttctggcc tttgctggcctttgctcacatgttcttctgcgttacc ccctgattctgtggataaccgtattaccgccttgagt gagctgataccgctcggcgagccgaacgaccga gcgcagcagtcagtgagcgaggaagcggaaga gcgccaatacgaaccgcctctccccgcgcgttg gccgattcattaatgcagctggcacgacaggttccc gactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaa tgtgagttagctcactcattagggacccccaggctttac actttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtga			
---	--	--	--

g c g g a t a a c a a t t t c a c a c a g g a a c a g c t a t g a c c a t g a t t a c g c c a a g c g c g c a a t t a a c c c t a c t a a a g g g a a c a a a a g c t g g a g c t g c a a g c t t a a t g t a g t c t t a t g c a a t a c t c t t g t a g t c t t g c a a c a t g g t a a c g a t g a g t t a g c a a c a t g c c t t a c a a g g a g a g a a a a g c a c c g t g c a t g c c g a t t g g t g g a a g t a a g g t g g t a c g a t c g t g c c t t a t t a g g a a g g c a a c a g a c g g g t c t g a c a t g g a t t g g a c g a a c c a c t g a a t t g c c g c a t t g c a g a g a t a t t g t a t t t a a g t g c c t a g c t c g a t a c a t a a a c g g g t c t c t c t g g t t a g a c c a g a t c t g a g c c t g g g a g c t c t c t g g c t a a c t a g g g a a c c c a c t g c t t a a g c c t c a a t a a a g c t t g c c t t g a g t g c t t c a a g t a g t g t g t g c c c g t c t g t t g t g a c t c t g g t a a c t a g a g a t c c c t c a g a c c c t t t a g t c a g t g t g g a a a t c t c t a g c a g t g g c g c c c g a a c a g g g a c t t g a a a g c g a a a g g g a a a c c a g a g g a g c t c t c t c g a c g c a g g a c t c g g c t t g c t g a a g c g c g c a c g g c a a g a g g c g a g g g g c g g c g a c t g g t g a g t a c g c c a a a a t t t t g a c t a g c g g a g g c t a g a a g g a g a g a g a t g g g t g c g a g a g c g t c a g t a t t a a g c g g g g g a g a a t t a g a t c g c g a t g g g a a a a a t t c g g t t a a g g c c a g g g g a a g a a a a a t a t a a a t t a a a a c a t a t a g t a t g g g c a a g c a g g g a g c t a g a a c g a t t c g c a g t t a a t c c t g g c c t g t t a g a a c a t c a g a a g g c t g t a g a c a a t a c t g g g a c a g c t a c a a c c a t c c c t t c a g a c a g g a t c a g a a g a a c t t a g a t c a t t a t a t a t a c a g t a g c a a c c c t c t a t t g t g t g c a t c a a a g g a t a g a g a t a a a a g a c a c c a a g g a a g c t t t a g a c a a g a t a g a g g a a g a g c a a a a c a a a a g t a a g a c c a c c g c a c a g c a a g c g g c c g c t g a t c t t c a g a c c t g g a g g a g g a g a t a t g a g g g a c a a t t g g a g a a g t g a a t t a t a t a a t a t a a a g t a g t a a a a a t t g a a c c a t t a g g a g t a g c a c c c a c c a a g g c a a g a g a a g a g t g g t g c a g a g a g a a a a			
---	--	--	--

aagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttc ttgggagcagcaggaagcactatggg'gcagcgtc aatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtct ggtatagtgcagcagcagaacaatttgcaggggct attgaggcgaacagcatctgttgcaactcacagtct ggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggct gtggaaagatacctaaggatcaacagctcctggg gatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactg ctgtgccttgggaatgctagtgttgagtaataatctctg gaacagatttggaatcacacgacctggatggagtgg gacagagaaattaacaattacacaagcttaatacact ccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaaga atgaacaagaattattggaattagataaatgggcaag tttgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtag gtttaagaatagttttgtgtactttctatagtgaatag agttaggcagggatattcaccattatcgttcagaccc acctccaaccccgaggggacccgacaggcccgga aggaatagaagaagaaggtggagagagagacaga gacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggt atcgattagactgtagcccaggaatatggcagctag attgtacacatttagaaggaaaagtattcttggttagca gttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaa ttccagcagagacagggaagaacagcatacttcc tcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagt acatacagacaatggcagcaattcaccagtactaca gttaaggccgcctgttgggtgggcggggatcaagca ggaatttggcattccctacaatcccaaagtcaagga gtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaattat aggacaggtaagagatcaggctgaacatcttaagac agcagtacaaatggcagttatccacaattttaaaa gaaaaggggggattggggggtacagtgcagggga			
---	--	--	--

aagaatagtagacataatagcaacagacatacaaac taaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatt ttcgggtttattacaggacagcagagatccagtttg gctgcattgatcacgtgaggctccggtgccgctcag tgggcagagcgcacatcgccacagtccccgagaa gttggggggagggtcggcaattgaaccggtgcct agagaagggtggcgcgggtgaaactgggaaagtga tgtcgtgtactggctccgcttttcccagggtggg ggagaaccgtatataagtgcagtagtcgacctgaac gttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagg taagtccgtgtgtggttccgcgggcctggcctctt tacgggttatggcccttgctgccttgaattactcca cctggctgcagtacgtgattcttgatcccagcttcg ggttggaagtgggtgggagagttcaggccttgcg cttaaggagcccccttcgcctcgtgcttgagttgaggc ctggcctgggcgctggggccgccgctgcgaatct ggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgcttgcataa gtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgac gctttttcttggaagatagcttgaatgcgggccca agatctgcacactggtatttcggttttggggccgcg ggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacat gttcggcgaggcggggcctgcgagcgggccacc gagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggc ctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcg ccccgccctgggcggcaaggctggcccgtcggc accagttgcgtgagcggaaagatggccgcttccg gccctgctgcaggagctcaaatggaggacgcg gcgctcgggagagcgggcgggtgagtcaccaca caaaggaaaaggcctttccgtcctcagccgtcgctt catgtgactccactgagtaccgggcgccgtccagg cacctcgattagtctcgagcttttgagtagctcgtct ttaggtggggggagggttttatgcgatggagtctt			
---	--	--	--

	ccccactgagtgggtggagactgaagttaggcca gettggcacttgatgtaattctccttggaattgccc ttgagtttgatcttggtcattctcaagcctcagacag tggttcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgatc agaggatcACTAGTACCATGTGGCT GCAGTCTCTGCTCCTCTTGGGGA CTGTGCGCCTGTTCTATTTCACAA GGACAGGATCGACATATGATTC GGATGCGCCAACTGATAGATAT AGTCGATCAACTCAAGAATTAT GTGAATGACTTGGTCCCTGAGTT TCTGCCGGCTCCAGAGGACGTT GAAACAAACTGTGAATGGTCAG CGTTTTCATGTTTTCAAAGGCA CAGCTCAAGTCCGCCAATACAG GCAATAACGAGCGGATTATAAA TGTCTCAATTAAAAAGCTCAAG CGCAAACCCCCTTCAACGAATG CTGGTCGCCGCCAGAAACACAG GTTGACCTGTCCCTCCTGTGACT CATACGAGAAGAAACCTCCCAA GGAATTTCTCGAACGCTTTAAGT CACTCTTGCAGAAGATGATTCAT CAGCACTTGAGTAGCCGGACAC ATGGTTCAGAGGATAGTGAGTC TAAGTATGGCCCACCGTGTCCCC CCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTC GGAGGCCCCTCTGTATTCCTGTT TCCCCCAAAGCCCAAGGATACT CTTATGATCTCACGCACTCCGGA AGTAACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGAGTCAGGAAGACCCCGAAG			
--	---	--	--	--

	TCCAGTTTAATTGGTACGTGGAC GGGGTTGAGGTACATAACGCCA AAACGAAACCTCGGGAGGAGCA ATTCAATTCCACTTACCGGGTTG TATCAGTCCTGACTGTACTGCAT CAAGATTGGCTCAACGGGAAAG AGTACAAGTGTAAGGTTAGTAA TAAAGGGCTGCCGTCTAGTATT GAGAAAACGATCAGTAAGGCTA AAGGGCAGCCAAGAGAGCCACA AGTATATACCCTGCCACCCTCTC AGGAGGAGATGACTAAAAACCA AGTGTCACTGACCTGCCTTGTTA AGGGTTTTTACCCATCTGATATA GCAGTAGAGTGGGAATCCAATG GACAGCCAGAGAACAATTATAA GACTACACCTCCCGTCCTTGATA GTGACGGCTCCTTCTTCTTGAT TCTCGACTTACAGTTGATAAGTC CCGCTGGCAGGAGGGTAATGTC TTTAGCTGCAGTGTAATGCACG AAGCTCTTCATAATCACTACACA CAAAAATCATTGAGCCTGTCTCT GGGAAAGATGGCCTTGATTGTG CTCGGCGGAGTTGCAGGCCTGC TCCTTTTTTATTGGACTCGGAATA TTTTTCGGATCTGGAgctactaactca gcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaa ccctggacctATGGAGTACGCTAGTG ATGCGTCCTTGGACCCCGAGGC GCCATGGCCACCGGCCCCGCGA GCTCGAGCCTGTCGAGTGCTGC			
--	---	--	--	--

	CATGGGCTCTGGTCGCTGGGTTG CTCCTCCTTCTGCTTTTGGCCGC GGCTTGTGCAGTGTTTCTTGCTT GCCCGTGGGCAGTTAGCGGTGC TCGCGCATCTCCCGGAAGCGCG GCGAGTCCTCGACTCAGGGAAG GTCCGGAGCTGAGCCCAGATGA CCCCGCCGGTTTGCTGGACCTCC GCCAAGGAATGTTCGCTCAACT CGTTGCGCAAAACGTACTTCTTA TAGACGGCCCTCTTAGTTGGTAC AGTGACCCAGGATTGGCTGGCG TTAGTTTGACAGGCGGACTCAG TTACAAGGAGGATACTAAGGAA CTGGTAGTCGCTAAGGCTGGGG TATACTACGTGTTCTTTCAACTC GAACTGAGAAGGGTGGTTGCGG GAGAAGGATCTGGAAGTGTATC TCTCGCCCTGCACCTCCAACCCC TCAGAAGTGCCGCCGGAGCGGC CGCCCTTGCCCTTACTGTCGACC TGCCCCCGGCTTCTTCAGAAGCG CGAAATAGTGCATTTCGGCTTCC AGGGGCGCCTTTTGCACTTGAG CGCTGGACAGCGCCTCGGGGTC CACCTCCACACGGAAGCGCGGG CGAGGCACGCTTGGCAACTCAC ACAAGGTGCGACGGTTCTCGGC TTGTTTAGGGTTACGCCTGAGAT ACCGGCTGGCCTCCCATCTCCAA GATCCGAGGGATCCtaaATCGGG CTAGCgtcgacaatcaacctctgattacaaat			
--	--	--	--	--

ttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgtgtcct ttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatc atgctattgcttcccgtatggctttcattttctccttg tataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagtgtgg cccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgt ttgctgacgcaacccccactggtggggcattgcca ccacctgtcagctccttccgggactttcgctttcccc ctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgc cttgcccgtgctggacaggggctcggctgttgggc actgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgt cctttccatggctgctcgctgtgttgcacctggatt ctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccc tcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgcc ggctctgcggcctcttccgcttctgccttcgccctc agacgagtcggatctcccttgggccgcctccccgc ctggaattcgagctcgggtacctttaagaccaatgactt acaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaa aaggggggactggaagggttaattcactccaacg aagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctg gttagaccagatctgagcctgggagctctctggetaa ctagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgc cttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtg actctggtaactagagatccctcagacccttttagtca gtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatctt attattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatca gagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatgg ttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaata aagcattttttcactgcattctagtgtggttgcctcaa actcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcc cgcccctaactccgcccatacccgccttaactccgc ccagttccgcccattctccgcccataggctgactaatt tttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctc			
---	--	--	--

	tgagctattccagaagtagtgaggaggctttttgga ggcctagggacgtacccaattcgcctatagtgtggt cgtattac			
--	--	--	--	--

[00115] La Tabla 3 presenta las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos para los dominios de una construcción mbIL21-41BBL descrita en el presente documento. Los plásmidos OT-IL12-(241-262) y OT-CD19-IL12-(297-316, 319-332) se construyeron cada uno en un vector pELNS (un vector de expresión lentiviral autoinactivable de tercera generación) usando técnicas estándar de biología molecular. Se compraron fragmentos de genes (Gblocks o cadenas de ADN) que codifican IL12, enlazadores de glicina-serina, varias bisagras, dominios transmembrana y colas citoplásmicas de Integrated DNA Technologies o Thermo-fisher Scientific. Los fragmentos de genes se insertaron en el vector pELNS y se colocaron bajo el control del promotor EF1a utilizando el ensamblaje Gibson (NEBuilder Hifi). El plásmido ensamblado se transformó en *E. coli* (NEB estable) para la amplificación y la secuencia se confirmó antes de proceder con la producción del virus.

