

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3601533

DAL TITOLO:

“PROCEDIMENTI PER LA PREPARAZIONE DI LINFOCITI INFILTRANTI IL TUMORE E LORO USI IN IMMUNOTERAPIA”

Depositata il:

\*\* \* \*\*

### **ELENCO DELLE SEQUENZE**

La presente domanda contiene un elenco delle sequenze che è stato presentato in modo elettronico in formato ASCII. La suddetta copia ASCII, generata il 4 gennaio 2018, è denominata 116983-5017\_ST25.txt ed è di 14 kilobyte di dimensione.

### **SFONDO DELL'INVENZIONE**

Il trattamento di tumori refrattari ingombranti utilizzando il trasferimento adottivo di linfociti infiltranti il tumore (TIL) rappresenta un approccio potente alla terapia per pazienti con prognosi scarse. Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393. Un numero elevato di TIL è richiesto per un'immunoterapia riuscita, ed è necessario un procedimento robusto ed attendibile per la commercializzazione. Ciò è stato difficile da ottenere a causa di problemi tecnici, logistici, e regolatori con l'espansione cellulare. L'espansione dei TIL basata su IL-2, cui segue un "procedimento di espansione rapida" (REP), è diventata un metodo preferito per l'espansione dei TIL grazie alla sua velocità ed efficienza. Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-57; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39; Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. Il REP può portare ad un'espansione dei TIL di 1.000 volte in un periodo di 14 giorni, sebbene esso richieda un grande eccesso (per esempio di 200 volte) di cellule mononucleate del sangue periferico allogene irradiate (PBMC, note anche come cellule mononucleate (MNC)), spesso da donatori multipli, come cellule nutritive, così come di anticorpo anti-CD3 (OKT3) e dosi elevate di IL-2. Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. I TIL che hanno subito una procedura di REP hanno prodotto una terapia cellulare adottiva riuscita in seguito all'immunosoppressione dell'ospite in pazienti con melanoma. I parametri correnti di accettabilità dell'infusione si basano su letture della composizione dei TIL (per esempio positività per CD28, CD8, o CD4) e sull'espansione in termini di numero di volte e sulla vitalità del prodotto del REP. La pubblicazione del brevetto US No. 2012/244133 descrive un procedimento di espansione dei TIL che comprende un passaggio del procedimento di espansione rapida di circa 14 giorni e una durata totale dall'ottenimento di un campione di tumore alla popolazione TIL espansa tra 28 e 42 giorni. WO2016/053338 descrive un metodo di espansione dei TIL che implica una prima espansione dei TIL tra 2 e 3 settimane e una seconda espansione di circa due settimane dopo la quale i prodotti dei TIL dalla seconda espansione

vengono valutati per la reattività ad una mutazione di ERBB2P.

I procedimenti di produzione dei TIL correnti sono limitati dalla lunghezza, dal costo, da problemi di sterilità, e da altri fattori descritti qui in modo tale che il potenziale di commercializzazione di tali procedimenti è seriamente limitato, e per queste e altre ragioni, attualmente nessun procedimento commerciale è stato reso disponibile. Vi è la necessità urgente di fornire procedimenti di produzione dei TIL e terapie sulla base di tali procedimenti che siano appropriati per la produzione su scala commerciale e per l'autorizzazione regolatoria per l'uso in pazienti umani in centri clinici multipli.

### **BREVE RIASSUNTO DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione fornisce metodi migliorati e/o accorciati per espandere i TIL e per produrre popolazioni terapeutiche di TIL. La presente invenzione fornisce il metodo come rivendicato nelle rivendicazioni.

Ulteriormente descritto qui, sebbene non rivendicato, è un metodo per espandere i linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un paziente mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza

apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema.

Il metodo può comprendere inoltre i passaggi di crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta nel passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione.

Il procedimento di crioconservazione può essere eseguito utilizzando un rapporto 1:1 tra la popolazione dei TIL raccolta e il mezzo di crioconservazione.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Le PBMC possono essere irradiate ed allogeneiche. Le PBMC possono essere aggiunte alla coltura cellulare ad uno qualsiasi dei giorni da 9 a 14 nel passaggio (d). Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule presentanti l'antigene artificiali.

La raccolta nel passaggio (e) può essere eseguita utilizzando un sistema di lavorazione cellulare basato su membrana.

La raccolta nel passaggio (e) può essere eseguita utilizzando un sistema di lavorazione cellulare LOVO.

I frammenti multipli possono comprendere da circa 4 a circa 50 frammenti, in cui ciascun frammento ha un volume di circa 27 mm<sup>3</sup>.

I frammenti multipli possono comprendere da circa 30 a circa 60 frammenti con un volume totale da circa 1.300 mm<sup>3</sup> a circa 1.500 mm<sup>3</sup>.

I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con un volume totale di circa 1.350 mm<sup>3</sup>.

I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con una massa totale da circa 1 grammo a circa 1,5 grammi.

Il terreno di coltura cellulare può essere fornito in un contenitore scelto nel gruppo composto da un contenitore G e una sacca cellulare Xuri.

Il terreno di coltura cellulare nel passaggio (d) può anche comprendere IL-15 e/o IL-21.

La concentrazione di IL-2 può essere da circa 10.000 UI/ml a circa 5.000 UI/ml.

La concentrazione di IL-15 può essere da circa 500 UI/ml a circa 100 UI/ml.

La concentrazione di IL-21 può essere da circa 20 UI/ml a circa 0,5 UI/ml.

La sacca per infusione nel passaggio (f) può essere una sacca per infusione contenente HypoThermosol.

I mezzi di crioconservazione possono comprendere dimetilsolfossido (DMSO). I mezzi di crioconservazione possono comprendere dimetilsolfossido (DMSO) dal 7% al 10%.

Il primo periodo nel passaggio (c) e il secondo periodo nel passaggio (e) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 10

giorni, 11 giorni, o 12 giorni.

Il primo periodo nel passaggio (c) e il secondo periodo nel passaggio (e) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 11 giorni.

I passaggi da (a) a (f) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 10 giorni a circa 22 giorni.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito entro un periodo da circa 20 giorni a circa 22 giorni.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito entro un periodo da circa 15 giorni a circa 20 giorni.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito entro un periodo da circa 10 giorni a circa 20 giorni.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito entro un periodo da circa 10 giorni a circa 15 d.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito in 22 giorni o meno.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito in 20 giorni o meno.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito in 15 giorni o meno.

I passaggi da (a) a (f) possono essere ciascuno eseguito in 10 giorni o meno.

I passaggi da (a) a (f) e la crioconservazione possono essere ciascuno eseguito in 22 giorni o meno.

La popolazione terapeutica della raccolta dei TIL nel passaggio (e) può comprendere TIL sufficienti per un dosaggio terapeuticamente efficace di TIL.

Il numero dei TIL sufficiente per un dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

I passaggi da (b) a (e) possono essere eseguiti in un singolo contenitore, in cui l'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in un singolo contenitore risulta in un aumento della resa dei TIL per tumore resecato in confronto all'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in più di un contenitore.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere aggiunte ai TIL durante il secondo periodo nel passaggio (d) senza apertura del sistema.

La terza popolazione dei TIL nel passaggio (d) può fornire un'efficacia aumentata, un'aumentata produzione di interferone gamma, un'aumentata policlonalità, un'aumentata IP-10 media, e/o un'aumentata MCP-1 media quando somministrata a un soggetto.

La terza popolazione dei TIL nel passaggio (d) può fornire una produzione di interferone gamma di almeno cinque volte o più quando somministrata a un soggetto.

La terza popolazione dei TIL nel passaggio (d) può essere una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'aumentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui i linfociti T effettori e/o i linfociti T

della memoria centrale nella popolazione terapeutica dei TIL mostrano una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla terza popolazione dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

Il rischio di contaminazione microbica può essere ridotto in confronto a un sistema aperto.

I TIL dal passaggio (g) possono essere per l'infusione in un paziente.

I frammenti multipli possono comprendere circa 4 frammenti.

Ulteriormente descritto qui, sebbene non rivendicato, è un metodo per il trattamento di un soggetto con cancro, il metodo comprendendo la somministrazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) espansi comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza

apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema;

(g) il crioconservare facoltativamente la sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione; e

(h) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL dalla sacca per infusione nel passaggio (g) al paziente.

La popolazione terapeutica della raccolta dei TIL nel passaggio (e) può comprendere TIL sufficienti per somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace dei TIL nel passaggio (h).

Il numero dei TIL sufficiente per somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace nel passaggio (h) può essere da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

Le cellule presentanti l'antigene (APC) possono essere le PBMC.

Le PBMC possono essere aggiunte alla coltura cellulare ad uno qualsiasi dei giorni da 9 a 14 nel passaggio (d).

Prima di somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace di cellule TIL nel passaggio (h), può essere stato somministrato al paziente un regime di linfodeplezione non mieloablative.

Il regime di linfodeplezione non mieloablative può comprendere i passaggi di somministrazione di ciclofosfamide a una dose di 60 mg/m<sup>2</sup>/giorno per due giorni cui segue la somministrazione di fludarabina a una dose di 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per cinque giorni.

Il metodo può comprendere inoltre il passaggio di trattamento del paziente con un regime di IL-2 a dose elevata che ha inizio il giorno dopo la somministrazione delle cellule TIL al paziente nel passaggio (h).

Il regime di IL-2 a dose elevata può comprendere 600.000 o 720.000 UI/kg somministrate come infusione endovenosa in bolo di 15 minuti ogni otto ore fino alla tolleranza.

La terza popolazione dei TIL nel passaggio (d) può essere una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui i linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale nella popolazione terapeutica dei TIL mostrano una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale nella popolazione terapeutica dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

Il cancro può essere scelto nel gruppo composto da melanoma, cancro ovarico, carcinoma del collo dell'utero, cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), cancro del polmone, cancro della vescica, cancro della mammella, cancro causato da virus del papilloma umano, cancro della testa e del collo (compreso il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC)), cancro del rene, e carcinoma a cellule renali.

Il cancro può essere scelto nel gruppo composto da melanoma, HNSCC, tumori della cervice, e CPNPC.

Il cancro può essere melanoma.

Il cancro può essere HNSCC.

Il cancro può essere un carcinoma del collo dell'utero.

Il cancro può essere CPNPC.

La presente invenzione fornisce metodi per espandere i linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendenti:

- (a) l'aggiungere i frammenti tumorali trattati da un tumore resecato da un paziente in un sistema chiuso per ottenere una prima popolazione di TIL;
- (b) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-11 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (a) al passaggio (b) avviene senza apertura del sistema;
- (c) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-11 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;
- (d) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (c), in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (d) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (d) a (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) la crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta utilizzando un procedimento di crioconservazione  
In alcune forme di realizzazione, la popolazione terapeutica della raccolta dei TIL nel passaggio (d) comprende TIL sufficienti per un dosaggio terapeuticamente efficace dei TIL.

In alcune forme di realizzazione, il numero dei TIL sufficiente per un dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

In alcune forme di realizzazione, il procedimento di crioconservazione viene eseguito utilizzando un rapporto 1:1 tra la popolazione dei TIL raccolta e il mezzo di crioconservazione.

In alcune forme di realizzazione, le cellule presentanti l'antigene sono cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC).

In alcune forme di realizzazione, le PBMC sono irradiate ed allogene.

In alcune forme di realizzazione, le cellule presentanti l'antigene sono cellule presentanti l'antigene artificiali.

In alcune forme di realizzazione, la raccolta nel passaggio (d) viene eseguita utilizzando un sistema di lavorazione cellulare LOVO.

In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono da circa 4 a circa 50 frammenti, in cui ciascun frammento ha un volume di circa  $27 \text{ mm}^3$ .

In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono da circa 30 a circa 60 frammenti con un volume totale da circa  $1.300 \text{ mm}^3$  a circa  $1.500 \text{ mm}^3$ .

In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono circa 50 frammenti con un volume totale di circa  $1.350 \text{ mm}^3$ .

In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono circa 50 frammenti con una massa totale da circa 1 grammo a circa 1,5 grammi.

In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono circa 4 frammenti.

In alcune forme di realizzazione, il secondo terreno di coltura cellulare viene fornito in un contenitore scelto nel gruppo composto da un contenitore G e una sacca cellulare Xuri.

In alcune forme di realizzazione, la sacca per infusione nel passaggio (e) è una sacca per infusione contenente HypoThermosol.

In alcune forme di realizzazione, il primo periodo nel passaggio (b) e il secondo periodo nel passaggio (c) sono ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 10 giorni o 11 giorni. Ulteriormente descritto, sebbene non rivendicato, è un metodo in cui il primo periodo nel passaggio (b) e

il secondo periodo nel passaggio (c) sono ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 12 giorni.

In alcune forme di realizzazione, il primo periodo nel passaggio (b) e il secondo periodo nel passaggio (c) sono ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 11 giorni.

In alcune forme di realizzazione, i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti entro un periodo da circa 10 giorni a circa 22 giorni.

In alcune forme di realizzazione, i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti entro un periodo da circa 10 giorni a circa 20 giorni.

In alcune forme di realizzazione, i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti entro un periodo da circa 10 giorni a circa 15 d.

In alcune forme di realizzazione, i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti in 22 giorni o meno.

In alcune forme di realizzazione, i passaggi da (a) ad (e) e la crioconservazione vengono eseguiti in 22 giorni o meno.

In alcune forme di realizzazione, i passaggi da (b) a (e) vengono eseguiti in un singolo contenitore, in cui l'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in un singolo contenitore risulta in un aumento della resa dei TIL per tumore resecato in confronto all'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in più di un contenitore.

In alcune forme di realizzazione, le cellule presentanti l'antigene vengono aggiunte ai TIL durante il secondo periodo nel passaggio (c) senza apertura del sistema.

In alcune forme di realizzazione, la terza popolazione dei TIL nel passaggio (d) è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui i linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti nella popolazione terapeutica dei TIL mostrano una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

In alcune forme di realizzazione, i linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti nella popolazione terapeutica dei TIL mostrano un'augmentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

In alcune forme di realizzazione, il rischio di contaminazione microbica è ridotto in confronto a un sistema aperto.

In alcune forme di realizzazione, i TIL dal passaggio (e) sono per l'infusione in un paziente.

In alcune forme di realizzazione, il contenitore chiuso comprende un bioreattore singolo.

In alcune forme di realizzazione, il contenitore chiuso comprende un G-REX-10.

In alcune forme di realizzazione, il contenitore chiuso comprende un G-REX-100.

In alcune forme di realizzazione, al passaggio (d) le cellule presentanti l'antigene (APC) vengono aggiunte alla coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL in un rapporto APC:TIL da 25:1 a 100:1.

In alcune forme di realizzazione, la coltura cellulare ha un rapporto di  $2,5 \times 10^9$  APC per  $100 \times 10^6$  TIL.

In alcune forme di realizzazione, al passaggio (c) le cellule presentanti l'antigene (APC) vengono aggiunte alla coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL in un rapporto APC:TIL da 25:1 a 100:1.

In alcune forme di realizzazione, la coltura cellulare ha rapporto di  $2,5 \times 10^9$  APC per  $100 \times 10^6$  TIL.

È inoltre qui descritta, ma non rivendicata, una popolazione di TIL espansi per l'uso nel trattamento di un soggetto con cancro, in cui la popolazione dei TIL espansi è una terza popolazione di TIL che può essere ottenuta mediante un metodo comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene

senza apertura del sistema; e

(g) il crioconservare facoltativamente la sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione.

In alcune forme di realizzazione, la popolazione dei TIL è per uso per il trattamento di un soggetto con cancro secondo i metodi descritti sopra e qui, in cui il metodo comprende inoltre una o più delle caratteristiche elencate sopra e qui.

### BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

**Figura 1:** mostra un diagramma di una forma di realizzazione del procedimento 2A, un procedimento di 22 giorni per la produzione dei TIL.

**Figura 2:** mostra un confronto tra il procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A per la produzione dei TIL.

**Figura 3:** mostra la linea del tempo del procedimento 1C.

**Figura 4:** mostra il procedimento di una forma di realizzazione di una terapia con TIL che utilizza il procedimento 2A per la produzione dei TIL, comprendente i passaggi di somministrazione e coterapia, per conte cellulari superiori.

**Figura 5:** mostra il procedimento di una forma di realizzazione di una terapia con TIL che utilizza il procedimento 2A per la produzione dei TIL, comprendente i passaggi di somministrazione e coterapia, per conte cellulari inferiori.

**Figura 6:** mostra uno schema dettagliato per una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 7:** mostra la caratterizzazione dei TIL preparati utilizzando una forma di realizzazione del procedimento 2A confrontando l'espressione di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) tra TIL freschi e TIL scongelati.

**Figura 8:** mostra la caratterizzazione dei TIL preparati utilizzando una forma di realizzazione del procedimento 2A esaminando l'espressione di CD3 nei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati.

**Figura 9:** mostra la caratterizzazione dei TIL preparati utilizzando una forma di realizzazione del procedimento 2A esaminando il recupero nei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati.

**Figura 10:** mostra la caratterizzazione dei TIL preparati utilizzando una forma di realizzazione del procedimento 2A esaminando la vitalità dei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati.

**Figura 11:** illustra i passaggi principali di una forma di realizzazione del procedimento 2A comprendenti i passaggi di crioconservazione.

**Figura 12:** illustra conte cellulari ottenute dal procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 13:** illustra la vitalità cellulare percentuale ottenuta dal procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 14:** illustra le percentuali di cellule CD45 e CD3 (cioè linfociti T) misurate mediante la citometria a flusso per TIL ottenuti per il procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 15:** illustra il rilascio di IFN- $\gamma$  ottenuto per il procedimento 1C e le forme di realizzazione del procedimento 2A, misurato mediante un saggio differente rispetto a quello utilizzato per generare i dati nelle figure 80 e 98.

**Figura 16:** illustra il rilascio di IFN- $\gamma$  ottenuto per il procedimento 1C e le forme di realizzazione del procedimento 2A, misurato mediante un saggio differente rispetto a quello utilizzato per generare i dati nelle figure 80 e 98.

**Figura 17:** illustra le percentuali di TCR a/b e linfociti NK ottenuti dal procedimento 1C e da una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 18:** illustra le percentuali di cellule CD8+ e CD4+ misurate mediante la citometria a flusso per i TIL ottenuti mediante il procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A, così come il rapporto tra ciascun sottoinsieme.

**Figura 19:** illustra le percentuali di sottoinsiemi della memoria misurati mediante la citometria a flusso per i TIL ottenuti dal procedimento 1C e da una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 20:** illustra le percentuali di espressione di PD-1, LAG-3, e TIM-3 mediante la citometria a flusso per i TIL ottenuti dal procedimento 1C e da una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 21:** illustra le percentuali di espressione di 4-1BB, CD69, e KLRG1 mediante la citometria a flusso per i TIL ottenuti dal procedimento 1C e da una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 22:** illustra le percentuali di espressione di TIGIT mediante la citometria a flusso per i TIL ottenuti dal procedimento 1C e da una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 23:** illustra le percentuali di espressione di CD27 e CD28 mediante la citometria a flusso per i TIL ottenuti dal procedimento 1C e da una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 24:** illustra i risultati dell'analisi della lunghezza dei telomeri flow-FISH.

**Figura 25:** illustra i risultati dell'analisi della lunghezza dei telomeri flow-FISH (dopo la rimozione di un punto di rilevamento erratico).

**Figura 26:** illustra la progettazione dello studio clinico comprendente le coorti trattate con il procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 27:** grafico esemplificativo del procedimento 2A che fornisce una visione d'insieme dei passaggi da A a F.

**Figura 28:** diagramma di flusso del processo del procedimento 2A.

**Figura 29:** diagramma di flusso del processo del piano di raccolta dati del procedimento 2A

**Figura 30:** vitalità dei TIL freschi in confronto a quelli scongelati

**Figura 31:** espansione dei TIL freschi e scongelati in coltura re-REP

**Figura 32:** valori di laboratorio normali di metaboliti del sangue.

**Figura 33:** analisi dei metaboliti dei TIL pre-REP del procedimento 2A.

**Figura 34:** quantificazione di IL-2 nella coltura cellulare dei TIL pre-REP del procedimento 2A.

**Figura 35:** rilascio della citochina citotossica IFN- $\gamma$  a seguito della stimolazione anti-CD3, anti-CD28 ed anti4-1BB dei TIL.

**Figura 36:** rilascio di granzima B in seguito alla stimolazione anti-CD3, anti-CD28, ed anti4-1BB dei TIL.

**Figura 37:** TIL TCR  $\alpha\beta$ +. La maggior parte dei linfociti T CD3+ umani esprimono i recettori formati da catene  $\alpha$  e  $\beta$  che riconoscono antigeni in un modo limitato all'MHC. A) Tranne che in M1061, il prodotto dei TIL freschi e scongelati aveva l'80% o più dei TIL esprimenti TCR  $\alpha\beta$ +. Entrambi i TIL freschi e scongelati avevano un'espressione paragonabile di TCR  $\alpha\beta$  (valore di  $p = 0,9582$ ). Anche se è stata osservata una diminuzione nei TIL esprimenti TCR  $\alpha\beta$  dopo il re-REP, questa diminuzione non era significativa all'interno dei TIL re-REP ( $p = 0,24$ ). B) Vi è stata una diminuzione del 9,2% e del 15,7% nei TIL re-REP freschi e scongelati esprimenti TCR  $\alpha\beta$  in confronto ai TIL freschi e scongelati rispettivamente.

**Figura 38:** TCR $\alpha\beta$ -CD56+. Le cellule natural killer (NK) infiltranti il tumore e i linfociti NKT hanno anche la capacità di lisare cellule mancanti dell'espressione dell'MHC così come un antigene lipidico presentato da CD1 e di fornire citochine immunoregatorie. Tuttavia, un'intensa infiltrazione dei linfociti NK è associata ad una malattia avanzata e potrebbe facilitare lo sviluppo del cancro. La figura A mostra che in tutti gli esempi, tranne che in M1063, vi è stata una modesta, sebbene non significativa, diminuzione nella popolazione NK nei TIL scongelati in confronto ai TIL freschi, ( $p = 0,27$ ). Nessuna differenza significativa è stata osservata tra la popolazione dei TIL re-REP ( $p = 0,88$ ). I TIL freschi, i TIL freschi re-REP, e i TIL scongelati re-REP dimostrano un'espressione simile di CD56 come mostrato nella figura B. Il prodotto dei TIL scongelati aveva meno ( $1,9 \pm 1,3$ ) cellule esprimenti NK rispetto ai TIL freschi ( $3,0 \pm 2,2$ ) probabilmente come risultato della procedura di criocongelamento.

**Figura 39:** cellule CD4+. Nessuna differenza sostanziale nella popolazione di CD4 è stata osservata nelle singole condizioni. La figura A rappresenta la popolazione di CD4 media in ciascuna condizione. La tabella nella figura B mostra i valori di DS e ESM. Vi è una leggera diminuzione nella popolazione di CD4 nella popolazione fresca re-REP che è dovuta principalmente ad una diminuzione di CD4 nella popolazione fresca re-REP in EP11001T.