Producción de lentivirus OTLV-IL21-41BBL-001

[00116] El día de la transfección, se sembraron células HEK293T en frascos de cultivo de tejidos recubiertos con colágeno con 15×10^6 células/frasco en un volumen total de 20 ml de medio de crecimiento (medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal al 5 % (FBS) y penicilina/estreptomicina al 1 %). Una hora antes de la transfección, el medio de crecimiento se reemplazó con SFM4Transfx-293 calentado. Las células se transfectaron utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 3000 y el reactivo potenciador P3000 en medios Opti-MEM con OT-IL21-41BBL-001 y plásmidos de empaquetamiento pRSV.Rev, pMDLg/pRRE y pMD2.G (Addgene n.º 122590). El medio se reemplazó 6-8 horas (h) después de la transfección con SFM4Transfx-293. Los sobrenadantes que contenían OTLV-IL21-41BBL-001 se recogieron 24 h después de la transfección, se añadió medio fresco y los sobrenadantes se recogieron de nuevo 48 h después de la transfección. Los sobrenadantes virales se filtraron para eliminar los desechos y se concentraron mediante ultracentrifugación a 25 000 g durante 2 horas a 4 °C. El lentivirus OTLV-IL21-41BBL-001 se resuspendió, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C.

Transducción de células K562 con lentivirus OTLV-IL21-41BBL-001

[00117] Las células K562 se cultivaron en medios de cultivo que contenían RPMI-1640 con L-glutamina 2 mM y FBS al 10 % (RPMI completo, Thermo Fisher). El día de la transfección, se sembraron células K562 en placas de múltiples pocillos a $1,5 \times 10^5$ células/pocillo en 500 μ l de medio de cultivo de células K562. Las células se transdujeron con lentivirus OTLV-IL21-41BBL-001 y luego se centrifugaron a 800 g durante una hora a 32 °C. Las células se incubaron durante 24-48 horas y luego se evaluó la viabilidad y la expresión de IL21 y 4-1BBL mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos eFluor 780 (Thermo Fisher, 1:1000), ficoeritrina 4-1BBL (1:50) y alofococianina IL21 (1:50). Las células K562 transducidas se expandieron en RPMI completo durante 17 días y, posteriormente, se dividieron en alícuotas, se congelaron utilizando medios de congelación de células (BamBanker, Bulldog Bio) y se almacenaron en nitrógeno líquido a largo plazo. Estos K562 transducidos se denominarán K562-IL21-41BBL en este documento.

[00118] Las células K562-IL21-41BBL se irradiaron o trataron con mitomicina C antes de su uso como células alimentadoras en el proceso TIL REP. Para la irradiación, se tomaron células K562-IL21-41BBL de cultivo celular fresco, se centrifugaron y se resuspendieron en RPMI completo a 5×10^6 células/ml. Las células resuspendidas se expusieron a 50-200 Gy en un irradiador de rayos X, después de lo cual las células se lavaron y resuspendieron a 3×10^6 células/ml para su uso inmediato en el proceso REP. Para el tratamiento con mitomicina C, las células se descongelaron, centrifugaron y resuspendieron en medio TIL a 5×10^6 células/ml. Se añadieron 10 μ g/ml de Mitomicina-C a las células y las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, las células se lavaron tres veces con 50 ml de medio TIL y se resuspendieron a 3×10^6 células/ml para su uso inmediato en el proceso REP.

Ejemplo 3. Transducción de TIL con Vectores Lentivirales

Ensamblaje de construcción vectorial IL15

[00119] OT-IL15-292 y OT-IL15-293 (secuencias a continuación) se construyeron cada uno en un vector pELNS (un vector de expresión lentiviral autoinactivante de tercera generación) utilizando técnicas estándar de biología molecular. Los fragmentos de genes (Gblocks) que codifican IL15 con codón optimizado, enlazador GS, bisagra B7-1, dominio transmembrana y colas citoplásmicas se adquirieron de Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT, Coralville, Iowa). Los fragmentos de genes se insertaron en el vector pELNS y se colocaron bajo el control del promotor EF1a utilizando el

ensamblaje Gibson (NEBuilder Hifi). El plásmido ensamblado se transformó en *E. coli* (NEB estable) para la amplificación y la secuencia se confirmó antes de proceder con la producción del virus.

[00120] La Tabla 1 y la Tabla 2 (proporcionadas anteriormente) presentan las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos para los componentes de una construcción mbIL15 constitutiva (OT-IL15-292) y una construcción mbIL15 regulada por ACZ (OT-IL15-293) descritas en este documento. La construcción OT-IL15-293 comprende un dominio desestabilizador etiquetado como CA2 (M1del, L156H) en la Tabla 1.

[00121] La Tabla 2 (proporcionada anteriormente) también presenta las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las construcciones de IL15 constitutiva (IL15-292) y de IL15 regulada por ACZ (IL15-293) descritas en el presente documento.

Producción de lentivirus pseudotipados BaEV

[00122] Las células HEK293T se sembraron en placas de cultivo de tejido recubiertas de colágeno hasta una confluencia del 70 %. Las células se transfectaron con el vector de transferencia pELNS que llevaba construcciones de IL15 constitutivas (IL15-292) o reguladas (IL15-293), así como plásmidos de empaquetamiento pRSV.Rev (Addgene n.º 12253), pMDLg/pRRE (Addgene n.º 12251) y OT-BaEVg -002 (SEQ ID NO: XX) utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 3000 y el reactivo potenciador P3000 (Thermo Fisher) en medio Opti-MEM (Thermo Fisher). El medio se reemplazó 6-8 horas (h) después de la transfección con medio sin suero (SFM4Transfx-293, Cytiva). Los sobrenadantes que contenían virus se recogieron 24 h después de la transfección, se añadió medio nuevo y los sobrenadantes se recogieron de nuevo 48 h después de la transfección. Los sobrenadantes virales se filtraron para eliminar los desechos y se concentraron mediante ultracentrifugación a baja velocidad. Los virus se resuspendieron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

Protocolo de expansión rápida (REP) y transducción de TIL con vectores lentivirales pseudotipados BaEV

[00123] Los TIL generados a partir de una muestra de tumor de cabeza y cuello preparada como se describe en el Ejemplo 1 se diseñaron después de 3 semanas en el cultivo pre-REP. Los TIL se descongelaron y reposaron durante la noche en medios TIL con 6000 IU/ml de IL2 humana. A continuación, se activaron los TIL durante 24 horas en placas de 24 pocillos con microesferas anti-CD3/CD28 (Dynabeads, Thermo Fisher) en una proporción de microesferas a TIL de 3:1 o con OKT3 unido a la placa a 3 µg/ml (anticuerpo anti-humano CD3 Ultra-LEAF purificado, Biolegend) y 6000

IU/ml de IL2 humana. Se usó retronectina (30 µg/ml) para recubrir placas de cultivo celular sin recubrir de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se retiró RetroNectin, las placas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % en PBS y luego se lavaron las placas con PBS. Los sobrenadantes de lentivirus pseudotipados con BaEV, preparados como se describe anteriormente, se diluyeron en medio TIL y se añadieron en un volumen total de 100-200 µl por pocillo para una MOI de 1-4 TU/célula. Las placas que contenían el vector viral se centrifugaron a 1400 g durante 2 horas a 32 °C y luego se eliminó el sobrenadante. Después de la eliminación del sobrenadante, se transfirieron 1,5 x 10⁵ TIL activados por pocillo con 0 - 6000 IU/ml de IL2 y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las células se procesaron de manera similar sin adición de virus y se usaron como control negativo ("no diseñadas"). 24 horas después de la transducción, los TIL se transfirieron a una placa de pocillos GREX 6 M (Wilson Wolf) en un total de 16-40 ml de medio TIL (RPMI-1640 suplementado con GlutaMAX (Thermo Fisher), penicilina/estreptomicina al 1 %, piruvato de sodio 1 mM, HEPES al 1 %, 2-mercaptoetanol 50 µM (Invitrogen) y suero AB humano inactivado por calor al 10 % (Valley Bio)). Células alimentadoras K562 irradiadas o tratadas con Mitomicina-C transducidas con 41BBL y mbIL21 como se describe en el Ejemplo 2 se añadieron al cultivo en una proporción de 2:1 o 5:1 de K562 a TIL. Los TIL transducidos con la construcción mbIL15 regulada recibieron acetazolamida 25 µM (SelleckChem) y los TIL no transducidos recibieron 6000 IU/ml de IL2. Las células se cultivaron durante 14 días en placas GREX para el "protocolo de expansión rápida" o REP, y se añadió o reemplazó el medio según fuera necesario. Durante la expansión, cada pocillo GREX se resuspendió y mezcló completamente, y se tomó una alícuota para el conteo de células (Cellaca Cell Counter, Nexcelom) y tinción de citometría de flujo. Las muestras se tiñeron con anticuerpos CD3-BUV395 (BD), CD56-BV711 (Biolegend), CD4-BV605 (Biolegend), CD8-Alexa Fluor 700 (Biolegend), IL15-DyL650 (LakePharma, conjugado interno), IL15RaFc-Biotin (ACRO Biosystems) con estreptavidina-BV421 secundaria (Biolegend) y tinte de viabilidad fijable eFluor 780 (Thermo Fisher). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Fortessa y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1. La eficacia de la transducción se determinó mediante el porcentaje de células que se tiñeron doblemente positivas para IL15-DyL650 e IL15RaFc-biotina dentro de la población de células CD3 positivas vivas (FIG. 2).

[00124] Los TIL transducidos con lentivirus que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican mbIL15 como se describe en el presente documento pueden denominarse en ejemplos posteriores como "TIL mbIL15". Los TIL transducidos con lentivirus que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican mbIL15 regulada, como OT-IL15-293, también pueden denominarse en ejemplos posteriores como "TIL mbIL15 regulados". Los TIL transducidos con lentivirus que

comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican mbIL15 constitutiva, como OT-IL15-292, también pueden denominarse en ejemplos posteriores como "TIL mbIL15 constitutivos".

Ejemplo 4. Expansión de TIL en el Protocolo de expansión rápida

[00125] Los TIL y las células alimentadoras se generaron como se describe en los Ejemplos 1-3 anteriores. Brevemente, después de 3 semanas en el cultivo pre-REP, los TIL criopreservados se descongelaron y se dejaron descansar durante la noche con 6000 IU/ml de IL2 humana. Luego, los TIL se activaron con Dynabeads anti-CD3/CD28 o en placas de pocillos múltiples recubiertas con OKT3 durante 24 horas, después de lo cual se transdujeron con vectores lentivirales o sin modificar de mbIL15 constitutiva (OT-IL15-292) o GFP (OT-EGFP-001) como una condición no diseñada. 24 horas después de la transducción, los TIL se expandieron con células alimentadoras K562-IL21-41BBL (proporción 2:1 de células alimentadoras:TIL) en placas de pocillos GREX 6M (Wilson Wolf) con 6000 IU/ml de I-2 añadidos también a TIL no diseñados como condiciones experimentales "+IL2". Las células se cultivaron durante 12 días en placas GREX para el "protocolo de expansión rápida" o REP, y se añadió o reemplazó el medio según fuera necesario. En los días 5, 8 y 12 posteriores a la transducción, se resuspendió cada pocillo GREX. Se tomó una alícuota para la tinción de citometría de flujo para cuantificar el número de células IL15+ o GFP+ como se describe en el Ejemplo 3 usando anticuerpos CD3-BUV395 (BD), CD56-BV711 (Biolegend), CD4-BV605 (Biolegend), CD8-Alexa Fluor 700 (Biolegend), IL15-DyL650 (LakePharma, conjugado interno), IL15RaFc-Biotin (ACRO Biosystems) con estreptavidina-BV421 secundaria (Biolegend) y tinte de viabilidad fijable eFluor 780 (Thermo Fisher). Los TIL que expresan GFP requieren IL2 exógena para la expansión en REP, mientras que los TIL que expresan mb-IL15 constitutiva se expanden en ausencia de IL2 (FIG. 3A).

Ejemplo 5. Expansión y supervivencia en un entorno independiente de antígenos

[00126] A continuación, se evaluaron los TIL post-REP para determinar su capacidad de persistir o expandirse en el contexto de un ensayo de supervivencia independiente de antígeno in vitro. Después de 12 días de expansión de REP, las células transducidas con mbIL15 que se expandieron sin citocinas y las células GFP que se expandieron con 6000 IU/mL de IL2 se despernaron, lavaron y se dejaron descansar durante la noche sin citocinas. Al día siguiente, los TIL se sembraron en una placa de 48 pocillos a 5×10^5 células/pocillo en medio TIL con o sin IL2 añadida (6000 IU/ml,

Peprotech). Las células se dividieron o se añadió medio cada dos días durante una duración total de 10 días. También se tomó una alícuota para la tinción de citometría de flujo cada dos días y se cuantificó el número de células IL15+ o GFP+ como se describe en el Ejemplo 3. Los TIL mbIL15 constitutivos se expandieron durante el ensayo de supervivencia de 14 días con o sin IL2 exógena, mientras que los TIL de GFP requerían IL2 para expansión (FIG. 3B).

[00127] En un nuevo estudio que incluía TIL que expresaban mbIL15 regulada, se generaron TIL y células alimentadoras como se describe en los Ejemplos 1-3 anteriores. Brevemente, después de 3 semanas en el cultivo pre-REP, los TIL crioconservados se descongelaron y descansaron durante la noche con 6000 IU/ml de IL2 humana. Luego, los TIL se activaron con Dynabeads anti-CD3/CD28 o en placas de pocillos múltiples recubiertas con OKT3 durante 24 horas, después de lo cual se transdujeron con vectores lentivirales o no diseñados de mbIL15 constitutiva (OT-IL15-292) o mbIL15 regulada (OT-IL15-293). 24 horas después de la transducción, los TIL se expandieron con células alimentadoras K562-IL21-41BBL (proporción 5:1 de células alimentadoras:TIL) en placas de pocillos GREX 6M (Wilson Wolf) con 6000 IU/ml de IL2 añadidas a UT TIL y 25 μ M acetazolamida (SelleckChem) añadida a los TIL mbIL15 regulados. Después de 14 días de expansión, los TIL se aislaron y se sembraron en una placa de múltiples pocillos a 5×10^5 células/pocillo en medio TIL con o sin IL2 añadida (200 IU/ml, Peprotech) o acetazolamida (25 μ M, SelleckChem). Se recogieron pocillos completos para el análisis de la expansión celular mediante recuento celular (Celleca Cell Counter, Nexelom) y el fenotipo mediante citometría de flujo (BD Fortessa) y se añadió citocina/ligando fresco cada 3 días. Como se demuestra en la FIG. 4, en el transcurso de los 15 días de este ensayo, los TIL no diseñados no se expandieron sin citocinas exógenas (expansión de $0,07 \pm 0,03$ veces), pero con IL2 exógena (200 IU/ml) pudieron expandirse más de veinte veces (expansión de $27,8 \pm 0,25$ veces). Por el contrario, los TIL modificados se expandieron significativamente sin la adición de citocinas exógenas; después de 15 días, los TIL mbIL15 constitutivos se expandieron ocho veces (expansión de $8,28 \pm 1,9$ veces) y los TIL mbIL15 regulados que recibieron acetazolamida 25 μ M se expandieron diecisiete veces (expansión de $17,3 \pm 0,82$ veces). Sin la adición de acetazolamida, los TIL mbIL15 regulados se expandieron cuatro veces menos que con el ligando (expansión de $4,52 \pm 0,48$ veces), lo que destaca el papel de la acetazolamida en la regulación de la supervivencia de los TIL mbIL15 regulados.

Ejemplo 6. Expansión y supervivencia en un entorno dependiente de antígenos

[00128] Los TIL y las células alimentadoras se generaron como se describe en los Ejemplos 1-3 anteriores. Brevemente, después de 3 semanas en el cultivo pre-REP, los TIL crioconservados se descongelaron y descansaron durante la noche con 6000 IU/ml de IL2 humana. Luego, los TIL se activaron con Dynabeads anti-CD3/CD28 o en placas de pocillos múltiples recubiertas con OKT3 durante 24 horas, después de lo cual se transdujeron con vectores lentivirales de mbIL15 (OT-IL15-293) regulada o no diseñada. Veinticuatro horas después de la transducción, los TIL se expandieron con células alimentadoras K562-IL21-41BBL (proporción 5:1 de células alimentadoras:TIL) en placas de pocillos GREX 6M (Wilson Wolf) con 6000 IU/ml de IL2 añadidas a UT TIL, y se añadió acetazolamida 25 μ M (SelleckChem) a los TIL mbIL15 regulados. Después de 14 días de expansión, los TIL se criopreservaron en medio de congelación Bambanker (Bulldog Bio). En un momento posterior, los TIL crioconservados se descongelaron y reposaron durante la noche en medios TIL con 200 IU/ml de IL2 (TIL no diseñados) o medios TIL con acetazolamida 25 μ M (TIL mbIL15 regulados). Después del descanso nocturno, los TIL se sembraron en una placa de múltiples pocillos en una proporción de 1:1 con células de melanoma tratadas con mitomicina C en un ensayo de cocultivo de TIL:tumor en medios TIL con o sin IL2 añadida (200 IU/ml, Peprotech) o acetazolamida (25 μ M, SelleckChem), y el ensayo se mantuvo durante 27 días en total. Se incluyó un control solo de vehículo para acetazolamida, con el mismo volumen de DMSO agregado a los grupos de control de vehículo. Las células de melanoma procedían de la línea celular A375 (ATCC), que se modificó con un vector de luciferasa dependiente de puromicina y se trataron con 10 μ g/ml de mitomicina C como se describe anteriormente (Ejemplo 3) para evitar la proliferación de estas células tumorales. Cada 3 días, se mezclaron pocillos de este ensayo de cocultivo y se aisló una alícuota para el análisis de expansión celular por recuento celular (Celleca Cell Counter, Nexelom) y fenotipo por citometría de flujo (BD Fortessa). Cada 3 días se añadieron células de melanoma A375 nuevas tratadas con mitomicina C, así como citocina/ligando fresco en medio TIL. Como se demuestra en la FIG. 5, los TIL mbIL15 regulados con acetazolamida establecen una cinética de expansión estable, e incluso en este entorno dependiente de antígeno, donde la estimulación crónica debería agotar rápidamente los TIL y disminuir los recuentos de células, los TIL transducidos persistieron. Durante el ensayo, los TIL no diseñados no se expandieron sin citocinas exógenas ($0,46 \pm 0,02$ veces de expansión desde el día 1 hasta el día 27), pero con IL2 exógena (200 IU/ml) pudieron expandirse más de veinticinco veces (expansión de $25,4 \pm 4,06$ veces desde el día 1 hasta el día 27). Por el contrario, los TIL modificados se expandieron sin la adición de citocinas exógenas y los TIL mbIL15 regulados notablemente que recibieron acetazolamida 25 μ M se expandieron doce veces (expansión de $12,2 \pm 0,10$ veces desde el día 1 hasta el día 27). Sin la adición de acetazolamida (solo con el control del vehículo), los TIL

mbIL15 regulados se expandieron cuatro veces menos que con el ligando (expansión de $2,68 \pm 0,42$ veces desde el día 1 hasta el día 27), lo que destaca el papel de la acetazolamida en la regulación de la supervivencia de los TIL mbIL15 regulados.

5 Ejemplo 7. Reactividad tumoral de TIL post-REP frescos

[00129] Se generaron TIL de dos donantes de melanoma como se describe en los Ejemplos 1-3. Brevemente, después de 3 semanas en el cultivo pre-REP, los TIL criopreservados se descongelaron y descansaron durante la noche con 6000 IU/ml de IL2 humana. Luego, los TIL se activaron con Dynabeads anti-CD3/CD28 o en placas de pocillos múltiples recubiertas con OKT3 durante 24 horas, después de lo cual se transdujeron con vectores lentivirales o no diseñados de mbIL15 regulada (OT-IL15-293). 24 horas después de la transducción, los TIL se expandieron con células alimentadoras K562-IL21-41BBL (proporción 5:1 de células alimentadoras:TIL) en placas de pocillos GREX 6M (Wilson Wolf) con 6000 IU/ml de IL2 añadidas a TIL no diseñados y 25 μ M acetazolamida (SelleckChem) añadida a los TIL mbIL15 regulados. Después de 14 días de expansión, los TIL se recolectaron, se desperilaron y se dejaron reposar durante la noche con y sin IL2 y acetazolamida. La línea celular de melanoma que expresa luciferasa, A375-FLuc-Puro (ATCC) se resuspendió en medio TIL a 5×10^6 células/ml. Se añadieron 10 μ g/ml de Mitomicina-C a las células, que luego se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, las células se lavaron tres veces con 50 ml de medio TIL. Se añadieron 1×10^5 células A375 por pocillo a una placa tratada con cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. En algunos pocillos, se añadieron 80 μ g/ml de anticuerpo bloqueador HLA-ABC (Biolegend) para bloquear el MHC de clase I en las células objetivo. Los TIL que se dejaron reposar durante la noche se agregaron en una proporción de 1:1 o 3:1 de TIL:A375 para un volumen total de 200 μ L por pocillo. A las 48 horas, se guardó el sobrenadante de cada pocillo y se analizó la concentración de IFN γ mediante MSD. La lisis de las células tumorales se analizó utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiterGlo (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. El porcentaje de lisis se calculó como la luminiscencia en el pocillo de cocultivo menos la fluorescencia de fondo dividida por la luminiscencia en los pocillos de control solo A375 menos la fluorescencia de fondo. Tanto los TIL no transducidos cultivados con IL2 como los TIL mbIL15 regulados expandidos en REP en ausencia de IL2 producen IFN γ aumentado en cocultivo con la línea de melanoma A375 en comparación con los TIL solos (FIG. 6A). Además, hubo una lisis específica de las células tumorales en condiciones de cocultivo medida por la disminución de la luminiscencia de la línea de células objetivo (FIG. 6B). Tanto el porcentaje de lisis específica como la producción

de IFN γ se redujeron en condiciones de cocultivo con anticuerpo bloqueante de MHC de clase I, lo que indica que la citotoxicidad de los TIL contra esta línea de células tumorales depende de MHC de clase I. Este resultado se repite en dos donantes de melanoma.

5 Ejemplo 8. Los TIL mbIL15 persisten a largo plazo *in vivo* sin IL2

[00130] Los TIL de un donante y las células alimentadoras se generaron como se describe en los Ejemplos 1-3 anteriores. Brevemente, después de 3 semanas en el cultivo pre-REP, los TIL criopreservados se descongelaron y descansaron durante la noche con 6000 IU/ml de IL2 humana. Luego, los TIL se activaron con Dynabeads anti-CD3/CD28 durante 24 horas, después de lo cual se transdujeron con vectores lentivirales o no diseñados de mbIL15 constitutiva (OT-IL15-292) o mbIL15 regulada (OT-IL15-293). 24 horas después de la transducción, los TIL se expandieron con células alimentadoras K562-IL21-41BBL (proporción 5:1 de células alimentadoras:TIL) en placas de pocillos GREX 6M (Wilson Wolf) con 6000 IU/ml de IL2 añadidas a TIL no diseñados y 25 μ M acetazolamida (SelleckChem) añadida a los TIL mbIL15 regulados. Después de 14 días de expansión, se recolectaron los TIL, se desperilaron y se prepararon para la transferencia de células adoptivas. Los TIL no diseñados se expandieron 612 veces, los TIL mbIL5 constitutivos se expandieron 1080 veces y los TIL mbIL15 regulados se expandieron 450 veces (FIG. 7A).

[00131] Se adquirieron ratones NSG (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ) de Jackson Laboratories. A ratones hembra de seis a ocho semanas de edad se les infundió sistémicamente 10×10^6 TIL/ratón, con o sin IL2 exógena (Proleucina), o acetazolamida de grado clínico o vehículo, como se describe en la Tabla 4.

Tabla 4: Dosificación grupal *in vivo*

Grupo experimental	Células	Tratamiento exógeno	N
No diseñadas	10×10^6 TIL sin transducir/ratón		10
No diseñadas + IL2	10×10^6 TIL sin transducir/ratón	6×10^5 IU Proleucina/ratón, dosificada IP QD durante los primeros 4 días del estudio	10

mbIL15 constitutiva	10x10 ⁶ TIL mbIL15 constitutivos transducidos/ratón		10
mbIL15 regulada + ACZ	10x10 ⁶ TIL mbIL15 regulados transducidos/ratón	200 mg/kg PO QD acetazolamida, dosis diaria	10
mbIL15 regulada + vehículo	10x10 ⁶ TIL mbIL15 regulados transducidos/ratón	200 mg/kg PO QD vehículo, dosis diaria	10

[00132] Se evaluó la expresión de IL15 en los TIL el día de la terapia celular adoptiva, y los TIL mbIL15 transducidos constitutivos mostraron niveles ligeramente más altos de transducción de mbIL15 ($30,2 \pm 0,46$ % IL15+IL15RaFc+) que los TIL mbIL15 transducidos regulados ($23,6 \pm 1,1$ % IL15+IL15RaFc+), pero ambas poblaciones transducidas eran aceptables para la transferencia celular adoptiva (FIG. 7B). La eficiencia de expresión o transducción de IL15 se evaluó mediante citometría de flujo; las células se incubaron con Fc Block y se tiñeron primero con IL15 conjugada con DyL650 (Lake Pharma, conjugada internamente) e IL15RaFc biotinilada (ACROBiosystems). Después de incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 25 minutos, las células se lavaron en tampón FACS, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón FACS que contenía estreptavidina conjugada con BV421 (Biolegend). Después de incubar en la oscuridad a 4 °C durante 20 minutos, las células se lavaron en tampón FACS, se centrifugaron, se resuspendieron en tampón FACS y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD Fortessa. El análisis ocurrió con FlowJo V10.7.1.