**Figura 40:** cellule CD8+. A) In tutto, eccetto che in EP11001T, entrambi i TIL freschi e scongelati hanno mostrato popolazioni CD8+ paragonabili ( $p = 0,10$ , nessuna differenza significativa). Nella maggior parte degli esperimenti, vi è stata una leggera diminuzione nei TIL esperimenti CD8+ nel prodotto dei TIL freschi re-REP (le eccezioni erano M1061T e M1065T). Vi è stata approssimativamente una diminuzione del 10-30% nella popolazione CD8+ nei TIL scongelati re-REP. Il confronto dei TIL re-REP da entrambi i TIL freschi e scongelati ha mostrato una differenza significativa ( $p = 0,03$ , test t di Student). La figura B mostra i valori medi dei TIL esperimenti CD8+ in tutte le condizioni. Entrambi i TIL freschi e scongelati mostrano risultati simili. Tuttavia, vi è stata una diminuzione del 10,8% nella popolazione CD8+ nel prodotto dei TIL scongelati re-REP rispetto ai TIL freschi re-REP.

**Figura 41:** cellule CD4+CD154+. CD154, noto anche come CD40L, è un marcatore per linfociti T attivati. Figura A: nessuna differenza sostanziale nella popolazione CD4+CD154+ è stata osservata nelle differenti condizioni, tuttavia, una diminuzione del 34,1% è stata osservata nei TIL CD4+ re-REP freschi di EP11001T. L'espressione di CD154 non è stata misurata in M1061T e M1062T, dal momento che questi esperimenti sono stati condotti prima che fosse adottato il pannello fenotipico esteso. Figura B: una leggera diminuzione nella condizione dei TIL scongelati potrebbe essere attribuita a CD154 non misurato in M1061T e M1062T. Tutte le condizioni mostrano un'espressione di CD154 molto simile nella popolazione di CD4 suggerendo linfociti T CD4+ attivati.

**Figura 42A-42B:** cellule CD8+CD154+. È stato anche analizzato il marcatore di attivazione CD154 espresso sui TIL CD8+. A) Complessivamente, l'espressione di CD154 era inferiore nella popolazione CD8+ nel prodotto dei TIL freschi e scongelati. Questo non è sorprendente, dal momento che CD154 viene espresso principalmente nei linfociti T CD4+ attivati. Nei casi in cui l'espressione di CD154 è stata misurata nel prodotto di entrambi i TIL freschi e scongelati, è stata osservata una differenza nulla oppure un aumento nell'espressione di CD154 nei prodotti dei TIL scongelati. La test t di Student ha mostrato che non vi era alcuna differenza significativa tra le due condizioni. Un aumento nell'espressione di CD154 nei re-REP scongelati rispetto ai re-REP freschi è stato mostrato in tutti gli esperimenti ( $p = 0,02$ ). B) Un aumento nell'espressione di CD154 è stato osservato in entrambi i prodotti dei TIL scongelati e dei TIL scongelati re-REP rispetto alle loro controparti. I TIL scongelati re-REP hanno mostrato un incremento del 29,1% nell'espressione di CD154 rispetto ai TIL freschi re-REP.

**Figura 43A-43B:** cellule CD4+CD69+. CD69 è il marcatore di attivazione precoce nei linfociti T dopo la stimolazione o l'attivazione. A) In tutti i TIL eccetto in EP11001T, entrambi i re-REP freschi e scongelati hanno mostrato un incremento modesto nell'espressione di CD69, probabilmente a causa della lunghezza del re-REP (7 giorni piuttosto che 11 giorni). Non è stata osservata alcuna differenza tra TIL freschi e scongelati ( $p = 0,89$ ). Inoltre, non è stata osservata una differenza tra re-REP freschi e scongelati ( $p = 0,82$ ). B) Un incremento minore nell'espressione di CD69 viene

osservato nei prodotti dei TIL re-REP. (Nota: Non è stata eseguita alcuna colorazione di CD69 per il prodotto dei TIL scongelati di M1061T e M1062T. L'espressione di CD69 del prodotto dei TIL freschi di M1061T era del 33,9%).

**Figura 44A-44B:** cellule CD8+CD69+. Come osservato per la popolazione CD4+, la figura A mostra un aumento nell'espressione di CD69 nei TIL CD8+ re-REP. L'espressione di CD69 non ha mostrato alcuna differenza significativa tra i TIL freschi e scongelati ( $p = 0,68$ ) o i TIL freschi e scongelati re-REP ( $p = 0,76$ ). La figura B supporta l'osservazione che vi è un incremento modesto nell'espressione di CD69 nel prodotto dei TIL re-REP.

**Figura 45A-45B:** cellule CD4+CD137+. CD137 (4-11313) è un recettore costimolatorio dei linfociti T indotto a seguito dell'attivazione dei TCR. È attivato sui linfociti T CD4+ e CD8+. A) L'espressione di CD137 ha mostrato un profondo incremento nella popolazione dei TIL re-REP in seguito a 7 giorni di stimolazione. Tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza tra i TIL freschi e scongelati o tra i TIL freschi e scongelati re-REP ( $p < 0,05$  in entrambi i casi, la figura B supporta questa osservazione). Inoltre, i TIL scongelati hanno mostrato una modesta diminuzione nell'espressione di CD137. L'aumento dell'espressione di CD137 nei TIL re-REP potrebbe essere attribuito al secondo ciclo di stimolazione del re-REP di 7 giorni.

**Figura 46A-46B:** cellule CD8+CD137+. A) La popolazione CD8+ ha mostrato un incremento complessivo nel prodotto re-REP. B) Il prodotto re-REP fresco aveva un incremento del 33,4% nell'espressione CD8+CD137+ in confronto al prodotto dei TIL freschi. Anche il prodotto re-REP scongelato ha mostrato un incremento del 33,15% nell'espressione di CD137 nella popolazione CD8+ in confronto ai TIL scongelati. Non è stata osservata alcuna differenza significativa tra TIL freschi e scongelati re-REP. Una simile osservazione si può riscontrare confrontando il prodotto dei TIL freschi con quello dei TIL scongelati. Questo incremento nell'espressione di CD137 potrebbe essere dovuto al secondo ciclo di attivazione del re-REP. (Si noti che solo 6 TIL sono stati utilizzati per l'analisi, dal momento che l'espressione di CD137 non è stata misurata per 3 degli esperimenti.)

**Figura 47A-47B:** cellule della CM CD4+. La popolazione della memoria centrale (CM) è definita dall'espressione CD45RA- (negativa) e CCR-7+ (positiva). A) È stato osservato un aumento nella popolazione della CM nelle condizioni re-REP. M1063T e M1064T hanno mostrato una diminuzione nell'espressione della CM nella popolazione CD4+ ottenuta dal prodotto dei TIL scongelati in confronto a quello dei TIL freschi. Né il prodotto dei TIL freschi e scongelati ( $p = 0,1658$ ) né i TIL freschi re-REP e scongelati re-REP ( $p = 0,5535$ ) hanno mostrato una differenza significativa nella popolazione della CM. B) Un incremento del 14,4% e del 15,4% nella popolazione della CM è stato osservato nei TIL freschi e scongelati re-REP in confronto ai TIL freschi e scongelati, rispettivamente.

**Figura 48A-48B:** cellule della CM CD8+. A) Nella popolazione CD8+, è stato osservato un incremento drastico nell'espressione della CM nel prodotto dei TIL freschi, un'osservazione non presente nel prodotto dei TIL. Questo incremento non ha influenzato la significatività ( $p = 0,3086$ ), non suggerendo alcuna differenza tra i TIL freschi e scongelati. Una tendenza simile è stata vista anche nei prodotti dei TIL re-REP. Figura 48B) Un incremento complessivo nella popolazione della CM nei TIL freschi è stato osservato rispetto ai TIL scongelati. I numeri mostrano che i TIL freschi e i TIL re-REP avevano una differenza solo del -2%; i TIL freschi hanno mostrato una deviazione standard molto elevata che potrebbe essere attribuita a M1064T; l'esclusione dell'espressione della CM in M1064T è risultata in un'espressione della CM molto simile tra il prodotto dei TIL freschi e scongelati (non mostrato).

**Figura 49A-49B:** cellule dell'EM CD4+. La popolazione della memoria effettrice (EM) è definita dalla mancanza dell'espressione di CCR-7 e CD45RA. A) Come atteso, la popolazione CD4+ da TIL freschi e scongelati aveva un livello elevato del fenotipo della memoria effettrice. Una drastica diminuzione nell'espressione della memoria effettrice è stata trovata nella popolazione dei TIL re-REP di M1056T. Inoltre, 5 altri esperimenti hanno mostrato una diminuzione nel fenotipo della memoria effettrice in entrambi i TIL freschi e scongelati re-REP. B) Entrambi i TIL freschi e scongelati hanno mostrato un'espressione simile del fenotipo della memoria effettrice. Il confronto tra i TIL freschi e freschi re-REP ha mostrato una diminuzione del 16% nei secondi. Una simile diminuzione è stata osservata nei TIL scongelati re-REP (il 9%) quando confrontati con i TIL scongelati.

**Figura 50A-50B:** cellule dell'EM CD8+. A) Un modello simile di memoria effettrice aumentata nei TIL freschi è stato osservato anche nella popolazione CD8+. Un'eccezione è stata indicata nell'M1064T in cui i TIL freschi avevano un profilo della memoria effettrice di solo il 20%; questo è dovuto al fatto che il 73% di questi TIL ha un fenotipo della CM come descritto in A e B. Tutti i campioni che mostravano una diminuzione nella popolazione della memoria effettrice nei loro TIL CD4+ dal prodotto re-REP seguivano la stessa tendenza nei loro TIL CD8+. B) Diversamente dalla popolazione dei TIL CD4+, i TIL CD8+ hanno mostrato un fenotipo della memoria effettrice simile nei prodotti freschi, scongelati e re-REP. (Si noti l'elevata deviazione standard nei TIL freschi e scongelati, che è dovuta alla bassa popolazione della memoria effettrice nei campioni dei TIL freschi di M1064T e a nessuna espressione in quelli scongelati di M1061T.)

**Figura 51A-51B:** cellule CD4+ CD28+. L'espressione di CD28 correla con i TIL giovani diminuendo con l'età. A) Anche se un aumento nella popolazione della CM è stato osservato nei TIL re-REP, è stata osservata come tendenza una diminuzione nell'espressione di CD28 che suggerisce che lo stato di CM da solo non poteva determinare il destino dei TIL. Una diminuzione nell'espressione di CD28 è stata osservata nel prodotto re-REP, tranne che per i TIL CD4+ di M1061T. B) Una diminuzione dell'8,89% nei TIL freschi e del 5,71% in quelli scongelati è stata osservata in

confronto al prodotto dei TIL freschi e scongelati, rispettivamente.

**Figura 52A-52B:** cellule CD8+CD28+. A) L'espressione di CD28 nella popolazione dei TIL CD8+ era superiore nei TIL freschi e scongelati rispetto al prodotto re-REP. Nella maggior parte dei casi, i TIL scongelati re-REP hanno mostrato una drastica diminuzione in confronto ai TIL scongelati e ai TIL freschi re-REP. Tuttavia, il test t di Student non ha mostrato alcuna differenza significativa tra TIL freschi e scongelati ( $p = 0,3668$ ) e anche tra i prodotti freschi e scongelati re-REP ( $p = 0,7940$ ). B) Come visto nella popolazione dei TIL CD4+, vi è stata una diminuzione nelle popolazioni CD8+CD28+ nei re-REP freschi (il 21,5%) e nei re-REP scongelati (il 18,2%) in confronto alle loro controparti non stimolate ulteriormente.

**Figura 53A-53B:** cellule CD4+PD-1+. L'espressione di PD-1 nei TIL è correlata con i linfociti T reattivi all'antigene ed esauriti. Così, non è sorprendente che un fenotipo esaurito venga osservato nei TIL che hanno subito un REP per 11 giorni. A) Questo fenotipo esaurito è stato mantenuto o aumentato (specificamente, EP11001T e M1056T) nel prodotto dei TIL scongelati. Non è stata osservata alcuna differenza significativa tra il prodotto dei TIL freschi e scongelati ( $p = 0,9809$ ). Una tendenza simile è stata mostrata nei TIL freschi in confronto a quelli scongelati con re-REP ( $p = 0,0912$ ). B) I re-REP freschi hanno mostrato una modesta diminuzione nell'espressione di PD-1 nella popolazione dei TIL CD4+. Tutte le altre condizioni mantenevano un modello di espressione di PD-1 paragonabile. È stata osservata una diminuzione o nessuna variazione nell'espressione di PD-1 nel prodotto fresco re-REP in confronto a tutte le altre condizioni. Un aumento nell'espressione di PD-1 è stato visto in M1062T, M1063T (CD4+) e EP11001T (CD8+) nel prodotto scongelato re-REP. Tutti gli altri prodotti scongelati re-REP hanno mostrato risultati paragonabili al prodotto scongelato.