[00133] Los días 7, 14, 21, 32, 39, 46 y 53 después de la terapia celular adoptiva, se aislaron 75 µl de sangre sistémica a través de la recolección de la vena submandibular en tubos que contenían EDTA y se procesaron para la enumeración de TIL. Las muestras de sangre recibieron 1-3 ml de tampón de lisis ACK (Gibco) y se incubaron durante 10-20 minutos para lisar los glóbulos rojos (RBC). Después de la lisis de RBC, las muestras se filtraron a través de un filtro de células de 70 µm, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón FACS. Se aisló una alícuota de cada muestra para el análisis del recuento celular (Celleca Cell Counter, Nexelom) y el resto se utilizó para la evaluación del fenotipo mediante citometría de flujo (BD Fortessa). Para la evaluación fenotípica, las muestras de sangre se tiñeron con anticuerpos específicos para CD3 (BD), CD45 de ratón, CD25 (BD), FoxP3, CD4, CD8, IL15 (Lake Pharma, conjugado interno), KLRG1, CD127, CD45RA, CD45RO, CD95, CD69, CCR7, CD56 e IL15RaFc biotinilado (ACROBiosystems). Los anticuerpos se conjugaron con

FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, DyL650, APC-Cy7, BUV395, BUV737, BV421, BV510, BV605, BV711 o BV786 (anticuerpos antihumanos, todos de Biolegend, a menos que se indique lo contrario). Además, se incluyó un tinte de viabilidad (tinte de viabilidad fijable e780, Invitrogen) para todas las muestras. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Fortessa y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1. Para enumerar los TIL a lo largo del estudio, los TIL se seleccionaron como células vivas, seguidos de linfocitos, seguidos de células CD3⁺ humanas y CD45⁻ de ratón. Como se ve en la FIG. 8A, los TIL no diseñados disminuyeron rápidamente *in vivo*, alcanzando niveles indetectables el día 53 después de la infusión. A los TIL no diseñados que recibieron IL2 exógena les fue mejor, aunque la persistencia fue baja el día 53 después de la infusión, donde los TIL cuantificados fueron de $0,64 \pm 0,17$ %. Por el contrario, el día 53 después de la infusión estaba claro que los TIL transducidos permanecían en niveles detectables sistémicamente, con TIL mbIL15 constitutivos en $5,73 \pm 1,2$ %. Y TIL mbIL15 regulados + ACZ al $10,2 \pm 2,0$ %. El efecto de regulación *in vivo* de la acetazolamida fue claro, ya que en el día 53 después de la infusión los TIL mbIL15 regulados + vehículo eran casi indetectables, al $2,94 \pm 0,36$ %.

[00134] En los días 14 y 53 después de la terapia celular adoptiva, se sacrificó una cohorte de 5 animales por grupo experimental para la recolección terminal. De estos animales, se recogieron 200 μ L de sangre sistémica mediante punción cardíaca, se aisló el bazo y se extrajo médula ósea de 1 fémur. La sangre se procesó como se ha descrito anteriormente. Los bazos se rompieron mecánicamente a través de un filtro de células de 70 μ m, recibieron lisis ACK durante 3 minutos para lisar RBC y se recogieron nuevamente a través de un filtro de células de 70 μ m. La médula ósea (BM) se lavó a través de un fémur y se recogió a través de un filtro de células de 70 μ m. Se aisló una alícuota de cada suspensión de tejido procesada para el análisis del recuento celular (Celleca Cell Counter, Nexelom) y el resto se utilizó para la evaluación del fenotipo mediante citometría de flujo (BD Fortessa). Para la evaluación fenotípica, las muestras se tiñeron con anticuerpos específicos para CD3 (BD), CD45 de ratón, CD25 (BD), FoxP3, CD4, CD8, IL15 (Lake Pharma), KLRG1, CD127, CD45RA, CD45RO, CD95, CD69, CCR7, CD56 e IL15RaFc biotinilado (ACROBiosystems). Los anticuerpos se conjugaron con FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, DyL650, APC-Cy7, BUV395, BUV737, BV421, BV510, BV605, BV711 o BV786 (anticuerpos antihumanos, todos de Biolegend, a menos que se indique lo contrario). Además, se incluyó un tinte de viabilidad (tinte de viabilidad fijable e780, Invitrogen) para todas las muestras. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Fortessa y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1. Para enumerar los TIL a lo largo del estudio, los TIL se seleccionaron como células vivas, seguidos de linfocitos, seguidos de células CD3⁺ humanas y CD45⁻ de ratón. Como se demuestra en la FIG. 8B y la FIG. 8C, los TIL

transducidos se identificaron en niveles elevados en los órganos linfoides periféricos el día 14 y el día 53 después de la infusión, y los TIL mbIL15 regulados tratados con ACZ demostraron una persistencia significativamente mayor que sus equivalentes tratados con vehículo ($p < 0,005$).

[00135] La Tabla 5 muestra las secuencias de vectores virales para las diversas construcciones descritas en el presente documento.

Tabla 5: Secuencias de vectores virales

Vector viral	Secuencia NA
OT-EGFP-001	SEQ ID NO:52 gcgcgctcactggccgctgtttacaacgctgtgactgggaaaaccctggcgttaccaacttaatgccttgacgac atcccccttgcgcagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgccctccaacagttgcgagcctgaat ggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcaataagcgcggggtgtggtggttacgcgagcgtgaccgctaca cttgccagcgccctagcggcgctccttgccttcttccctccttctcgcacgttcgccggcttccccgtcaagctc taaatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggt cacgtagtgggcatcgccctgatagacggttttgcctttgacgttgagtcacgttcttaataggactcttgtt ccaaactggaacaacactcaaccctatctcggctctattctttgattataagggatttgcgatttcggcctattggttaa aaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaatttaacaaaatattaacgcttacaatttagtgggcacttttcgggga aatgtgcgcggaaccctatttgttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaat gcttcaataatattgaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgtcgccctattcccttttgcggcatttgcct tctgttttctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcagagtggtgttacatc gaactggatctcaacagcggtgaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtt ctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgggggaagagcaactcggtcggcgcatatactattctcagaatg acttggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccat aaccatgagtataactgcggccaacttacttctgacaacgatcgaggaccgaaggagctaaccgctttttgca caacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtg acaccacgatgcctgtagaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttacttagcttccggca acaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctggttatt gctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtgaagccctccg tatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctc actgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattttaattaaaagg

atctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccg tagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaacaaaaaaccaccgctac cagcgggtggtttgttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacc aaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgct aatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggat aaggcgacgggtcgggctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaact gagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaag cggcagggctggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgccttggtatctttatagtcctgtcgg gtttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaa cgcggccttttacggttcttgccctttgctggcctttgctcacatgttcttctcgttatcccctgattctgtggataac cgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgagg aagcggaagagcgcccaatacgcgaaccgcctctccccgcgcgttgccgattcattaatgcagctggcacgacag gtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccgccaggttt acactttatgctccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacatga ttacgccaagcgcgaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatac tctttagtcttgaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgatt ggtggaagtaagggtgtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactg aattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataaacgggtctctctggttagaccagatctgag cctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgttcaagtagtgtgt gcccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtggaaaatctctagcagtggcgc ccgaacagggacttgaaagcgaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgc acggcaagaggcgagggggcggcgactggtgagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagaga tggtgtcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggga aagaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttag aaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacatccctcagacaggatcagaagaacttagatcat tatataatacagtagcaaccctctattgtgtcatcaaaggatagagataaaagacaccaagggaagctttagacaagat agaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagat atgagggacaattggagaagtgaattatataataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaag gcaaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgggaataggagcttgttcttgggttcttgggagcag caggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcag cagaacaatttgctgagggctattgagggcgaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccag gcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcattt

gcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttgaatcacacgacctggatgga gtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaa tgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaa ttattcataatgatagtaggaggcttgtaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaaatagattaggcaggg atattcaccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacagggccgaaggaatagaagaagaa ggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgattagactgtagcccagg aatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagtatatcttgtagcagttcatgtagccagtggatatatagaag cagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacagcatacttctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaa acagtacatacagacaatggcagcaatttcaccagtactacagttaaggccgctgttggtgggcggggatcaagca ggaatttggcattccctacaatcccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaattataggac aggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtagacaatggcagttatccacaattttaaaagaaaagggg ggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaa acaaattacaaaaattcaaaatttctgggttattacagggacagcagagatccagtttggctgcattgatcacgtgagg ctccggtgccgtcagtgggcagagcgcacatcgccacagtccccgagaagttggggggaggggtcggaattg aaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgtgtgtactggctccgcttttcccaggg gtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttgcgccagaacacagg taagtcccgtgtgtggtcccgccgctggcctctttacgggttatggccttgcgtgcctgaattactccacctggc tgcagtagctgattcttgatcccagcttcgggttgaagtgggtgggagagtgcaggccttgcgttaaggagccc cttcgctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgcccgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcc tgtctcgctgcttgcataagtccttagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggaagatagtcttg taaatcggggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcccggcgacggggcccgtgcgtcccag cgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgacgggggtagtctcaagctggccg gcctgctctggtgcctggcctcgcgccgctgtatcgccccgcctgggcggcaaggctggcccgtgcgcacc agttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcggcgtcggg agagcgggcgggtgagtcacccacaaaaggaaaaggccttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccactg agtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagtctcgagcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggggtt ttatgcgatggagttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttg aatttgcccttttgagtttgatcttggtcattctcaagcctcagacagtgggtcaaagtttttcttccatttcaggtgcg tgatctagaggatccACCatggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctg gacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgac cctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctgtgaccacctgacctacggcgtgc agtgttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtcgccatgcccgaaggctacgtccag
--

	gagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgaggcgacacacctg gtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaac tacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaa catcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgct gcccgacaaccactacctgagcaccagtcgccctgagcaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggtcct gctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaagtcgacaatcaacctctgg attacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgccttt gtatcatgctattgcttccgatatggctttcattttctcctctgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggc ccgttgctcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacct gtcagctcctttccgggactttcgtttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggccgctgc tggacaggggctcggtgttgggcaactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctc gcctgtgttgcacctggattctgcgcgggacgtcctctgtactgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctc ccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttcgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggcc gcctccccgcctggaattcgagctcggtagctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaa aagaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgcttttgccttgactgggtctctctg gttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgctaagcctcaataaagcttgccttga gtgcttcaagtagtgtgtcccgtctgtgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaa atctctagcagtagtagttcatgtcatcttattttagtattataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagagga actgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttactgcatt ctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaactccgcccacccg cccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaatttttttattatgcagaggccgaggccgcc tcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggacgtaccaattcgcctatagtga gtcgtattac
OT-IL15- 292	SEQ ID NO:53 tttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaaga gcgccaatacgcgaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttccccgactg gaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgctt ccggctcgtatgttgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacatgattacgccaagc gcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactctttagtctt gcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagta aggtggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcat tgacagagatattgtatttaagtcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagc

tctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgcttcaagtagtggtgccgtctgt tgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgccgcccgaacagg gacctgaaagcgaaaggggaaaccagagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacgggaagagg cgagggggcggcgactgggtgagtacgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgaga gcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaata taaattaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaa ggctgtagacaaatactgggacagctacaacctcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacag tagcaacctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagacaagatagaggaagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgaggggacaa ttggagaagtgaattatataataataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaag agtgggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcacta tgggcgcagcctcaatgacgtgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgc tgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctg gctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggattgggggtgctctggaaaactcattgcaccactgctg tgcccttggaaatgctagtgtggagtaataatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagaga aattaacaattacacaagcttaatacactcctaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattat tggaattagataaatgggcaagttgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgata gtaggaggcttggtaggtttaagaatagttttgtgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatc gtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggatagaagaagaaggtggagagagag acagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgattagactgtagcccaggaatatggcagctag attgtacacatttagaaggaaaagtattcttggtagcagttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccag cagagacagggcaagaaacagcatacttctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagac aatggcagcaatttcaccagtactacagttaaggccgcctgttggtggcggggatcaagcaggaatttggcattccct acaatcccaaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaattataggacaggtaagagatcagg ctgaacatcttaagacagcagtaacaaatggcagttatcatccacaattttaaagaaaaggggggattgggggtaca gtgcagggggaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaatc aaaattttcgggttattacagggacagcagagatccagtttgctgcatacgcgtcgtgaggctccggtgcccgtcag tgggcagagcgcacatcgccacagtcgccgagaagttggggggaggggtcggaattgaaccggtgcctagag aagggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgt atataagtgcagtagtcgccgtgaacgttttttgcacgggtttgccccagaacacaggttaagtccgtgtgtggt tcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattactccacctggctgcagtacgtgattctt gatcccagcttcgggttgaagtgggtgggagagttcaggcccttgcgcttaaggagccccttcgctcgtgcttga
--

ggtgaggcctggcctgggcgctggggccgccgctgcgaatctggtggcaccttcgcctgtctcgtcttccgat aagtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgcttttttctggcaagatagcttgtaaatcggggccaaga tctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcga ggcggggctgcgagcgcggccaccgagaatcgacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcct ggcctcgcgcccgtgtatcgccccgccctggcgggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggga aagatggcgccttccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggagggtg agtcaccacacaaaggaaaaggccttccgtcctcagccgtcgttcatgtgactccacTgagtaccgggcgcc gtccaggcacctcgattagtctcgTgcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggggtttatgcgatggagt tccccacactgagtgggtggagactgaagttagggcagcttggcacttgatgtaattctccttgggaatttgccttttga gtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttctccatttcaggtgtcgtgagctagACT AGTaccATGGACATGCGGGTGCCTGCACAACTTCTGGGCCTGCTGTTGTT GTGGCTGTCTGGAGCCCGGTGTAATTGGGTAAATGTTATCAGTGATCTC AAGAAGATAGAGGATCTCATCCAGTCCATGCATATTGATGCCACGCTG TACACAGAAAGCGATGTGCATCCTAGCTGTAAGGTGACAGCGATGAAG TGTTTTCTTTTGGAGCTGCAGGTAATTAGTCTTGAGTCCGGCGATGCCA GCATTCATGATACCGTAGAAAACCTTGATTATCCTGGCCAACAATTCTCT GTCCTCAAACGGAAACGTAACCGAGAGCGGTTGTAAAGAATGTGAAG AACTGGAAGAAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCATTTCGTTTACA TCGTACAAATGTTTCATAAATACGTCAGGATCTGGTTCTGGTTCCGGAA GTGGATCTGGTTTCAGGGTCCGGTAGTGGATCTGGGTCAGGAAGTGGAA GCGGTAGTGGGTCTGGATCTAAACAAGAGCACTTTCCTGATAACCTGT TGCCGAGCTGGGCGATTACGCTTATCAGTGTAACGGCATCTTTGTAAT ATGCTGTCTGACCTACTGCTTCGCACCAAGGTGCCGGGAGAGAAGGAG AAATGAAAGACTGAGAAGGGAGAGCGTGAGACCTGTGGGATCCtaaGC TAGCGTCGGCaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgcctttta cgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggcttccattttctccttctataaatcc tggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgttgctgacgcaac ccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggacttgcgttccccctccctattgccacggcgg aactcatcgccgcctgccttgcgcgtgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcgg ggaagctgacgtccttccatggctgtcgcctgtgttgcacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcctt cggccctcaatccagcggaccttccctcccgcggcctgctgccggctctcgggcctcttccgcgtcttcgccttcgcc tcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgcctggaattcgagctcggtagctttaaagaccaatgacttaca

aggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaa gatctgcttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacca ctgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgactctggttaactagagat ccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttattataacttgcaa agaaatgaatatcagagagtgaaggaacttgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatgcatcacaaatt tcacaaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgtgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagcta tcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgcccattggtgactaatttttttattatgcagaggccgagg ccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcgtcgagacgtaccc aattcgccctatagtgtgctgtattacgcgcgctcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgt taccacacttaatgccttgcagcacatcccccttccgagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgccc ttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgcctgtagcggcgcatgaagcgcggcgggtgtg gtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgccttagcggcgctccttccgtttcttccctcctttctcgc acgttcgcccgttttccccgtcaagcttaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgccttacggcacctcga ccccaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagacggttttgcctttgacgttgg agtcacggttcttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattctttgattataag ggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatgaacgcgaatttaacaaaaatattaacg tttacaatttcccagggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaaccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgt atccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtg tcgcccttattccctttttgcggcattttgccttctctgttttgcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaa gatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatcacaacagcggaagatccttgagagtttgcggccgaa gaacgttttcaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagca actcggtcgccgatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggc atgacagtaagagaattatgcagtctgccataacctgagtataactgcggccaacttactctgacaacgatcg gaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccgggagc tgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactatta actggcgaactacttactctagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttc tgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgc agcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaac gaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttt agattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacg tgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatct gctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaa

	ggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaac tctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtggtgtgctccagtggcgataagtcgtgtcttacc gggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagccc agcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagccacgcttcccgaag ggagaaaaggcggacaggtatccggaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttccagggg gaaacgcctggatctttatagctctgctgggtttgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggg ggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtcctggccttttctggccttttctcacatgttct ttcctgcgttatccccgtattctgtggataaccgtattaccgcc
OT-IL15- 293	SEQ ID NO:54 tttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcggaaga gcgcccaatacgc aaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttccccgactg gaaagcgggcagtgagcgcacgaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggtttacactttatgctt ccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagc gcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactctttagtctt gcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagta aggtggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcat tgacagagatattgtatttaagtcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagc tctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcctcaagtagtgtgtgcccgctgt tgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtgccgcccgaacagg gacctgaaagcgaaagggaaaccagagctctctcgacgcaggactcggcttgcctgaagcgcgcacggcaagagg cgagggggcgcgactggtgagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgaga gcgtcagttattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaata taaattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgtagaaacatcagaa ggctgtagacaaatactgggacagctacaacatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacag tagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagag caaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgaggggacaa ttggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaag agtgggtgcagagagaaaaagagcagtggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcacta tgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaattgc tgaggggctattgaggcgaacagcatctgttgaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctg gctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggttgccttggaaaactcatttgcaccactgctg tgccttggaatgctagtgtgagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagaga

aattaacaattacacaagcttaatacactcctaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattat tggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgata gtaggaggcttggtaggtttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatc gtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaagggtggagagagag acagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggatcgtattagactgtagcccaggaatatggcagctag attgtacacatttagaaggaaaagtattcttggtagcagttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccag cagagacagggcaagaaacagcatacttctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagac aatggcagcaatttcaccagtactacagttaaggccgctgttgggtggcggggatcaagcaggaatttggcattccct acaatcccaaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaattataggacaggttaagagatcagg ctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagttatccacaattttaaagaaaaggggggattgggggttaca gtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattc aaaattttcggtttattacagggacagcagagatccagtttggctgcatacgctcgtgaggctccggtgccgtcag tgggcagagcgcacatcgccacagtcgccgagaagttggggggaggggtcggaattgaaccggtgcctagag aagggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgt atataagtgcagtagtcgctgaacgttcttttcgcaacgggttgcgccagaacacaggttaagtgcctgtgtggt tcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcgtacgtgattctt gateccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgttaaggagccccttcgctcgtgcttga gttgaggcctggcctgggcgtggggccgcccgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgctttcgat aagtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgcttttttctggcaagatagcttgttaaatggggccaaga tctgcacactgggtatttcggtttttggggccgcgggcgggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcga ggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgagcgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcct ggcctcgcgccgctgtatcgccccgccctggcgggcaaggctggcccggctggcaccagttgcgtgagcggga aagatggccgcttccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggagggtg agtcaccacacaaaggaaaaggccttccgtctcagccgtcgttcatgtgactccacTgagtaccgggcgcc gtccaggcacctcgattagtctcgTgcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggggtttatgcgatggagt tccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgaattctccttgaatttgcctttttga gtttggatcttggtcatttcaagcctcagacagtgggtcaaagttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagACT AGTaccATGGACATGCGGGTGCCTGCACAACTTCTGGGCCTGCTGTTGTT GTGGCTGTCTGGAGCCCGGTGTAATTGGGTAAATGTTATCAGTGATCTC AAGAAGATAGAGGATCTCATCCAGTCCATGCATATTGATGCCACGCTG TACACAGAAAGCGATGTGCATCCTAGCTGTAAGGTGACAGCGATGAAG TGTTTTCTTTTGGAGCTGCAGGTAATTAGTCTTGAGTCCGGCGATGCCA
--

	GCATTCATGATACCGTAGAAAACCTTGATTATCCTGGCCAACAATTCTCT GTCCTCAAACGGAAACGTAACCGAGAGCGGTTGTAAAGAATGTGAAG AACTGGAAGAAAAGAACATCAAGGAGTTTCTGCAATCATTCGTTTACA TCGTACAAATGTTTCATAAATACGTCAGGATCTGGTTCTGGTTCCGGAA GTGGATCTGGTTCAGGGTCCGGTAGTGGATCTGGGTCAGGAAGTGGAA GCGGTAGTGGGTCTGGATCTAAACAAGAGCACTTTCCTGATAACCTGT TGCCGAGCTGGGCGATTACGCTTATCAGTGTAACGGCATCTTTGTAAT ATGCTGTCTGACCTACTGCTTCGCACCAAGGTGCCGGGAGAGAAGGAG AAATGAAAGACTGAGAAGGGAGAGCGTGAGACCTGTGGGATCCTCCC ATCACTGGGGGTACGGCAAACACAACGGACCTGAGCACTGGCATAAG GACTTCCCCATTGCCAAGGGAGAGCGCCAGTCCCCTGTTGACATCGAC ACTCATACAGCCAAGTATGACCCTTCCTGAAGCCCCTGTCTGTTTCCT ATGATCAAGCAACTTCCCTGAGAATCCTCAACAATGGTCATGCTTTCA ACGTGGAGTTTGATGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAAGGGAGGAC CCCTGGATGGCACTTACAGATTGATTACAGTTTCACTTTCACTGGGGTTC ACTTGATGGACAAGGTTTCAGAGCATACTGTGGATAAAAAGAAATATGC TGCAGAACTTCACTTGGTTCACTGGAACACCAAATATGGGGATTTTGG GAAAGCTGTGCAGCAACCTGATGGACTGGCCGTTCTAGGTATTTTTTTG AAGGTTGGCAGCGCTAAACCGGGGCCATCAGAAAGTTGTTGATGTGCTG GATTCCATTAAAACAAAGGGCAAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGAT CCTCGTGGCCTCCTTCCTGAATCCCTGGATTACTGGACCTACCCAGGCT CACTGACCACCCCTCCTCTTCTGGAATGTGTGACCTGGATTGTGCTCAA GGAACCCATCAGCGTCAGCAGCGAGCAGGTGTTGAAATTCCGTAAACT TAACTTCAATGGGGAGGGTGAACCCGAAGAACTGATGGTGGACAAC GGCGCCCAGCTCAGCCACTGAAGAACAGGCAAATCAAAGCTTCCTTCA AAtaaGCTAGCGTCGACaatcaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggtattcttaactatggt gtctcttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgettcccgatggctttcattttctctcttg tataaatcctggttgctgtctctttatgaggagtgtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtgtgcactgtgtttgctg acgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgcc acggcggaactcatcgccgctgccttgcccgtgtgtgacaggggctcggtgttgggactgacaattccgtggt gttgctggggaagctgacgtcctttccatggtgtgtgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgct acgtcccttggccctcaatccageggaccttcttcccggcgctgtgccggctctgcggccttccgcgtcttcg
--	--

ccttcgccctcagacgagtcggatctcccttggggccgcctccccgcctggaattcgagctcggtaccttaagaccaa tgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacg aagacaagatctgcttttgccttgactgggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagg gaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgcttcaagtagtggtgcccgtctgttggtgactctggtaa ctagagatccctcagaccctttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttata acttgcaaagaaatgaatatcagagagtgaaggaactgtttattgcagcttataatgggtacaaataaagcaatagca tcacaaattcacaaataaagcatttttactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgg ctctagctatcccgccctaactccgccagttccgccattctccgcccattggctgactaattttttatttatgcagag gccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggccctaggcttttgcgtcag acgtaccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaa ccctggcggttaccacacttaatgccttgagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgac cgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgacgcgcctgtagcggcgattaagcgcg gcggtgtggtgttacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcgccttagcggcgctccttcgctttctccctt cctttctgccacgttcgccggttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgctttacg gcacctcgacccccaaaaaacttgattagggatggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacggttttcgccctt tgacgttggagtccacgttcttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctattcttt gatttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaatttaaca aatattaacgtttacaatttccagggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttattttctaaatcat tcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagatgtagattcaa catttccgtgtcgccctattccctttttgcggcattttgccttcctgttttgcacccagaaacgctggtgaaagtaaaa gatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttc gccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatccgattgacgccggg caagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactaccagtcacagaaaagcatctta cggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataaacactgcggccaacttacttctgac aacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttggga accggagctgaatgaagccatacacaacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgc aaactattaactggcgaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcag gaccacttctgcgtcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcgg tatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtattatctacacgacggggagtcaggcaactat ggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagtttactca tatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaat cccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctg
--

	cgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgtttgccggatcaagagctaccaact ttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccac ttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactcctgttaccagtgggtgctgccagtggcgataagtc gtgtcttaccgggttgactcaagacgatatgctaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggttcgtgc acacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacg cttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgaggggagc ttccagggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctgtacttgagcgtcgattttgtgatgctc gtcagggggggcggagcctatggaaaacgccagcaacgcggccttttacggcttctggccttttgcctggcctttgct cacatgttcttctcgcttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcc
--	---

Ejemplo 9. Protocolo de expansión rápida con transfección retroviral de TIL

[00136] Los TIL pre-REP se prepararon de forma similar a la del Ejemplo 1. En resumen, se
5 obtuvieron muestras de melanoma y de tumores de cabeza y cuello de Cooperative Human Tissue
Network. Las muestras tumorales se cortaron en fragmentos de 1-3 mm en solución salina equilibrada
de Hanks (HBSS) y los fragmentos se colocaron en recipientes Grex a 1-10 fragmentos/frasco en
medio de cultivo TIL (RPMI-1640 complementado con GlutaMAX (Thermo Fisher),
Penicilina/estreptomicina al 1 %, piruvato de sodio 1 mM, HEPES al 1 %, 2-mercaptoetanol 50 μ M
10 (Invitrogen) y suero AB humano inactivado por calor al 10 % (Valley Bio) que contiene 6000 IU/ml
de IL2 (Peprotech), 10 μ g/ml de anticuerpo 41BB (Creative BioLabs), 30 ng/ml de anticuerpo CD3
(OKT3, Biolegend) y 0,1 mg/ml de normocina (InvivoGen). Los recipientes fueron alimentados de
forma rutinaria cuando se identificó el agotamiento de nutrientes, aproximadamente cada 3-4 días.
Este proceso de cultivo se conoce como protocolo de expansión pre-rápida (pre-REP). Después de
15 pre-REP, los TIL se dividieron en alícuotas, se congelaron en medios de congelación de células
(BamBanker, Bulldog Bio o Cryostor-10, STEMCELL Technologies) y se almacenaron a largo plazo
en nitrógeno líquido.