**Figura 54A-54B:** cellule CD8+PD-1+. A) La popolazione CD8+ dal prodotto dei TIL freschi ha mostrato un fenotipo più esaurito associato ad un'aumentata espressione di PD-1. Un'eccezione è stata osservata in EP11001T dove il prodotto dei TIL CD8+ scongelati ha avuto un incremento modesto nell'espressione di PD-1 in confronto al prodotto dei TIL freschi. Vi era una piccola differenza, sebbene non significativa, nell'espressione di PD-1 nei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati ( $p = 0,3144$ ). B) Il prodotto dei TIL freschi ha mostrato un'espressione di PD-1 leggermente aumentata, ma non significativa in confronto ai TIL scongelati (il 6,74%, o 1,2 volte superiore ai TIL scongelati) suggerendo che il prodotto dei TIL scongelati era paragonabile in base al modello del fenotipo.

**Figura 55A-55B:** cellule CD4+LAG3+. I linfociti T esausti esprimono livelli elevati di recettore inibitorio LAG3 insieme a PD-1. A) I TIL CD4+ scongelati hanno mostrato livelli di espressione di LAG3 leggermente superiori, ma non significativi, rispetto ai TIL freschi ( $p = 0,52$ ). Un'eccezione è stata osservata in M1063T. In esperimenti dove è stata misurata l'espressione di LAG3 nei TIL CD4+ freschi e freschi re-REP, una

diminuzione dell'espressione LAG3+ è stata osservata nei campioni re-REP freschi in confronto ai TIL freschi. B) Complessivamente, vi è una modesta diminuzione nell'espressione di LAG3 nel prodotto dei TIL freschi re-REP. Si prega di notare che, affinché la figura B fosse mantenuta omogenea, M1061T, M1062T e M1064T sono stati esclusi dal momento che l'espressione di LAG3 non è stata misurata nel prodotto fresco.

**Figura 56A-56B:** cellule CD8+LAG3+. A) I TIL esperimenti CD8+LAG3+ hanno mostrato una modesta diminuzione negli esperimenti, con l'eccezione di M1063T in cui una marcata diminuzione dell'espressione di LAG3 è stata vista nei TIL freschi re-REP. Complessivamente, i TIL scongelati re-REP hanno mostrato un incremento significativo di 1,5 volte in confronto ai TIL freschi re-REP per l'espressione di LAG3 ( $p = 0,0154$ ). Tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i prodotti dei TIL freschi e dei TIL scongelati ( $p = 0,0884$ ). B) Una diminuzione approssimativamente del 30% nell'espressione di LAG3 nei TIL CD8+ dai re-REP freschi è stata osservata in confronto al prodotto dei TIL scongelati. Entrambi i TIL freschi e scongelati erano paragonabili ai TIL scongelati, mostrando un incremento modesto. (In questa figura, M1061T, M1062T e M1064T sono stati omessi dal momento che l'espressione di LAG3 non è stata misurata nei campioni dei TIL freschi o freschi re-REP.)

**Figura 57A-57B:** cellule CD4+TIM-3+. A) Come osservato precedentemente nel caso di PD-1 e LAG3, una diminuzione dell'espressione di TIM-3 è stata vista nei TIL freschi re-REP in confronto ai TIL scongelati re-REP. Indipendentemente, non esisteva alcuna differenza significativa tra TIL re-REP freschi e scongelati ( $p = 0,2007$ ). B) Nessuna variazione principale nell'espressione di TIM-3 è stata osservata tra i prodotti dei TIL freschi, scongelati e scongelati re-REP. Una modesta diminuzione del 9,2% nell'espressione di TIM-3 è stata osservata nei TIL freschi re-REP in confronto al prodotto re-REP scongelato.

**Figura 58A-58B:** cellule CD8+TIM-3+. A) Una tendenza simile nell'espressione di TIM-3, che è stata vista nella popolazione CD4+, è stata vista anche nei TIL CD8+. I TIL freschi re-REP avevano il fenotipo meno esaurito con bassa espressione di TIM-3, mostrando una differenza significativa in confronto ai TIL scongelati re-REP ( $p = 0,0147$ ). Il confronto di PD-1, LAG3 e TIM-3 suggerisce che i TIL freschi re-REP avevano un fenotipo meno esaurito con un fenotipo della CM aumentato. B) In confronto al prodotto dei TIL scongelati re-REP, i TIL freschi re-REP hanno mostrato una diminuzione del 22% significativa nell'espressione di TIM-3. Entrambi i TIL freschi e scongelati mostrano profili di espressione di TIM-3 simili.

**Figura 59:** potenziale citotossico dei TIL nei confronti della linea cellulare bersaglio P815.

**Figura 60A-60F:** profilo di respirazione metabolica dei TIL freschi, dei TIL freschi re-REP, e dei TIL scongelati re-REP. OCR basale (A), SRC manifesta (B), SRC2DG (C), SRC latente (D), ECAR basale (E), e riserva glicolitica (F).

**Figura 61A-61B:** la tecnologia flow-FISH è stata utilizzata per misurare la lunghezza media della ripetizione telomerica in 9 prodotti dei TIL scongelati post-REP del procedimento 2A. A) I dati rappresentano la lunghezza dei telomeri misurata mediante qPCR confrontando i TIL con 1.301 linfociti B) I dati mostrano la lunghezza dei telomeri misurata mediante il saggio flow-FISH dei TIL in confronto a cellule 1301. I dati utilizzati per i grafici vengono forniti in un formato di tabella (tabelle 25) nella sezione 10 dell'appendice. Complessivamente, vi era una somiglianza approssimativa nei modelli dei risultati dei due saggi della lunghezza dei telomeri, ma gli esperimenti continueranno per determinare quale metodo riflette più accuratamente la lunghezza reale dei telomeri dei TIL. Questa tecnica potrebbe essere applicata a futuri campioni clinici per determinare una relazione tra lunghezza dei telomeri e risposta del paziente ad una terapia con TIL.

**Figura 62A-62B:** selezione del fornitore del terreno privo di siero (sostituto del siero). Ciascun frammento è stato sottoposto a coltura in un singolo pozzetto di una piastra G-Rex a 24 pozzetti in quadruplica copia. Al giorno 11, il REP è stato iniziato utilizzando  $4^5$  TIL con  $10^6$  cellule nutritive per mimare il procedimento 2A. A) Istogramma che mostra la conta media delle cellule vitali registrata al giorno 11 (pre-REP) per ciascuna condizione. B) Istogramma che mostra la conta media delle cellule vitali registrata al giorno 22 (post-REP). Il valore di P è stato calcolato utilizzando il test t di Student. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, rispettivamente.

**Figura 63A-63B:** selezione del fornitore del terreno privo di siero (siero di lisato piastrinico). Ciascun frammento è stato sottoposto a coltura in un singolo pozzetto di una piastra G-Rex a 24 pozzetti in triplice copia. Al giorno 11, il REP è stato iniziato utilizzando  $4 \times 10^5$  TIL con  $10 \times 10^6$  cellule nutritive per mimare il procedimento 2A. A) Istogramma che mostra la conta media delle cellule vitali registrata al giorno 11 (pre-REP) per ciascuna condizione. B) Istogramma che mostra la conta media delle cellule vitali registrata al giorno 22 (post-REP). Il valore di P è stato calcolato utilizzando il test t di Student. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, rispettivamente. “#” non abbastanza frammenti tumorali.

**Figura 64A-64B:** confronto dell'efficacia del CTS OpTmizer con la condizione standard utilizzando il procedimento 2A in scala ridotta (G-Rex 5M). Due frammenti/G-Rex 5M sono stati sottoposti a coltura in triplice copia, il REP è stato iniziato utilizzando  $2^6$  TIL con  $50^6$  cellule nutritive per mimare il procedimento 2A. Le barre presentate sopra erano la conta media delle cellule vitali ottenuta al giorno 11 (A) o al giorno 22 (B).

**Figura 65A-65C:** riassunto del prima e del dopo l'espansione dei TIL estrapolato confrontando la condizione standard e CTS OpTmizer. A) pre-REP. B) Post-REP. C) Riassunto dell'espansione dei TIL estrapolato per la corsa a scala completa (standard contro CTS OpTmizer + SR).

**Figura 66:** CD8+ è stata raggruppata sulle cellule vive. 7 dei 9 tumori mostrano un aumento delle popolazioni CD8+ assolute con la condizione CTS + SR.

**Figura 67:** comparabilità dell'interferone gamma. ELISA per l'interferone gamma (Quantikine). La produzione di IFN- $\gamma$  è stata misurata

utilizzando il kit ELISA Quantikine da R&D Systems. CTS + SR ha prodotto una quantità paragonabile di IFN- $\gamma$  in confronto alla nostra condizione standard.

**Figura 68:** schema di una forma di realizzazione esemplificativa del protocollo di espansione rapida (REP). All'arrivo, il tumore viene frammentato, posto in palloni G-Rex con IL-2 per l'espansione dei TIL (espansione pre-REP), per 11 giorni. Per gli studi con triplo cocktail, IL-2/IL-15/IL-21 vengono aggiunte all'inizio del pre-REP. Per il protocollo di espansione rapida (REP), i TIL vengono sottoposti a coltura con cellule nutritive e OKT3 per l'espansione REP per ulteriori 11 giorni.

**Figura 69:** i TIL derivati da melanoma (n=4), e polmone (n=7) sono stati valutati fenotipicamente per le cellule CD4+ e CD8+ utilizzando la citometria a flusso dopo il pre-REP. \*I valori di p rappresentano la differenza tra l'IL-2 e IL-12/IL-15/IL-21 nelle cellule CD8+ utilizzando il test t di Student non accoppiato.

**Figura 70:** i TIL derivati da melanoma (n=4), e polmone (n=7) sono stati valutati fenotipicamente per CD27+ e CD28+ nelle cellule CD4+ e CD8+ utilizzando la citometria a flusso dopo il pre-REP.

**Figura 71A-71B:** i TIL sono stati valutati fenotipicamente per i sottoinsiemi effettori/della memoria (CD45RA e CCR-7) nelle cellule CD8+ e CD4+ (dati non mostrati) nel melanoma (n=4) (A) e nel polmone (n=8) (B). L'espressione di CXCR-3 è stata valutata nel melanoma e nel polmone. Tutta l'espressione fenotipica è stata valutata utilizzando la citometria a flusso dopo il pre-REP. TCM = memoria centrale, TSCM = cellule staminali della memoria, TEMRA (linfociti T effettori), TEM = memoria effettrice.

**Figura 72A-72C:** i TIL derivati da (A) melanoma (n=4) e (B) polmone (n=5) sono stati valutati per l'espressione CD107a+ in risposta alla stimolazione con PMA per 4 ore nelle cellule CD4+ e CD8+, mediante la citometria a flusso. (C) I TIL pre-REP (n=5) sono stati stimolati per 24 ore con OKT3 solubile (30 ng/ml) e i surmatanti sono stati valutati per l'IFN $\gamma$  mediante ELISA.

**Figura 73A-73B:** Il repertorio TCR $\nu\beta$  (24 specificità) è stato valutato nei TIL derivati da melanoma (A) e polmone (b) utilizzando il kit Beckman Coulter per la citometria a flusso.