[00137] Los TIL pre-REP se descongelaron y reposaron durante la noche en medios TIL con
6000 IU/ml de IL2 humana. A continuación, se activaron los TIL durante 24 h en placas de 24 pocillos
20 recubiertas con OKT3 a 3 μ g/ml (anticuerpo anti-CD3 humano purificado Ultra-LEAF, Biolegend) y
6000 IU/ml de IL2 humana. Se usó retronectina (30 μ g/ml) para recubrir placas de cultivo de células
de cultivo sin tejido de 24 pocillos durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se retiró RetroNectin, las
placas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % en PBS y luego se lavaron las placas
con PBS. Los sobrenadantes del vector retroviral gamma pseudotipado del virus de la leucemia del

simio Gibbon (GALV) (donde la expresión de mbIL15-CA2 DRD está bajo el control de un promotor derivado del LTR del virus de la leucemia murina) se prepararon a partir de una línea celular productora estable. El sobrenadante del vector retroviral se diluyó en medio TIL y se añadió en un volumen total de 500 µl por pocillo, lo que dio como resultado una MOI aproximada de 16-80. Las placas que contenían el vector viral se centrifugaron a 1400xg durante 2 horas a 32 °C y luego se eliminó el sobrenadante. Después de la eliminación del sobrenadante, se transfirieron $1,0 \times 10^6$ TIL activados por pocillo con 100 IU/ml de IL2 y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las células se procesaron de manera similar sin adición de virus y se usaron como control negativo ("no diseñadas"). 24 horas después de la transducción, 5×10^5 TIL se transfirieron a una placa de pocillos GREX 6 M (Wilson Wolf) en un total de 60 ml de medio TIL por pocillo (RPMI-1640 suplementado con GlutaMAX (Thermo Fisher), penicilina/estreptomicina al 1 %, piruvato de sodio 1 mM, HEPES al 1 %, 2-mercaptoetanol 50 µM (Invitrogen) y suero AB humano inactivado por calor al 10 % (Valley Biomed)). Se descongelaron células alimentadoras K562 irradiadas (transducidas con 4-1BBL y mbIL21 e irradiadas a 100 Gy) o células alimentadoras PBMC irradiadas (irradiadas a 25 Gy) y se añadieron al cultivo en una proporción de 50:1 K562:TIL o 200:1 PBMC: TIL, respectivamente. Los TIL transducidos con la construcción mbIL15 regulada recibieron acetazolamida 25 µM (SelleckChem) y los TIL no transducidos recibieron 6000 IU/ml de IL2. Las células se cultivaron durante 14 días en placas GREX para el "protocolo de expansión rápida" o REP, y se añadió o reemplazó el medio según fuera necesario.

Ejemplo 10. TIL mbIL15 modificados regulados: señalización y polifuncionalidad

ACZ regula la expresión y señalización de IL15 en TIL mbIL15 regulados de forma dependiente de la dosis.

[00138] Los TIL pre-REP se prepararon de manera similar a los métodos de los Ejemplos 1-3 y 9, y se generaron TIL mbIL15 no diseñados de acuerdo con lo descrito en los Ejemplos 1-3 y 9. El compromiso de la vía de señalización de IL15 da como resultado la fosforilación de los transductores de señal posterior, incluida la proteína del factor de transcripción STAT5 y la proteína ribosómica S6. Para demostrar que la expresión de mbIL15 regulada por ACZ da como resultado la señalización de IL15 en los TIL mbIL15 regulados, se empleó un ensayo basado en citometría de flujo de fósforo de la siguiente manera: los TIL mbIL15 regulados crioconservados obtenidos de cuatro donantes humanos (pacientes 1-4), se descongelaron y luego se dejaron reposar en medios libres de ACZ

durante 24 horas. A continuación, los TIL mbIL15 regulados se regularon durante 18 horas en presencia de un rango de concentraciones de ACZ que incluía 0,1, 1, 2,5, 5, 10, 25, 100 μ M, así como el control del vehículo. A continuación, se recogieron los TIL mbIL15 regulados para tinción y análisis FACS.

5 **[00139]** Brevemente, las células se tiñeron usando anticuerpos para CD3, CD4, CD8, IL15 y un marcador Live/Dead. Luego, las células se fijaron en formaldehído al 2 % (BD Cytotfix) y se permeabilizaron con un tampón a base de metanol (Tampón BD Phospho Perm III) antes de teñirlas con anticuerpos específicos para STAT5 fosforilado (Biolegend) y S6 (Cell Signaling Technology). Las células se adquirieron en el BD Symphony y se analizaron utilizando el software FlowJo.

10 **[00140]** Con concentraciones crecientes de ACZ, la expresión de mbIL15 también aumenta, estabilizándose en alrededor de 10-25 μ M de ACZ. FIG. 9A. De manera similar, la intensidad de tinción de pSTAT5 y pS6 aumentó con concentraciones más altas de ACZ en TIL mbIL15 regulados, lo que indica un mayor grado de señalización de IL15. Estos resultados muestran una relación dependiente de la dosis entre la expresión y señalización de ACZ e IL15. FIG. 9B-E y FIG. 10.

15 La expresión constitutiva de mbIL15 y la regulación de ACZ de TIL mbIL15 regulados participan en la vía de señalización de IL15.

[00141] Con el fin de comparar diferentes estrategias para la expresión de IL15, se utilizaron TIL que expresan constitutivamente mbIL15 y TIL mbIL15 regulados. Los TIL no diseñados crioconservados, los TIL mbIL15 constitutivos y los TIL mbIL15 regulados de tres donantes humanos se descongelaron y luego se dejaron reposar en medios libres de ACZ durante 24 horas. A continuación, los TIL anteriores se regularon en medios de cultivo durante 18 horas, de la siguiente manera: (1) se añadieron 200 IU/ml de IL2 (Peprotech) a los TIL no diseñados; y (2) se añadió ACZ 25 μ M a cultivos TIL mbIL15 regulados. El vehículo se agregó a las condiciones de control. Después del tratamiento de 18 horas, las células se tiñeron usando anticuerpos para CD3, CD4, CD8, IL15 y un marcador Live/Dead. Luego, las células se fijaron en formaldehído al 2 % (BD Cytotfix) y se permeabilizaron con un tampón a base de metanol (Tampón BD Phospho Perm III) antes de teñirlas con anticuerpos específicos para STAT5 fosforilado (Biolegend) y S6 (Cell Signaling Technology). Las células se adquirieron en el BD Fortessa y se analizaron utilizando el software FlowJo.

[00142] Como se muestra en la FIG. 11, IL2 comparte una vía de señalización superpuesta con IL15, incluida la señalización a través de STAT5 y S6. Los TIL no diseñados cultivados con IL2 mostraron un mayor compromiso de la vía de señalización en comparación con la condición del

vehículo correspondiente. FIG. 11. De manera similar, tanto la expresión constitutiva de mbIL15 como los TIL mbIL15 regulados + ACZ mostraron una mayor fosforilación de STAT5 y S6 en comparación con el control de vehículo + TIL mbIL15 regulado. FIG. 11.

5 Los TIL mbIL15 regulados demuestran una mayor polifuncionalidad que los TIL no diseñados + IL2

[00143] Las células T polifuncionales tienen la capacidad de producir múltiples moléculas efectoras simultáneamente en respuesta a un estímulo. Además, la polifuncionalidad se correlaciona con la eficacia de las células T. Para comparar la polifuncionalidad de los TIL no diseñados con los
10 TIL mbIL15 regulados, las células crioconservadas se descongelaron y se dejaron reposar en medios libres de IL2 y ACZ durante 24 horas. A continuación, la regulación de las células ocurrió de la siguiente manera: se regularon los TIL no diseñados durante 18 horas en presencia de un rango de concentraciones de IL2 (20, 200, 1000 y 6000 IU/ml, o vehículo); los TIL mbIL15 regulados se regularon en presencia de ACZ (ACZ 0,1, 1, 5, 10, 25, 100 μ M o vehículo) durante 18 horas. Luego,
15 las células se estimularon durante 6 horas con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina (Biolegend) en presencia de brefeldina A (Biolegend) y monensina (Life Technologies Corporation). Se usaron como control TIL no diseñados sin estimular y TIL mbIL15 regulados sin estimular. Después de la estimulación, las células se recogieron para tinción y análisis FACS.

[00144] Brevemente, las células se tiñeron usando anticuerpos para CD3, CD4, CD8, IL15 y
20 un tinte de viabilidad. Luego, las células se fijaron con formaldehído y se permeabilizaron (kit BD Cytotfix/Cytoperm), luego se tiñeron usando anticuerpos para TNF α e IFN γ (Biolegend). Las células se adquirieron en el BD Fortessa y se analizaron utilizando el software FlowJo. Las células que son doblemente positivas para la expresión de TNF α e IFN γ se consideran polifuncionales.

[00145] Como se muestra en la FIG. 12, mientras que todas las condiciones de cultivo contenían
25 algunas poblaciones polifuncionales, la polifuncionalidad en los TIL mbIL15 regulados aumentó con concentraciones más altas de ACZ. FIG. 12A, 12B. Además, los TIL mbIL15 regulados eran más polifuncionales que los TIL + IL2 no diseñados del mismo donante. FIGs. 12A, 12C. El porcentaje de TIL mbIL15 regulados que expresan mbIL15 también mostró una relación dosis-respuesta con la dosis de ACZ.

30

Ejemplo 11. Eficacia *in vivo* de los TIL de IL15 regulados

Eficacia de PDX163A

[00146] Se creó un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) a partir de una muestra de melanoma primario reciente (n.º de tumor del paciente M1200163A) adquirida de un banco de tumores (Cooperative Human Tissue Network: CHTN). Se estableció un modelo de ratón utilizando ratones hembra NSG (Jackson Laboratory; n.º de catálogo 000557). Una vez que se estableció el modelo, se implantaron asépticamente secciones criopreservadas de tumor en ratones inmunocomprometidos anestesiados con isoflurano (ratones hembra NSG; Jackson Laboratory; n.º de catálogo 000557). Se permitió que los tumores crecieran hasta aproximadamente 1000 mm³ - 2000 mm³ y luego se sacrificó a los ratones. Los tumores se recolectaron asépticamente, se seccionaron en secciones de ~100 mg y luego se implantaron en una cohorte más grande de ratones que se dejaron crecer durante 13 días. Después de 13 días, los tumores se midieron y se aleatorizaron (50 mm³ - 100 mm³) en los respectivos grupos de tratamiento. Al día siguiente, se introdujeron por vía intravenosa 10 millones (10M) de TIL. Los TIL se generaron de acuerdo con el protocolo de expansión rápida (REP) descrito anteriormente.

[00147] Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: (1) TIL no diseñados dosificados con IL2; y (2) TIL mbIL15 regulados dosificados con acetazolamida (ACZ). Los ratones que recibieron TIL no diseñados recibieron dos veces al día 50 000 Unidades Internacionales (IU) de IL2 durante 5 días. Los ratones tratados con TIL mbIL15 regulados recibieron vehículo o 200 mg/kg de acetazolamida (ACZ) diariamente durante todo el estudio. Los tumores y los pesos corporales se recogieron dos veces por semana.

[00148] La FIG. 13 muestra los resultados de un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX). Al final del protocolo de expansión rápida (REP), los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados (+/- acetazolamida (ACZ)) se transfirieron adoptivamente a ratones que tenían un PDX de melanoma humano. Se evaluaron los volúmenes tumorales medios (+/- SEM). La FIG. 13A muestra el volumen tumoral medio para un tratamiento dado en los días posteriores a la transferencia celular adoptiva (ACT). La FIG. 13B muestra el volumen del tumor en los días posteriores a la ACT sin TIL (arriba a la izquierda); TIL no diseñados + IL2 (arriba a la derecha); TIL mbIL15 regulados + vehículo (abajo a la izquierda); y TIL mbIL15 regulados +ACZ (abajo a la derecha). Como se muestra en la FIG. 13, los TIL mbIL15 regulados + ACZ tienen una eficacia antitumoral significativamente superior en comparación con los TIL + IL2 no diseñados.

[00149] Se creó un modelo de cáncer de xenoinjerto SK-MEL-1 para evaluar los TIL mbIL15 regulados de la presente invención. Para crear el modelo se utilizaron células obtenidas del conducto torácico de un paciente con melanoma maligno generalizado y de progresión rápida (n.º de catálogo ATCC HTB-67). Los ratones hembra NSG (Jackson Laboratory; n.º de catálogo 000557) fueron los ratones que se usaron para recibir las células cancerosas. Brevemente, las células de paso bajo se descongelaron y se cultivaron a escala manteniendo cultivos subconfluentes viables. El día de la inyección, las células se contaron, lavaron y resuspendieron en PBS estéril a una concentración de 30×10^6 células/ml (3^6 células por inyección de 100 μ L). Cada ratón recibió 100 μ l de células inyectadas por vía subcutánea en el flanco derecho afeitado usando una jeringa de tuberculina BD, que contenía una aguja de calibre 27 y $\frac{1}{2}$ pulgada. Se permitió que los tumores crecieran durante 9 días y luego se midieron y aleatorizaron (50 mm^3 - 100 mm^3) en sus respectivos grupos de tratamiento. Al día siguiente, se introdujeron por vía intravenosa 10 millones (10M) de TIL. Los TIL se generaron de acuerdo con el protocolo de expansión rápida (REP) descrito anteriormente.