**Figura 74:** esemplificativo procedimento di produzione di TIL crioconservati (~22 giorni).

**Figura 75A-75B:** al giorno 22, il prodotto cellulare ridotto nel volume viene raggruppato e campionato per determinare la prestazione della coltura prima del lavaggio e della formulazione. I campioni vengono analizzati sul contatore di cellule automatizzato NC-200 come descritto precedentemente. La densità totale delle cellule vitali viene determinata dalla media totale di conte duplicate da 4 campioni indipendenti. Il procedimento di generazione 2 (Gen 2) dà un prodotto dei TIL di una dose simile a quella della generazione 1 (Gen 1; media della Gen 1 = 4,10 ×

$10^{10} \pm 2,92 \times 10^{10}$ , media della Gen 2 =  $3,12 \times 10^{10} \pm 2,19 \times 10^{10}$ ). B) L'espansione viene calcolata per la fase REP come il dividendo della densità finale delle cellule vitali in relazione alla densità iniziale di semina dei TIL vitali. I prodotti dei TIL della Gen 2 hanno un'espansione inferiore in termini di numero di volte rispetto alla Gen 1 (media della Gen 1 =  $1,40 \times 10^3 \pm 9,86 \times 10^2$ , media della Gen 2 =  $5,11 \times 10^2 \pm 2,95 \times 10^2$ ).

**Figura 76:** i prodotti farmaceutici formulati di fresco sono stati testati per l'identità mediante la citometria a flusso per il rilascio. I procedimenti della Gen 1 e della Gen 2 producono colture di linfociti T ad alta purezza come definito dal fenotipo doppio positivo per CD45, CD3 (Gen 1 #  $\pm$  DS, Gen 2 #  $\pm$  DS). Il valore di P è stato calcolato utilizzando il test "t" di Mann-Whitney.

**Figura 77:** i flaconcini satellite crioconservati di prodotto farmaceutico formulato sono stati scongelati e saggiati per il fenotipo esteso mediante la citometria a flusso come descritto precedentemente. I prodotti della Gen 1 e della Gen 2 esprimono rapporti simili tra i sottotipi dei linfociti T CD8 e CD4. Il valore di P è stato calcolato utilizzando il test "t" di Mann-Whitney.

**Figura 78:** i flaconcini satellite crioconservati di prodotto farmaceutico formulato sono stati scongelati e saggiati per il fenotipo esteso mediante la citometria a flusso come descritto precedentemente. I prodotti della Gen 1 e della Gen 2 esprimono livelli simili di molecole costimolatorie CD27 e CD28 sui sottoinsiemi di linfociti T. Il valore di P è stato calcolato utilizzando il test "t" di Mann-Whitney. Molecole costimolatorie quali CD27 e CD28 sono richieste per fornire la trasduzione del segnale secondaria e terziaria necessaria per la proliferazione delle cellule effettrici a seguito del coinvolgimento dei recettori dei linfociti.

**Figura 79:** la tecnologia flow-FISH è stata utilizzata per misurare la lunghezza media della ripetizione telomerica come descritto precedentemente. Il suddetto valore RTL indica che la fluorescenza media dei telomeri per cromosoma/genoma nella Gen 1 (una forma di realizzazione del procedimento 1C) è  $\% \pm DS\%$ , e nella Gen 2 è  $\% \pm DS\%$  della fluorescenza dei telomeri per cromosoma/genoma nelle cellule della linea di controllo (linea di cellule leucemiche 1301). I dati indicano che i prodotti della Gen 2 hanno mediamente lunghezze dei telomeri almeno paragonabili a quelle dei prodotti della Gen 1. La lunghezza dei telomeri è una misura surrogata della lunghezza della coltura cellulare *ex vivo*.

**Figura 80:** prodotti farmaceutici della Gen 2 (una forma di realizzazione del procedimento 2A) mostrano una capacità aumentata di produrre IFN- $\gamma$  rispetto ai prodotti farmaceutici della Gen 1. L'abilità del prodotto farmaceutico di essere riattivato e secernere citochine è una misura surrogata della funzione *in vivo* a seguito del legame del TCR ad un antigene affine nel contesto dell'HLA.

**Figura 81:** diversità dei recettori dei linfociti T: RNA da  $10 \times 10^6$  TIL dai prodotti farmaceutici della Gen 1 (una forma di realizzazione del procedimento 1C) e della Gen 2 (una forma di realizzazione del procedimento 2A) sono stati testati per determinare il numero e la frequenza totali di sequenze di CDR3 uniche presenti in ciascun prodotto. A) Numero totale di sequenze di CDR3 uniche presenti in ciascun prodotto (Gen 1 n=#,

media  $\pm$  DS, Gen 2 n=#, media  $\pm$  DS). B) Le sequenze di CDR3 uniche sono state indicizzate rispetto alla frequenza in ciascun prodotto per fornire un punteggio rappresentativo della diversità relativa dei recettori dei linfociti T nel prodotto. I prodotti dei TIL da entrambi i procedimenti sono costituiti da popolazioni policlonali di linfociti T con specificità e avidità differenti per un antigene. L'ampiezza del repertorio totale di linfociti T può essere indicativa del numero di epitopi perseguibili sulle cellule tumorali.

**Figura 82:** mostra un diagramma di una forma di realizzazione del procedimento 2A, un procedimento di 22 giorni per la produzione dei TIL.

**Figura 83:** tabella di confronto dei passaggi da A a F da forme di realizzazione esemplificative del procedimento 1C e del procedimento 2A.

**Figura 84:** confronto dettagliato di una forma di realizzazione del procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A.

**Figura 85:** schema dettagliato di una forma di realizzazione di un procedimento di terapia con TIL.

**Figure 86A-86C:** caratterizzazione fenotipica dei prodotti dei TIL utilizzando un saggio di citometria a flusso a 10 colori. (A) La percentuale dei sottoinsiemi di linfociti T e linfociti non T è definita da  $CD45^+CD3^+$  e  $CD45^-(non-linfocita)/CD45^+CD3^-$  (linfocita non linfocita T), rispettivamente. Complessivamente, >99% dei prodotti dei TIL testati consisteva di linfociti T ( $CD45^+CD3^+$ ). Viene mostrata una media dei prodotti dei TIL (n=10). (B) Percentuale di due sottoinsiemi di linfociti T comprendenti  $CD45^+CD3^+CD8^+$  (cerchio blu aperto) e  $CD45^+CD3^+CD4^+$  (cerchio rosa aperto). Nessuna differenza statistica nella percentuale di entrambi i sottoinsiemi viene osservata utilizzando il test t di Student non accoppiato (P=0,68). (C) La popolazione di linfociti non T è stata caratterizzata per quattro sottoinsiemi differenti comprendenti: 1) non linfocita ( $CD45^-$ ), 2) linfocita NK ( $CD45^+CD3^-CD16^+/56^+$ ), 3) linfocita B ( $CD45^+CD19^+$ ), e 4) linfocita non NK/B ( $CD45^+CD3^-CD16^-CD56^-CD19^-$ ).

**Figure 87A-87B:** caratterizzazione di sottoinsiemi di linfociti T in popolazioni cellulari  $CD45^+CD3^+CD4^+$  e  $CD45^+CD3^+CD8^+$ . I sottoinsiemi di linfociti T vergini, della memoria centrale (TCM), della memoria effettrice (TEF), e della memoria effettrice RA+ (EMRA) sono stati definiti utilizzando  $CD45RA$  e  $CCR-7$ . Le figure mostrano sottoinsiemi rappresentativi di linfociti T da 10 prodotti finali dei TIL in entrambe le popolazioni cellulari  $CD4^+$  (A), e  $CD8^+$  (B). Il sottoinsieme di linfociti T della memoria effettrice (cerchio blu aperto) è un'importante popolazione (>93%) in entrambi i sottoinsiemi  $CD4^+$  e  $CD8^+$  del prodotto finale dei TIL. Meno del 7% delle cellule dei prodotti dei TIL sono del sottoinsieme della memoria centrale (cerchio rosa aperto). I sottoinsiemi EMRA (cerchio grigio aperto) e vergini (cerchio nero aperto) sono a stento rilevati nel prodotto dei TIL (<0,02%). I valori di p rappresentano la differenza tra EM e CM utilizzando il test t di Student non accoppiato.

**Figure 88A-88B:** rilevamento dell'espressione di MCSP e EpCAM in cellule tumorali di melanoma. Linee cellulari tumorali di melanoma (WM35, 526, e 888), linee cellulari di melanoma derivate da pazienti (1028, 1032, e 1041), e una linea cellulare di adenocarcinoma coloretale (HT29 come controllo negativo) sono state caratterizzate mediante colorazione per i marcatori MCSP (proteoglicano condroitinsolfato associato al melanoma) e

EpCAM (molecola di adesione delle cellule epiteliali). (A) Una media del 90% delle cellule tumorali di melanoma esprimono MCSP. (B) L'espressione di EpCAM non è stata rilevata nelle linee cellulari tumorali di melanoma in confronto al controllo positivo HT29, una linea cellulare tumorale EpCAM+.

**Figure 89A-89B:** rilevamento di controlli iniettati per la determinazione dell'accuratezza del rilevamento del tumore. Il saggio è stato eseguito iniettando quantità note di cellule tumorali nelle sospensioni di PBMC (n=10). 526 cellule tumorali di melanoma MCSP+ sono state diluite in rapporti di 1:10, 1:100, e 1:1.000, quindi miscelate con PBMC e colorate con anticorpi anti-MCSP ed anti-CD45 e con un colorante per la vitalità e analizzate mediante la citometria a flusso. (A) Approssimativamente 3.000, 300, e 30 cellule sono state rilevate nella diluizione di 1:10, 1:100, e 1:1.000, rispettivamente. (B) Una media (AV) e una deviazione standard (DS) delle cellule ottenute in ciascuna condizione sono state utilizzate per definire i limiti di riferimento superiore e inferiore.

**Figure 90A-90B:** studio di ripetibilità dei limiti superiore e inferiore in controlli iniettati. Tre esperimenti indipendenti sono stati eseguiti in triplice copia per determinare la ripetibilità del saggio di iniezione. (A) Il numero di cellule tumorali MCSP+ rilevate era costantemente all'interno dell'intervallo dei limiti di riferimento superiore e inferiore. (B) Il grafico di regressione lineare dimostra la correlazione tra le cellule MCSP+ e le diluizioni di iniezione ( $R^2=0,99$ ) con la linea nera continua che mostra l'adattamento migliore. Le linee tratteggiate verde e grigia rappresentano i limiti di predizione al 95% nella curva e nei campioni standard (numero dell'esperimento da 1 a 3), rispettivamente.

**Figure 91A-91B:** rilevamento del tumore melanoma residuo nei prodotti dei TIL. I prodotti dei TIL sono stati valutati per la contaminazione tumorale residua utilizzando il saggio sviluppato (n=15). (A e B) Il numero mediano e la percentuale di eventi MCSP+ rilevabili erano 2 e lo 0,0002%, rispettivamente.

**Figura 92:** valutazione della potenza dei prodotti dei TIL a seguito dell'attivazione delle cellule T. Secrezione di IFN $\gamma$  dopo la ristimolazione con anti-CD3/CD28/CD137 nei prodotti dei TIL valutati mediante ELISA in duplice copia (n=5). La secrezione di IFN $\gamma$  da parte dei prodotti dei TIL era significativamente maggiore di quella dei controlli non stimolati utilizzando il test di Wilcoxon del rango segnato (P=0,02), e costantemente >1.000 pg/ml. La secrezione di IFN $\gamma$  >200 pg/ml è considerata potente, il valore di p <0,05 è considerato statisticamente significativo.

**Figura 93:** rappresentazione di una forma di realizzazione di un procedimento di produzione dei TIL crioconservati (22 giorni).