[00150] Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: (1) TIL no diseñados dosificados con IL2; y (2) TIL mbIL15 regulados dosificados con acetazolamida (ACZ). Los ratones que recibieron TIL no diseñados recibieron dos veces al día 50 000 Unidades Internacionales (IU) de IL2 durante 5 días. Los ratones tratados con TIL mbIL15 regulados recibieron vehículo o 200 mg/kg de acetazolamida (ACZ) diariamente durante todo el estudio. Los tumores y los pesos corporales se recogieron dos veces por semana.

[00151] La FIG. 14 muestra los resultados de un modelo de cáncer de xenoinjerto SK-MEL-1. Al final del protocolo de expansión rápida (REP), los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados (+/- acetazolamida (ACZ)) se transfirieron adoptivamente a ratones que tenían tumores SK-MEL-1. Se evaluaron los volúmenes tumorales medios (+/- SEM). La FIG. 14A muestra el volumen tumoral medio para un tratamiento dado en los días posteriores a la transferencia celular adoptiva (ACT). La FIG. 14B muestra el volumen del tumor en los días posteriores a la ACT sin TIL (arriba a la izquierda); TIL no diseñados + IL2 (arriba a la derecha); TIL mbIL15 regulados + vehículo (abajo a la izquierda); y TIL mbIL15 regulados +ACZ (abajo a la derecha). Como se muestra en la FIG. 14, los resultados demuestran que los TIL mbIL15 regulados + ACZ muestran una eficacia antitumoral significativamente superior en comparación con los TIL + IL2 no diseñados.

Ejemplo 12. Citotoxicidad *in vitro* con TIL mbIL15 regulados

[00152] Los TIL pre-REP se prepararon de manera similar a los métodos de los Ejemplos 1-3 y 9, y se generaron TIL mbIL15 no diseñados de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 1-3 y 9. Para evaluar el potencial citotóxico antitumoral de los TIL mbIL15 regulados, se realizó un ensayo de cocultivo tumor-TIL utilizando la línea de células tumorales SK-MEL-1 (ATCC) compatible con HLA y seis muestras diferentes de TIL de pacientes. También se establecieron experimentos idénticos utilizando células PDX. Las muestras de TIL del paciente evaluadas fueron TIL expandidos no diseñados o TIL mbIL15 expandidos regulados. Los TIL mbIL15 regulados se crearon de acuerdo con el protocolo REP descrito anteriormente (Ejemplos 1-9), y luego se crioconservaron. Los TIL no diseñados y los TIL mbIL15 regulados de los seis pacientes se descongelaron, contaron y dejaron en reposo a una densidad celular de $7,5 \times 10^5$ células/ml durante 24 horas en medios de cultivo complementados con: +/- 6000 IU/ml IL2 para TIL no diseñados, o vehículo (DMSO); o 25 μ M ACZ para TIL mbIL15 regulados. Al día siguiente, se recolectaron células SK-MEL-1 compatibles con HLA del cultivo *in vitro* y se marcaron con Cell Trace Far Red, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Además, las células PDX se obtuvieron de fragmentos frescos o crioconservados y se digirieron con GentleMAC (Miltenyi) según el protocolo del fabricante.

[00153] Luego, los TIL se cocultivaron en proporciones de 5:1 y 1:1 (efector de TIL: objetivo tumoral) con las células de melanoma marcadas en las mismas condiciones suplementadas de IL2 o ACZ enumeradas anteriormente, con o sin reactivo de bloqueo de MHC Clase I (células solas cultivadas con 80 μ g/ml de HLA ABC antihumano durante 2 horas antes del cocultivo con TIL). Se incluyeron controles adicionales de células de melanoma marcadas y sin marcar solas para evaluar la actividad de caspasa-3 de fondo en el sistema de cocultivo. Este cocultivo de células tumorales-TIL se incubó durante 3 horas, después de lo cual las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron para determinar la caspasa-3 escindida intracelularmente (un marcador del compromiso irreversible con la muerte celular dentro de las células tumorales).

[00154] Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo BD Fortessa con análisis realizados con Flow Jo V10.7.1, donde la citotoxicidad se determinó mediante los porcentajes de células que se tiñeron positivamente para caspasa-3 escindida dentro de la población de células vivas Cell Trace Far Red positivas (restando la positividad de caspasa-3 de fondo).

[00155] Como se muestra en la FIG. 15, en esta evaluación de la citotoxicidad antitumoral de los pares TIL-tumor, los TIL mbIL15 regulados mostraron una actividad citotóxica antitumoral superior en los 6 donantes, en comparación con los TIL + IL2 no diseñados. FIG. 15.

Ejemplo 13: Generación de TIL mbIL15 y no diseñados con células alimentadoras distintas

[00156] Los TIL pre-REP generados a partir de muestras tumorales se prepararon como se describe en los Ejemplos 1 y 9. Los TIL pre-REP se descongelaron y reposaron durante 48 horas en medio TIL (RPMI-1640 complementado con GlutaMAX (Thermo Fisher), 1 % HEPES, 50 2-mercaptoetanol μ M (Invitrogen) y suero AB humano inactivado por calor al 10 % (Valley Bio) con 6000 IU/ml de IL2 humana (Peprotech). A continuación, se activaron los TIL durante 24 h en placas NUNC de 24 pocillos recubiertas con anti-CD3 (OKT3, Miltenyi Biotec) a 3 μ g/y 6000 IU/ml de IL2 humana soluble. Se usó RetroNectin (30 μ g/ml) para recubrir placas de cultivo celular sin recubrir de 24 pocillos durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se retiró RetroNectin, las placas se bloquearon con albúmina sérica humana (HSA) al 2,5 % en PBS, y luego se lavaron las placas con PBS. Los sobrenadantes lentivirales pseudotipados con BaEV, preparados como se describe en el Ejemplo 9, se diluyeron en medio TIL y se agregaron a cada pocillo para lograr una MOI de 0,01 a 0,6. Las placas que contenían el vector viral se centrifugaron a 1400 g durante 2 horas a 32 °C y luego se eliminó el sobrenadante. Después de la eliminación del sobrenadante, se transfirieron 1×10^6 TIL activados por pocillo con 0-100 IU/ml de IL2 y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las células se procesaron de manera similar sin adición de virus en medios TIL y se usaron como control negativo ("no diseñados"). Veinticuatro horas después de la transducción, los TIL se transfirieron a matraces GREX 6 M (Wilson Wolf) en un total de 40 ml de medio TIL REP (50 % de medio TIL como se describe anteriormente, 50 % de medio AIM-V (Gibco). Se añadieron células alimentadoras con deterioro de la proliferación (irradiadas o tratadas con mitomicina C) (PBMC agrupadas, alimentadoras K562 no modificadas, K562 modificadas para expresar IL21 unida a membrana, K562 modificada para expresar 41BBL, K562 modificada para expresar 41BBL e IL21 unida a membrana) al cultivo en una proporción de 50:1 K562 a TIL. Los grupos designados para recibir IL21 exógena recibieron dosis de 50 ng/ml de IL21 humana recombinante. Los TIL transducidos con la construcción mbIL15 regulado recibieron acetazolamida (Hikma) 25 μ M y los TIL no diseñados recibieron 3000 IU/ml de IL2. Las células se cultivaron durante 14 días en placas GREX para el "protocolo de expansión rápida" o REP, y se añadió el medio según fuera necesario.

Evaluación de la expansión de TIL en REP

[00157] Periódicamente durante la expansión, cada pocillo GREX se resuspendió y mezcló completamente, y se tomó una alícuota para el recuento de células utilizando tinte de viabilidad de

naranja de acridina/yoduro de propidio (Cellaca Cell Counter, Nexcelom) y tinción de citometría de flujo. Las muestras se tiñeron con anticuerpos CD3-BUV395 (BD), CD56-BV711 (Biolegend), CD4-BV605 (Biolegend), CD8-Alexa Fluor 700 (Biolegend), IL15RaFc-Biotin (ACRO Biosystems) con estreptavidina-BV421 secundaria (Biolegend) y tinte de viabilidad fijable eFluor 780 (Thermo Fisher). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Symphony y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1.

[00158] La expansión total de TIL se determinó obteniendo los recuentos de células viables totales en puntos de tiempo específicos a lo largo de REP. La FIG. 16 muestra que para TIL mbIL15, el uso de células alimentadoras K562 y recibir coestimulación mediada por IL-21 y 41BBL dio como resultado la expansión celular máxima en células alimentadoras REP y PBMC, así como células alimentadoras K562 sin 41BBL admitía solo niveles subóptimos de expansión de TIL en REP. Por el contrario, aunque los TIL no diseñados se expandieron en presencia de IL2 usando cualquiera de las células alimentadoras, las células alimentadoras de PBMC promovieron la expansión máxima de TIL no diseñados en REP.

[00159] La expresión de IL15 se determinó por el porcentaje de células que se tiñeron positivamente para BV421-estreptavidina dentro de la población de células vivas, CD3 positivas, CD56 negativas. En los TIL mbIL15 generados con células alimentadoras K562 y que recibieron coestimulación mediada por IL-21 y 41BBL, la frecuencia de TIL mbIL15+ aumentó a través del proceso REP, lo que sugiere un enriquecimiento del subconjunto transducido con mbIL15 dentro de los cultivos de células TIL diseñados (FIG. 18). Asimismo, la expansión máxima de TIL mbIL15+ en REP se produjo cuando se generaron TIL mbIL15+ constitutivos o regulados utilizando células alimentadoras K562 con coestimulación mediada por IL-21 y 41BBL (FIG. 19).

[00160] Las proporciones de CD4:CD8 se determinaron mediante una proporción del porcentaje de células que se tiñen positivas para CD4 (de células vivas, CD3 positivas, CD56 negativas) y el porcentaje de células que se tiñen positivas para CD8 (de células vivas, CD3 positivas, CD56 negativas). Los TIL mbIL15 expandidos generados con células alimentadoras K562 y que recibieron coestimulación mediada por IL-21 y 41BBL se enriquecieron en células efectoras citotóxicas CD8+, como indica su proporción CD4:CD8 disminuida a lo largo de REP (FIG. 20). Por el contrario, la proporción CD4:CD8 de los TIL mbIL15 generados con alimentadores de PBMC agrupados, alimentadores K562 no modificados o alimentadores K562 que expresan 41BBL solo no disminuyó durante REP.

[00161] Para la evaluación de la polifuncionalidad, se cocultivaron TIL mbIL15 y no diseñados al final de REP en una placa de fondo redondo tratada con cultivo de tejido de 96 pocillos con

estimulación Immunocult CD3/CD28 (Stem Cell Technologies) según el protocolo del fabricante. Después de 1 hora de incubación, se agregaron inhibidores de transporte 1000x (Monensin de eBiosciences, Brefeldin A de Biolegend), y el cocultivo se incubó a 37 °C durante 5 horas adicionales. Después de la incubación, las muestras se tiñeron con los anticuerpos descritos anteriormente, luego se fijaron y permeabilizaron con reactivos Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). La tinción intracelular se realizó con anticuerpos contra IL2-BV737 (BD), IFN γ -FITC (Biolegend), Perforin-PerCPCy5.5 (Biolegend), TNF α -PECF594 (Biolegend), granzymeB-Alexa Fluor 700 (Biolegend). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Symphony y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1. La polifuncionalidad se determinó como el porcentaje de células positivas dobles para TNF α e IFN γ , de linfocitos vivos. TIL mbIL15 generado con células alimentadoras K562 que expresan tanto IL-21 unida a membrana como 41BBL demostraron polifuncionalidad mejorada al final de REP en comparación con TIL mbIL15 generados con células alimentadoras PBMC o células alimentadoras K562 no modificadas (FIG. 21).

Evaluación de la persistencia de TIL *in vitro* en un ensayo de supervivencia independiente de antígeno [00162] Se evaluó la persistencia *in vitro* de los TIL post-REP en un ensayo de supervivencia independiente del antígeno. Al final de REP, los TIL mbIL15 no diseñados se dejaron descansar en condiciones libres de suplementos durante 24 horas. Al día siguiente, las células no diseñadas se cultivaron por duplicado a 1×10^6 células/pocillo en una placa GREX de 24 pocillos sin soporte de citocinas o con 6000 IU/ml de IL2, y los TIL mbIL15 se cultivaron a la misma densidad con ACZ 25 μ M o con el mismo volumen de vehículo (DMSO). El día 0, se tomaron muestras de 100 μ l de cada pocillo para la enumeración de TIL y la caracterización fenotípica, que se realizó mediante recuento celular y tinción con anticuerpos como se describe anteriormente. El día 4, las células se resuspendieron, se extrajeron 500 μ l de células y se añadieron 500 μ l de medio + tratamiento a cada pocillo para llevar el volumen de cultivo a 1000 μ l. En el día 6, las células se resuspendieron, se tomaron muestras de una alícuota de 100 μ l y se fenotiparon, se extrajeron 400 μ l de células y se agregaron 500 μ l de medio + tratamiento a cada pocillo para llevar el volumen de cultivo a 1000 μ l. El día 8, las células se resuspendieron, se extrajeron 500 μ l de células y se añadieron 500 μ l de medio + tratamiento a cada pocillo para llevar el volumen de cultivo a 1000 μ l. En el día 10, las células se resuspendieron, se tomaron muestras de una alícuota de 100 μ L y se fenotiparon, y luego se terminaron los cultivos. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Symphony y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1. Los TIL mbIL15 expandidos generados con células alimentadoras K562 y que reciben coestimulación mediada por IL-21 y 41BBL demuestran una persistencia mejorada en un

ensayo de supervivencia de 10 días en comparación con los TIL mbIL15 generados con células alimentadoras PBMC o células alimentadoras K562 que no están modificadas o expresan mbIL-21 y 41BBL de forma independiente (FIG. 22).