**Figura 94:** tabella dei miglioramenti del procedimento da Gen 1 a Gen 2.

**Figure 95A-95C:** cellule vitali totali, velocità di crescita, e vitalità. Al giorno 22, il prodotto cellulare ridotto nel volume viene raggruppato e campionato per determinare la prestazione della coltura prima del lavaggio e della formulazione. (A) I campioni vengono analizzati sul contatore di

cellule automatizzato NC-200 come descritto precedentemente. La densità totale delle cellule vitali viene determinata dalla media totale di conte duplicate da 4 campioni indipendenti. Il procedimento della Gen 2 dà un prodotto dei TIL di una dose simile a quella della Gen 1 (media della Gen 1 =  $4,10 \times 10^{10} \pm 2,8 \times 10^{10}$ , media della Gen 2 =  $4,12 \times 10^{10} \pm 2,5 \times 10^{10}$ ). (B) La velocità di crescita viene calcolata per la fase REP come  $gr = \ln(N(t)/N(0))/t$ . (C) La vitalità cellulare è stata valutata da 9 lotti di sviluppo del procedimento utilizzando il Cellometer K2 come descritto precedentemente. Nessuna riduzione significativa nella vitalità cellulare è stata osservata in seguito ad un singolo ciclo di congelamento/scongelo del prodotto formulato. La riduzione media della vitalità a seguito dello scongelamento e del campionamento è del 2,19%.

**Figure 96A-96C:** i prodotti della Gen 2 sono colture altamente pure di linfociti T che esprimono molecole costimolatorie a livelli paragonabili a quelli della Gen 1. (A) I prodotti farmaceutici formulati di fresco sono stati testati per l'identità mediante la citometria a flusso per il rilascio. I procedimenti della Gen 1 e della Gen 2 producono colture di linfociti T a purezza elevata come definito dal fenotipo CD45+,CD3+ (doppio positivo). (B & C) I flaconcini satellite crioconservati di prodotto farmaceutico formulato sono stati scongelati e saggiati per il fenotipo esteso mediante la citometria a flusso come descritto precedentemente. I prodotti della Gen 1 e della Gen 2 esprimono livelli simili di molecole costimolatorie CD27 e CD28 sui sottoinsiemi di linfociti T. Molecole costimolatorie quali CD27 e CD28 sono richieste per fornire la trasduzione del segnale secondaria e terziaria necessaria per la proliferazione delle cellule effettrici a seguito del coinvolgimento dei recettori dei linfociti. Il valore di P è stato calcolato utilizzando il test "t" di Mann-Whitney.

**Figura 97:** i prodotti della Gen 2 mostrano lunghezze dei telomeri simili. Tuttavia, alcune popolazioni di TIL possono tendere verso un telomero relativamente più lungo.

**Figura 98:** i prodotti farmaceutici della Gen 2 secernono IFN $\gamma$  in risposta al reclutamento di CD3, CD28, e CD137.

**Figure 99A-99B:** diversità dei recettori dei linfociti T. (A) Le sequenze di CDR3 uniche sono state indicizzate rispetto alla frequenza in ciascun prodotto per fornire un punteggio rappresentativo della diversità complessiva dei recettori dei linfociti T nel prodotto. (B) Numero medio totale di sequenze di CDR3 uniche presenti in ciascun prodotto di infusione.

**Figura 100:** una forma di realizzazione di un procedimento di produzione dei TIL della presente invenzione.

**Figura 101:** potenziamento dell'espansione durante il pre-REP con IL-2/IL-15/IL-21 in istologie tumorali multiple.

**Figure 102A-102B:** IL-2/IL-15/IL-21 hanno aumentato la percentuale di cellule CD8+ nel carcinoma polmonare, ma non nel melanoma. I TIL derivati da (A) melanoma (n=4), e (B) polmone (n=7) sono stati valutati fenotipicamente per le cellule CD4+ e CD8+ utilizzando la citometria a

flusso dopo il pre-REP.

**Figure 103A-103B:** l'espressione di CD27 era leggermente aumentata nelle cellule CD8+ in colture trattate con IL-2/IL-15/IL-21. I TIL derivati da (A) melanoma (n=4), e (B) polmone (n=7) sono stati valutati fenotipicamente per CD27+ e CD28+ nelle cellule CD4+ e CD8+ utilizzando la citometria a flusso dopo il pre-REP.

**Figure 104A-104B:** i sottoinsiemi di linfociti T erano inalterati con l'aggiunta di IL-15/IL-21. I TIL sono stati valutati fenotipicamente per i sottoinsiemi effettori/della memoria (CD45RA e CCR-7) nelle cellule CD8+ e CD4+ (dati non mostrati) da (A) melanoma (n=4), e (B) polmone (n=8) mediante citometria a flusso dopo il pre-REP.

**Figure 105A-105C:** la capacità funzionale di TIL è stata aumentata in modo differenziale con IL-2/IL-15/IL-21. I TIL derivati da (A) melanoma (n=4) e (B) polmone (n=5) sono stati valutati per l'espressione CD107a+ in risposta alla stimolazione con PMA per 4 ore nelle cellule CD4+ e CD8+, mediante la citometria a flusso. (C) I TIL pre-REP derivati da melanoma e polmone sono stati stimolati per 24 ore con l'anticorpo anti-CD3 solubile e i surnatanti sono stati valutati per IFN $\gamma$  mediante ELISA.

**Figure 106A-106B:** Il repertorio TCR $\nu\beta$  (24 specificità) è stato valutato nei TIL derivati da un (A) melanoma e un (B) tumore al polmone utilizzando il kit Beckman Coulter per la citometria a flusso.

**Figura 107:** schema del procedimento di produzione degli LN-144 crioconservati della Gen 2.

**Figura 108:** schema della progettazione dello studio clinico multicentrico di fase 2 di nuovi TIL crioconservati somministrati a pazienti con melanoma metastatico.

**Figura 109:** tabella che illustra le caratteristiche di confronto dei pazienti dalla coorte 1 (ASCO 2017) rispetto a quelli dalla coorte 2.

**Figura 110:** tabella che illustra gli eventi avversi emersi durante il trattamento ( $\geq 30\%$ ).

**Figura 111:** efficacia del prodotto di infusione e della terapia con TIL.

**Figura 112:** stato clinico di pazienti valutabili per la risposta con SD o con risposta migliore.

**Figura 113:** variazione percentuale nella somma dei diametri.

**Figura 114:** un aumento del livello di HMGB1 è stato osservato a seguito del trattamento con i TIL.

**Figura 115:** un aumento nel biomarcatore IL-10 è stato osservato dopo l'infusione di LN-144.

**Figura 116:** caratteristiche dei pazienti aggiornate per la coorte 2 dello studio clinico di fase 2 nel melanoma metastatico dalla seconda porzione di dati (n=17 pazienti).

**Figura 117:** eventi avversi emersi durante il trattamento per la coorte 2 ( $\geq 30\%$ ) dalla seconda porzione di dati (n=17 pazienti).

**Figura 118:** tempo alla risposta per pazienti valutabili (malattia stabile o migliore) nella coorte 2 dalla seconda porzione di dati (n=17 pazienti). Dei 10 pazienti nel gruppo per l'efficacia, un paziente (paziente 10) non era valutabile a causa di morte correlata a melanoma prima della prima valutazione del tumore non rappresentata sulla figura.

**Figura 119:** dati di efficacia aggiornati per la coorte 2 dalla seconda porzione di dati (n=17 pazienti). Il numero medio dei TIL infusi è  $34 \times 10^9$ . Il numero mediano di terapie precedenti era 4,5. I pazienti con una mutazione di BRAF rispondevano, così come i pazienti con BRAF selvatico (un \* si riferisce a pazienti con una mutazione di BRAF). Un paziente (paziente 10) non era valutabile a causa di morte correlata a melanoma prima della prima valutazione del tumore, ma è stato ancora considerato nel gruppo per l'efficacia. Abbreviazioni: PR, risposta parziale; SD, malattia stabile; PD, malattia progressiva.

**Figura 120:** dati di efficacia aggiornati per pazienti valutabili dalla coorte 2 dalla seconda porzione di dati (n=17 pazienti). Il \* indica un paziente non valutabile che non ha raggiunto la prima valutazione. Tutti i pazienti valutabili per l'efficacia avevano ricevuto terapie precedenti con un inibitore dei checkpoint anti-PD-1 ed anti-CTLA-4.

**Figura 121:** scansione rappresentativa di tomografia computerizzata di un paziente (003-015) con una PR dalla coorte 2, seconda porzione di dati.

**Figura 122:** correlazione dell'induzione dell'IFN- $\gamma$  da parte del prodotto dei TIL prima dell'infusione con riduzione clinica della dimensione del tumore al giorno 42 dopo l'infusione dei TIL.

**Figura 123:** livelli di IP-10 (CXCL10) (pg/ml,  $\log_{10}$ ) prima e dopo l'infusione di una forma di realizzazione del prodotto dei TIL della Gen 2. L'IP-10 è un marcatore dell'adesione cellulare e dell'homing.

**Figura 124:** livelli di IP-10 (CXCL10) (pg/ml,  $\log_{10}$ ) prima e dopo l'infusione di una forma di realizzazione del prodotto dei TIL della Gen 1.

**Figura 125:** livelli di MCP-1 (pg/ml,  $\log_{10}$ ) prima e dopo l'infusione di una forma di realizzazione del prodotto dei TIL della Gen 2. MCP-1 è un marcatore dell'adesione cellulare e dell'homing.

**Figura 126:** livelli di MCP-1 (pg/ml,  $\log_{10}$ ) prima e dopo l'infusione di una forma di realizzazione del prodotto dei TIL della Gen 1.

**Figura 127:** dati da studi di fase 2 in carcinoma del collo dell'utero e carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC). SD = malattia stabile. PR = malattia progressiva. PR = risposta parziale.

#### BREVE DESCRIZIONE DELL'ELENCO DELLE SEQUENZE

La SEQ ID NO: 1 è la sequenza amminoacidica della catena pesante del muromonab.

La SEQ ID NO: 2 è la sequenza amminoacidica della catena leggera del muromonab.

La SEQ ID NO: 3 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-2 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 4 è la sequenza amminoacidica dell'aldesleuchina.

La SEQ ID NO: 5 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-4 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 6 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-7 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 7 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-15 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 8 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-21 ricombinante umana.

## DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

### I. Introduzione

La terapia cellulare adottiva che utilizza TIL sottoposti a coltura *ex vivo* mediante il protocollo di espansione rapida (REP) ha prodotto una terapia cellulare adottiva riuscita in seguito all'immunosoppressione dell'ospite in pazienti con melanoma. I parametri correnti di accettabilità dell'infusione si basano su letture della composizione dei TIL (per esempio positività per CD28, CD8, o CD4) e sull'espansione e sulla vitalità in termini di numero di volte del prodotto del REP.

I protocolli REP correnti danno poche informazioni sulla salute dei TIL che saranno infusi nel paziente. I linfociti T subiscono un cambiamento metabolico profondo nel corso della loro maturazione da linfociti T vergini ad effettori (si veda Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17, 364, e in particolare per la discussione e i marcatori del metabolismo anaerobico e aerobico). Per esempio, i linfociti T vergini ricorrono alla respirazione mitocondriale per produrre ATP, mentre i linfociti T effettori maturi, sani quali i TIL sono altamente glicolitici, avvalendosi della glicolisi aerobica per fornire i substrati bioenergetici che essi richiedono per la proliferazione, la migrazione, l'attivazione, e l'efficacia antitumorale.

Studi precedenti riportano che la limitazione della glicolisi e la promozione del metabolismo mitocondriale nei TIL prima del trasferimento sono desiderabili, dal momento che le cellule che dipendono fortemente dalla glicolisi soffriranno la deprivazione di nutrienti a seguito del trasferimento adottivo che risulta nella morte della maggioranza delle cellule trasferire. Così, l'arte insegna che la promozione del metabolismo mitocondriale potrebbe promuovere la longevità *in vivo* e in effetti suggerisce di utilizzare inibitori della glicolisi prima dell'induzione della risposta immunitaria.

Si veda Chang et al. (Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17(364)).

Vengono descritti qui, sebbene non rivendicati, metodi per valutare e quantificare questo incremento nella salute metabolica. Così, vengono descritti qui, sebbene non rivendicati, metodi per saggiare la salute relativa di una popolazione di TIL utilizzando una o più valutazioni generali del

metabolismo, compresi, ma senza limitazione, tassi e quantità di glicolisi, fosforilazione ossidativa, capacità respiratoria residua (SRC), e riserva glicolitica.

Inoltre, vengono anche descritti qui, sebbene non rivendicati, metodi per valutare e quantificare questo incremento nella salute metabolica. Così, vengono descritti qui, ma non rivendicati, metodi per saggiare la salute relativa di una popolazione di TIL utilizzando una o più valutazioni generali del metabolismo, compresi, ma senza limitazione, tassi e quantità di glicolisi, fosforilazione ossidativa, capacità respiratoria residua (SRC), e riserva glicolitica.

Inoltre, eventuali ulteriori valutazioni includono, ma senza limitazione, produzione di ATP, massa mitocondriale e assorbimento del glucosio.

## II. Definizioni

Se non definiti diversamente, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati qui hanno lo stesso significato di quello inteso comunemente da parte di un esperto nell'arte a cui questa invenzione appartiene.

Il termine "*in vivo*" si riferisce a un evento che avviene nel corpo di un soggetto.

Il termine "*in vitro*" si riferisce a un evento che avviene all'esterno del corpo di un soggetto. I saggi *in vitro* comprendono saggi basati su cellule in cui vengono impiegate cellule vive o morte e possono comprendere anche un saggio senza cellule in cui non vengono impiegate cellule intatte.

Il termine "*ex vivo*" si riferisce a un evento che implica il trattamento o l'esecuzione di una procedura su una cellula, un tessuto e/o un organo che è stata/o rimossa/o dal corpo di un soggetto. Appropriatamente, la cellula, il tessuto e/o l'organo può essere restituita/o al corpo del soggetto in un metodo di intervento chirurgico o di trattamento.

Il termine "espansione rapida" significa un aumento del numero di TIL specifici per l'antigene di circa almeno 3 volte (o 4, 5, 6, 7, 8, o 9 volte) nel corso di una settimana, più preferibilmente almeno circa 10 volte (o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90 volte) nel corso di una settimana, o il più preferibilmente almeno circa 100 volte nel corso di una settimana. Un certo numero di protocolli di espansione rapida vengono illustrati sotto.

Con "linfociti infiltranti il tumore" o "TIL" qui si intende una popolazione di cellule originariamente ottenuta come globuli bianchi che hanno lasciato il circolo sanguigno di un soggetto e sono migrati in un tumore. I TIL includono, ma senza limitazione, linfociti T CD8+ citotossici (linfociti), linfociti T CD4+ Th1 e Th17, le cellule natural killer, le cellule dendritiche ed i macrofagi M1. I TIL includono TIL sia primari che secondari. I "TIL primari" sono quelli che vengono ottenuti da campioni di tessuto da pazienti come descritto qui (qualche volta indicati come "raccolti di fresco"), e i "TIL secondari" sono qualsiasi popolazione cellulare di TIL che è stata espansa o ha proliferato come discusso qui, compresi, ma senza limitazione, i TIL non purificati e i TIL espansi ("TIL REP" o "TIL post-REP"). Le popolazioni cellulari di TIL possono

includere TIL geneticamente modificati.

Con “popolazione di cellule” (compresi i TIL) qui si intende un certo numero di cellule che condividono caratteristiche distintive comuni. In generale, le popolazioni variano generalmente da  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{10}$  in numero, con differenti popolazioni di TIL che comprendono numeri differenti. Per esempio, l’iniziale crescita di TIL primari in presenza di IL-2 risulta in una popolazione di TIL non purificati di grossolanamente  $1 \times 10^8$  cellule. L’espansione REP viene in generale eseguita per fornire popolazioni da  $1,5 \times 10^9$  a  $1,5 \times 10^{10}$  cellule per infusione.

Per “TIL crioconservati” qui si intende che i TIL, primari, non purificati, o espansi (TIL REP), vengono trattati e conservati nell’intervallo da circa  $-150^\circ\text{C}$  a  $-60^\circ\text{C}$ . I metodi generali per la crioconservazione vengono inoltre descritti qui altrove, compresi negli esempi. Per chiarezza, i “TIL crioconservati” sono distinguibili dai campioni congelati di tessuto che possono essere utilizzati come fonte di TIL primari.

Per “TIL crioconservati scongelati” qui si intende una popolazione di TIL che è stata precedentemente crioconservata e quindi trattata per ritornare a temperatura ambiente o superiore, comprese, ma senza limitazione, temperature da coltura cellulare o temperature in cui i TIL possono essere somministrati a un paziente.

I TIL possono essere generalmente definiti biochimicamente, utilizzando marcatori della superficie cellulare, o funzionalmente, mediante la loro capacità di infiltrare tumori ed effettuare il trattamento. I TIL possono essere in generale classificati mediante l’espressione di uno o più dei seguenti biomarcatori: CD4, CD8, TCR  $\alpha\beta$ , CD27, CD28, CD56, CCR-7, CD45Ra, CD95, PD-1, e CD25. Inoltre e in alternativa, i TIL possono essere funzionalmente definiti mediante la loro capacità di infiltrare tumori solidi a seguito della reintroduzione in un paziente.

Il termine “terreni di crioconservazione” o “terreno di crioconservazione” si riferisce a qualsiasi terreno che può essere utilizzato per la crioconservazione delle cellule. Tali terreni possono includere terreni comprendenti DMSO dal 7% al 10%. I terreni esemplificativi includono CryoStor CS10, Iperthermasol, così come loro combinazioni. Il termine “CS10” si riferisce a un mezzo di crioconservazione che è ottenuto da Stem Cell Technologies o da Biolife Solutions. Il mezzo CS10 può essere indicato con il nome commerciale “CryoStor® CS10”. Il mezzo CS10 è mezzo un privo di siero, privo di componenti animali che comprende DMSO.

Il termine “linfocita T della memoria centrale” si riferisce a un sottoinsieme di linfociti T che nell’uomo sono CD45R0+ ed esprimono costitutivamente CCR-7 (CCR-7<sup>hi</sup>) e CD62L (CD62<sup>hi</sup>). Il fenotipo superficiale dei linfociti T della memoria centrale comprende anche TCR, CD3, CD127 (IL-7R), e IL-15R. I fattori di trascrizione per i linfociti T della memoria centrale includono BCL-6, BCL-6B, MBD2, e BMI1. I linfociti T della memoria centrale secernono principalmente IL-2 e CD40L come molecole effettrici dopo l’innesco del TCR. I linfociti T della memoria centrale sono prevalenti nel compartimento CD4 nel sangue, e nell’uomo sono proporzionalmente arricchiti nei linfonodi e nelle tonsille.

Il termine “linfocita T della memoria effettrice” si riferisce a un sottoinsieme dei linfociti T umani o di mammifero che, come i linfociti T della memoria centrale, sono CD45R0+, ma hanno perso l’espressione costitutiva di CCR-7 (CCR-7<sup>lo</sup>) e sono eterogenei o scarsi nell’espressione di CD62L (CD62L<sup>lo</sup>). Il fenotipo superficiale dei linfociti T della memoria centrale comprende anche TCR, CD3, CD127 (IL-7R), e IL-15R. I fattori di trascrizione per i linfociti T della memoria centrale includono BLIMP1. I linfociti T della memoria effettrice secernono rapidamente livelli elevati di citochine infiammatorie dopo la stimolazione antigenica, compresi interferone  $\gamma$ , IL-4, e IL-5. I linfociti T della memoria effettrice sono prevalenti nel compartimento CD8 nel sangue, e nell’uomo sono proporzionalmente arricchiti nel polmone, nel fegato e nell’intestino. I linfociti T CD8+ della memoria effettrice trasportano grandi quantità di perforina.

Il termine “sistema chiuso” si riferisce a un sistema che è chiuso all’ambiente esterno. Qualsiasi sistema chiuso appropriato per i metodi di coltura cellulare può essere impiegato con i metodi della presente invenzione. I sistemi chiusi includono, per esempio, ma non sono limitati a contenitori G chiusi. Una volta che un segmento tumorale viene aggiunto al sistema chiuso, il sistema non viene aperto all’ambiente esterno fino a che i TIL non sono pronti da somministrare al paziente.

I termini “frammentazione”, “frammento”, e “frammentato”, come utilizzati qui per descrivere procedimenti per distruggere un tumore, comprendono metodi di frammentazione meccanica quali la frantumazione, l’affettatura, la divisione, e lo spezzettamento del tessuto tumorale così come qualsiasi altro metodo per distruggere la struttura fisica del tessuto tumorale.

I termini “cellule mononucleate del sangue periferico” e “PBMC” si riferiscono a una cellula del sangue periferico avente un nucleo rotondo, compresi linfociti (linfociti T, linfociti B, linfociti NK) e monociti. Preferibilmente, le cellule mononucleate del sangue periferico sono cellule mononucleate del sangue periferico allogene irradiate. Le PBMC sono un tipo di cellula presentante l’antigene.

Il termine “anticorpo anti-CD3” si riferisce a un anticorpo o a una sua variante, per esempio, un anticorpo monoclonale e comprendente anticorpi umani, umanizzati, chimerici o murini che sono diretti nei confronti del recettore CD3 nel recettore per l’antigene dei linfociti T di linfociti T maturi. Gli anticorpi anti-CD3 includono OKT-3, noto anche come muromonab. Gli anticorpi anti-CD3 includono anche il clone UHCT1, noto anche come T3 e CD3 $\epsilon$ . Altri anticorpi anti-CD3 includono, per esempio, oteelixumab, teplizumab, e visilizumab.

Il termine “OKT-3” (indicato qui anche con “OKT3”) si riferisce a un anticorpo monoclonale o un suo bioanalogo o una sua variante, compresi anticorpi umani, umanizzati, chimerici, o murini, diretto nei confronti del recettore CD3 nel recettore per l’antigene dei linfociti T di linfociti T maturi, e comprende forme disponibili in commercio quali OKT-3 (30 ng/ml, CD3 MACS GMP puro, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, California, USA) e muromonab o sue varianti, sostituzioni amminoacidiche conservative, glicoforme, o suoi bioanaloghi. Le sequenze

amminoacidiche delle catene pesanti e leggere del muromonab vengono fornite nella tabella 1 (SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2). Un ibridoma in grado di produrre OKT-3 è depositato presso la Raccolta Americana di Colture Tipo e ad esso è stato assegnato il numero di accesso ATCC. CRL 8001. Un ibridoma in grado di produrre OKT-3 è depositato anche presso la Collezione Europea di Colture Cellulari Autentiche (ECACC) e ad esso è stato assegnato il numero di catalogo 86022706.

Tabella 1. Sequenze amminoacidiche del muromonab.