5 Evaluación de la diversidad de TCR

[00163] Para medir la diversidad de subfamilias de TCRV β , se tiñeron TIL mbIL15 y no diseñados al final de REP para citometría de flujo utilizando el kit Beta Mark TCR Vbeta Repertoire (Beckman Coulter) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras se procesaron en el citómetro de flujo BD Symphony y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1, y la distribución de la subfamilia TCRV β se evaluó evaluando el porcentaje positivo para cada subfamilia y mostrando los datos como un agregado de todas las subfamilias cubiertas. Tanto los TIL mbIL15 como los no diseñados mantuvieron una distribución diversa de la subfamilia TCRV β independientemente de las células alimentadoras para la expansión en REP (FIG. 23).

15 Expresión de PD1 en TIL mbIL15 con señalización mediada por 41BBL e IL21

[00164] Para evaluar el nivel de agotamiento de TIL, se determinó la expresión de PD1. Las muestras se tiñeron con anticuerpos CD3-BUV395 (BD), CD56-BV711 (Biolegend), CD4-BV605 (Biolegend), CD8-Alexa Fluor 700 (Biolegend), PD1-PECy7 (Biolegend), CD25-BUV737 (Biolegend), IL15RaFc-Biotin (ACRO Biosystems) con estreptavidina-BV421 secundaria (Biolegend) y tinte de viabilidad fijable eFluor 780 (Thermo Fisher). Para la tinción intracelular, las células primero se tiñeron con los anticuerpos de superficie enumerados anteriormente y luego las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el protocolo del fabricante BD Cytotfix/Cytoperm. A continuación, las células permeabilizadas se tiñeron con el anticuerpo FoxP3-FITC (Biolegend), y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Symphony y se realizaron análisis con Flow Jo V10.7.1. La expresión de PD1 se determinó mediante el porcentaje de células que se tiñen positivamente para PD1 dentro de la población de células vivas, positivas para CD3 y negativas para CD56. Como se muestra en la FIG. 25, la expresión de PD1 es más alta en TIL mbIL15 sin expandir, y la expansión de TIL mbIL15 con señalización mediada por IL21 y 41BBL produce TIL con una expresión de PD1 cercana a la referencia.

30

Ejemplo 14: cambios de fenotipo en los TIL mbIL15 durante el diseño y la expansión en comparación con los TIL pre-REP (frecuencias de células T CD8+, CD4+, PD1+ y reguladoras)

[00165] Se realizó el fenotipado para comparar los TIL pre-REP (como se describe en el Ejemplo 1) con los TIL mbIL15 diseñados (como se describe en el Ejemplo 3). Los TIL pre-REP y post-REP se fenotiparon mediante citometría de flujo usando anticuerpos para CD3, CD4, CD8 y PD1 como se describe en el Ejemplo 13. Como se muestra en la FIG. 25A, la frecuencia de células T CD8+ es más alta y la frecuencia de células T CD4+ es más baja para los TIL mbIL15 post-REP en comparación con los TIL pre-REP correspondientes de los mismos donantes TIL, lo que es coherente con los resultados que se muestran en la FIG. 20 del ejemplo 13. Este aumento en las células T CD8+ refleja un aumento en las células efectoras citotóxicas como se analiza y evalúa en el Ejemplo 13. Asimismo, como se muestra en la FIG. 25B, los TIL mbIL15 post-REP expresan niveles más bajos de PD1 que los TIL pre-REP correspondientes de los mismos donantes de TIL, lo que es coherente con los resultados que se muestran en la FIG. 24 del Ejemplo 13.

[00166] Para detectar las células T reguladoras (células T_{reg}) en la población ampliada de TIL, las muestras se tiñeron con anticuerpos CD3-BUV395 (BD), CD56-BV711 (Biolegend), CD4-BV605 (Biolegend), CD8-Alexa Fluor 700 (Biolegend), PD1-PECy7 (Biolegend), CD25-BUV737 (Biolegend), IL15RaFc-Biotin (ACRO Biosystems) con estreptavidina-BV421 secundaria (Biolegend) y tinte de viabilidad fijable eFluor 780 (Thermo Fisher). Para la tinción intracelular, las células primero se tiñeron con los anticuerpos de superficie enumerados anteriormente y luego las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el protocolo del fabricante BD Cytotfix/Cytoperm. A continuación, las células permeabilizadas se tiñeron con el anticuerpo FoxP3-FITC (Biolegend), y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Fortessa y se realizaron análisis con Flow Jo V10.7.1. Los linfocitos T reguladores se identificaron como linfocitos T CD3+ que se seleccionan como CD4+ y se clasifican además como linfocitos positivos dobles CD25 y FoxP3. Como se muestra en la FIG. 25C, los TIL mbIL15 expandidos tienen una proporción reducida de células T reguladoras en comparación con los TIL pre-REP antes del paso de diseño.

Ejemplo 15: modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) y tratamiento con TIL diseñados

Establecimiento de un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX)

[00167] Se creó un modelo de xenoinjerto (PDX) derivado del paciente (PDX163A) a partir de una muestra fresca de melanoma primario adquirida de un banco de tumores, como se describe en el Ejemplo 11. Una vez que se estableció el modelo, las secciones crioconservadas del tumor se implantaron asépticamente en ratones inmunocomprometidos anestesiados con isoflurano. Los tumores crecieron hasta aproximadamente 1000 mm³ - 2000 mm³ cuando fueron sacrificados, y los tumores se pasaron en serie a animales posteriores para mantener el crecimiento del tumor PDX y crear cohortes de animales para estudios de eficacia (como se describe a continuación).

[00168] Los tumores PDX163A resecados de los animales portadores de tumores también se evaluaron en cuanto a su expresión de antígenos tumorales de melanoma compartidos mediante citometría de flujo. Para evaluar el nivel de antígeno de melanoma conservado en células de melanoma, la línea celular de melanoma A375 y el melanoma PDX descritos en este documento se analizaron mediante citometría de flujo. Los fragmentos de tumor de melanoma PDX como se describe en el Ejemplo 11 se obtuvieron frescos o de crioconservación y se digirieron con GentleMAC (Miltenyi) de acuerdo con el protocolo del fabricante para obtener una suspensión de células individuales viables. Las muestras se bloquearon con bloqueo de Fc reactivo y teñido con anticuerpos contra MART-1 (Biolegend), gp100 (Biolegend) y tinte de viabilidad fijable eFluor 780 (Thermo Fisher). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Symphony y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1. La frecuencia de células tumorales que expresan antígenos asociadas al melanoma se determinó mediante el porcentaje de células que se tiñen positivamente para MART-1 o gp100, dentro de la población de células vivas. La FIG. 26 muestra que los antígenos MART-1 y gp100 asociados a melanoma conservados se expresaron en los tumores PDX seleccionados para el modelado de eficacia de TIL como se describe en este Ejemplo (a continuación).

Selección de donantes para modelado de eficacia alogénica

[00169] Se generaron TIL de ocho donantes de melanoma como se describe en los Ejemplos 1-3 o 9. Brevemente, después de 3 semanas en el cultivo pre-REP, los TIL crioconservados se descongelaron y reposaron durante la noche con 6000 IU/ml de IL2 humana. Luego, los TIL se activaron con Dynabeads anti-CD3/CD28 o en placas de pocillos múltiples recubiertas con OKT3 durante 24 horas, después de lo cual se transdujeron con vectores de mbIL15 regulada o no diseñada. 24 horas después de la transducción, los TIL se expandieron con células alimentadoras K562-IL21-41BBL en placas de pocillos GREX 6M (Wilson Wolf) con 6000 UI/ml de IL2 añadidas a TIL no diseñados y acetazolamida 25 µM (SelleckChem o Hikma) añadida a TIL mbIL15 regulados. Después

de 14 días de expansión, los TIL se recolectaron, se desperilaron y se dejaron reposar durante la noche con y sin IL2 y acetazolamida.

[00170] Se usó tinción con tetrámero para determinar qué donantes de TIL eran reactivos a los antígenos de melanoma compartidos, MART-1 y gp100. Para evaluar el nivel de TIL reactivos al antígeno, se realizó citometría de flujo para examinar la frecuencia de células reactivas al tetrámero. Las muestras se bloquearon con reactivo de bloqueo de Fc y se tiñeron con anticuerpos CD3-BUV395 (BD), CD4-BV605 (Biolegend), CD8-Alexa Fluor 700 (Biolegend), tetrámero HLA-A2:01-MART-1 (MBL International), HLA -A2:01-gp100 (MBL International), IL15RaFc-Biotina (ACRO Biosystems) con estreptavidina-BV421 secundaria (Biolegend) y tinte de viabilidad fijable eFluor 780 (Thermo Fisher). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo BD Symphony y el análisis se realizó con Flow Jo V10.7.1. La frecuencia de los TIL reactivos con el antígeno se determinó mediante el porcentaje de células que se tiñeron positivamente para cada uno de los dos tetrámeros, de forma independiente, dentro de la población de células vivas, positivas para CD3 y positivas para CD8. Como se muestra en la FIG. 27, los cuatro donantes probados demostraron reactividad al antígeno MART-1, y tres de los cuatro donantes probados demostraron reactividad al antígeno gp100. Las poblaciones tetrámeras positivas indican que los TIL contienen una porción de células que son reactivas a los correspondientes antígenos asociados al melanoma, a través del locus HLA:A2:01. En la FIG. 27, los donantes indicados con un * se utilizaron en el estudio de eficacia de PDX como se muestra en este ejemplo (a continuación).

[00171] Los fragmentos de tumor de melanoma PDX como se describe en el Ejemplo 11 se obtuvieron frescos o de crioconservación y se digirieron con GentleMAC (Miltenyi) según el protocolo del fabricante para obtener una suspensión de células individuales viables. A continuación, las células PDX se resuspendieron en medio TIL a 5×10^6 células/ml. Se añadieron diez $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina-C a las células, que luego se incubaron durante 30 minutos a 37°C . A continuación, las células se lavaron tres veces con 50 ml de medio TIL. Se añadieron 1×10^5 células PDX por pocillo a una placa tratada con cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. En algunos pocillos, se añadieron $80 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo bloqueante HLA-ABC (Biolegend) para bloquear el MHC de clase I en las células objetivo. Los TIL que se dejaron reposar durante la noche se añadieron en una proporción de 1:1 de TIL:PDX para un volumen total de 200 μl por pocillo. Como control positivo, los TIL se cocultivaron 1:1000 con PMA/ionomicina, lo que provocaría la máxima secreción de $\text{IFN}\gamma$. Como control negativo, los TIL se cocultivaron sin reactivos ni células adicionales y se identificaron como TIL "no estimulados". A las 24 horas, se guardó el sobrenadante de cada pocillo y se analizó la concentración de $\text{IFN}\gamma$ mediante MSD.

[00172] La FIG. 28 muestra que la producción de interferón gamma (IFN γ) después del cocultivo de TIL:células tumorales puede usarse para predecir donantes de TIL que son reactivos al tumor PDX. Este ensayo *in vitro* demuestra que los donantes TIL 006, 39A y 41A son los donantes con la mayor cantidad de IFN γ producido en respuesta al PDX, lo que respalda su candidatura como donantes para examinar la eficacia *in vivo* como se describe en este Ejemplo (a continuación).

Uso de un modelo de xenoinjerto derivado del paciente (PDX) para estudios de eficacia de TIL

[00173] Los tumores de ratones portadores de tumores PDx (pasados como se describió anteriormente) se recolectaron asépticamente, se seccionaron en secciones de ~100 mg y luego se implantaron en una cohorte más grande de ratones a los que se les permitió crecer durante 13 días, luego de lo cual se midieron y aleatorizaron (50 mm³ a 100 mm³) en sus respectivos grupos de tratamiento. Al día siguiente, se introdujeron por vía intravenosa 10M de TIL. Los ratones que recibieron TIL no diseñados recibieron diariamente 600 000 Unidades Internacionales (IU) de IL2 durante 4 días. Los ratones que recibieron el producto mbIL15 en el que mbIL15 se unió operativamente a CA2 recibieron 200 mg/kg de acetazolamida (ACZ) diariamente durante todo el estudio. Los tumores y los pesos corporales se recogieron dos veces por semana. El paradigma de tratamiento se muestra en la FIG. 29 Como se muestra en la FIG. 30, los TIL diseñados + ACZ mostraron efectos antitumorales superiores en comparación con los TIL no diseñados + IL2. Además, los TIL diseñados, particularmente en presencia de ACZ, mostraron una mejor infiltración tumoral como se muestra en la FIG. 31A y números mayores en los compartimentos de estroma y tumor como se muestra en la FIG. 31B.