Identificatore	Sequenza (simboli degli amminoacidi a una lettera)	
SEQ ID NO: 1  catena pesante  del  muromonab	QVQLQDSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY	60
	NQKFRDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA	120
	KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTITW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL	180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKHTTCP PCPAPPELLGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450
SEQ ID NO:2  catena leggera  del  muromonab	QIVLTQSPAI MSASPGKVT MTCASASSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH	60
	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQOW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFFPS	120
	SEQLTSGGAS VVCFLNDFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL	180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	213

Il termine "IL-2" (indicato qui anche con "IL2") si riferisce al fattore di crescita dei linfociti T noto come interleuchina 2, e comprende tutte le forme di IL-2 comprendenti forme umane e di mammifero, loro sostituzioni amminoacidiche conservative, glicofornite, bioanaloghi, e varianti. IL-2 viene descritta, per esempio, in Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 e Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79. La sequenza amminoacidica di IL-2 ricombinante umana adatta per l'uso nell'invenzione viene fornita nella tabella 2 (SEQ ID NO: 3). Per esempio, il termine IL-2 comprende forme ricombinanti umane di IL-2 quale l'aldesleuchina (PROLEUKIN, disponibile in commercio da fornitori diversi in 22 milioni di UI per flaconcini ad uso singolo), così come la forma di IL-2 ricombinante fornita in commercio da CellGenix, Inc., Portsmouth, New Hampshire, USA (CELLGRO GMP) o ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, New Jersey, USA (numero di catalogo CYT-209-b) e altri equivalenti commerciali da altri fornitori. L'aldesleuchina (desalanil-1, serin-125 IL-2 umana) è una forma ricombinante umana non glicosilata di IL-2 con un peso molecolare di approssimativamente 15 kDa. La sequenza amminoacidica dell'aldesleuchina adatta per l'uso nell'invenzione viene fornita nella tabella 2 (SEQ ID NO: 4). Il termine IL-2 comprende anche forme PEGilate di IL-2, come descritto qui, compreso il profarmaco

NKTR-214 IL2 PEGilata, disponibile da Nektar Therapeutics, San Francisco sud, California, USA. NKTR-214 e IL-2 PEGilata adatti per l'uso nell'invenzione vengono descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2014/0328791 A1 e nella pubblicazione della domanda di brevetto internazionale No. WO 2012/065086 A1. Le forme alternative di IL-2 coniugata adatte per l'uso nell'invenzione vengono descritte nei brevetti US 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 e 4902,502. Le formulazioni di IL-2 adatte per l'uso nell'invenzione vengono descritte nel brevetto US 6,706,289.

Tabella 2. Sequenze amminoacidiche delle interleuchine.

Identificatore	Sequenza (simboli degli amminoacidi a una lettera)	
SEQ ID NO: 3  IL-2  ricombinante  umana (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKGYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO: 4  aldesleuchina	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGET TFMCEYADAT ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO: 5  IL-4  ricombinante  umana (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QRTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO: 6  IL-7  ricombinante  umana (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDMSKE IGSNCLNNEF NFFKRHCDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKRLNDLC FLKRLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO: 7  IL-15  ricombinante	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115

umana (rhIL-15)	
SEQ ID NO: 8	<p>MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60</p> <p>NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLOKMIHQ 120</p> <p>HLSSRTHGSE DS 132</p>
IL-21 ricombinante umana (rhIL-21)	

Il termine “IL-4” (indicato qui anche con “IL4”) si riferisce alla citochina nota come interleuchina 4, che viene prodotta dai linfociti T Th2 e dagli eosinofili, dai basofili, e dai mastociti. IL-4 regola la differenziazione dei linfociti T helper vergini (cellule Th0) in linfociti T Th2. Steinke e Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70. A seguito dell’attivazione da parte di IL-4, i linfociti T Th2 producono successivamente ulteriore IL-4 in un circuito di regolazione positivo. IL-4 stimola anche la proliferazione dei linfociti B e l’espressione dell’MHC di classe II, ed induce il cambiamento di classe verso IgE e l’espressione di IgG1 da parte dei linfociti B. IL-4 ricombinante umana adatta per l’uso nell’invenzione è disponibile in commercio da diversi fornitori, compresi ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, New Jersey, USA (numero di catalogo CYT-211) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA (proteina IL-15 ricombinante umana, numero di catalogo Gibco CTP0043). La sequenza amminoacidica di IL-4 ricombinante umana adatta per l’uso nell’invenzione viene fornita nella tabella 2 (SEQ ID NO: 5).

Il termine “IL-7” (indicato qui anche con “IL7”) si riferisce a una citochina glicosilata derivata da tessuti nota come interleuchina 7, che può essere ottenuta da cellule stromatiche ed epiteliali, così come dalle cellule dendritiche. Fry e Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904. IL-7 può stimolare lo sviluppo dei linfociti T. IL-7 si lega al recettore dell’IL-7, un eterodimero composto dal recettore alfa dell’IL-7 e dal recettore della catena gamma comune, che in una serie di segnali importanti per lo sviluppo dei linfociti T all’interno del timo e per la sopravvivenza all’interno della periferia. IL-7 ricombinante umana adatta per l’uso nell’invenzione è disponibile in commercio da diversi fornitori, compresi ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, New Jersey, USA (numero di catalogo CYT-254) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA (proteina IL-15 ricombinante umana, numero di catalogo Gibco PHC0071). La sequenza amminoacidica di IL-7 ricombinante umana adatta per l’uso nell’invenzione viene fornita nella tabella 2 (SEQ ID NO: 6).

Il termine “IL-15” (indicato qui anche con “IL15”) si riferisce al fattore di crescita dei linfociti T noto come interleuchina 15, e comprende tutte le

forme di IL-2 comprendenti forme umane e di mammifero, loro sostituzioni amminoacidiche conservative, glicofornie, bioanaloghi, e varianti. IL-15 viene descritta, per esempio, in Fehniger e Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32. IL-15 condivide le subunità recettoriali  $\beta$  e  $\gamma$  della trasduzione del segnale con IL-2. IL-15 ricombinante umana è una singola catena polipeptidica non glicosilata contenente 114 amminoacidi (e una metionina amminoterminale) con una massa molecolare di 12,8 kDa. IL-15 ricombinante umana è disponibile in commercio da diversi fornitori, compresi ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, New Jersey, USA (numero di catalogo CYT-230-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA (proteina IL-15 ricombinante umana, numero di catalogo 34-8159-82). La sequenza amminoacidica di IL-15 ricombinante umana adatta per l'uso nell'invenzione viene fornita nella tabella 2 (SEQ ID NO: 7).

Il termine "IL-21" (indicato qui anche con "IL-21") si riferisce alla proteina citochina pleiotropica nota come interleuchina 21, e comprende tutte le forme di IL-21 comprendenti forme umane e di mammifero, loro sostituzioni amminoacidiche conservative, glicofornie, bioanaloghi, e varianti. IL-21 viene descritta, per esempio, in Spolski e Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014,13, 379-95. IL-21 è principalmente prodotta dai linfociti T natural killer e dai linfociti T CD4+ umani attivati. IL-21 ricombinante umana è una singola catena polipeptidica non glicosilata contenente 132 amminoacidi con una massa molecolare di 15,4 kDa. IL-21 ricombinante umana è disponibile in commercio da diversi fornitori, compresi ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, New Jersey, USA (numero di catalogo CYT-408-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA (proteina IL-21 ricombinante umana, numero di catalogo 14-8219-80). La sequenza amminoacidica di IL-21 ricombinante umana adatta per l'uso nell'invenzione viene fornita nella tabella 2 (SEQ ID NO: 8).

Quando "una quantità antitumorale efficace", "una quantità inibente il tumore efficace", o "una quantità terapeutica" è indicata, la quantità precisa delle composizioni della presente invenzione da somministrare può essere determinata da un medico con considerazione delle differenze individuali nell'età, nel peso, nella dimensione del tumore, nel grado di infezione o metastasi, e nella condizione del paziente (soggetto). Può essere generalmente specificato che una composizione farmaceutica comprendente i linfociti infiltranti il tumore (per esempio TIL secondari o linfociti citotossici geneticamente modificati) descritti qui può essere somministrata ad un dosaggio da  $10^4$  a  $10^{11}$  cellule/kg di peso corporeo (per esempio da  $10^5$  a  $10^6$ , da  $10^5$  a  $10^{10}$ , da  $10^5$  a  $10^{11}$ , da  $10^6$  a  $10^{10}$ , da  $10^6$  a  $10^{11}$ , da  $10^7$  a  $10^{11}$ , da  $10^7$  a  $10^{10}$ , da  $10^8$  a  $10^{11}$ , da  $10^8$  a  $10^{10}$ , da  $10^9$  a  $10^{11}$ , o da  $10^9$  a  $10^{10}$  cellule/kg di peso corporeo), compresi tutti i valori di numeri interi all'interno di quegli intervalli. Le composizioni di linfociti infiltranti il tumore (compresi, in alcuni casi, i linfociti citotossici geneticamente modificati) possono anche essere somministrate molteplici volte a questi dosaggi. I linfociti infiltranti il tumore (compresi in alcuni casi, geneticamente) possono essere somministrati utilizzando tecniche per infusione che sono comunemente note in immunoterapia (si veda, per esempio, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Il dosaggio e il regime di

trattamento ottimali per un particolare paziente possono essere facilmente determinati da un esperto nell'arte della medicina monitorando i segni di malattia del paziente e regolando il trattamento di conseguenza.

Il termine “tumore ematologico maligno” si riferisce a tumori di mammifero e tumori dei tessuti ematopoietici e linfoidi, compresi, ma senza limitazione, tessuti del sangue, del midollo osseo, dei linfonodi, e del sistema linfatico. I tumori ematologici maligni sono indicati anche come “tumori liquidi”. I tumori ematologici maligni includono, ma senza limitazione, leucemia linfoblastica acuta (ALL), linfoma linfocitico cronico (CLL), linfoma linfocitico a piccole cellule (SLL), leucemia mieloide acuta (AML), leucemia mieloide cronica (CML), leucemia monocitica acuta (AMoL), linfoma di Hodgkin, e linfomi non Hodgkin. Il termine “tumore ematologico maligno dei linfociti B” si riferisce a tumori ematologici maligni che influenzano i linfociti B.

Il termine “tumore solido” si riferisce a una massa anormale di tessuto che solitamente non contiene cisti o aree liquide. I tumori solidi possono essere benigni o maligni. Il termine “cancro a tumore solido” si riferisce a tumori solidi maligni, neoplastici, o cancerosi. I cancri a tumore solido includono, ma senza limitazione, sarcomi, carcinomi, e linfomi, quali tumori del polmone, della mammella, della prostata, del colon, del retto, e della vescica. La struttura del tessuto dei tumori solidi comprende compartimenti tissutali interdipendenti comprendenti il parenchima (cellule cancerose) e le cellule stromali di sostegno in cui le cellule cancerose sono disperse e che possono fornire un microambiente di sostegno.

Il termine “tumore liquido” si riferisce a una massa anormale di cellule che è fluida in natura. I cancri a tumore liquido includono, ma senza limitazione, leucemie, mielomi, e linfomi, così come altri tumori ematologici maligni. I TIL ottenuti da tumori liquidi possono anche essere indicati qui come linfociti infiltranti il midollo (MIL).

Il termine “microambiente”, come utilizzato qui, può riferirsi al microambiente di un tumore solido o ematologico nella sua totalità o a un singolo sottoinsieme di cellule all'interno del microambiente. Il microambiente tumorale, come utilizzato qui, si riferisce a una miscela complessa di “cellule, fattori solubili, molecole segnale, matrici extracellulari, e segnali meccanici che promuovono la trasformazione neoplastica, supportano la crescita e l'invasione tumorali, proteggono il tumore dall'immunità dell'ospite, favoriscono la resistenza terapeutica, e forniscono nicchie perché le metastasi dominanti si sviluppino”, come descritto in Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473. Sebbene i tumori esprimano antigeni che dovrebbero essere riconosciuti dai linfociti T, l'eliminazione del tumore da parte del sistema immunitario è rara a causa della soppressione immunitaria da parte del microambiente.

In una forma di realizzazione, l'invenzione comprende un metodo per il trattamento del cancro con una popolazione di TIL, in cui un paziente viene preventivamente trattato con una chemioterapia non mieloablativa prima di un'infusione dei TIL secondo l'invenzione. In alcune forme di

realizzazione, può essere fornita una popolazione di TIL in cui un paziente viene preventivamente trattato con una chemioterapia non mieloablativa prima di un'infusione dei TIL secondo la presente invenzione. In una forma di realizzazione, la chemioterapia non mieloablativa è ciclofosfamide 60 mg/kg/giorno per 2 giorni (giorni 27 e 26 prima dell'infusione dei TIL) e fludarabina 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per 5 giorni (giorni da 27 a 23 prima dell'infusione dei TIL). In una forma di realizzazione, dopo la chemioterapia non mieloablativa e l'infusione dei TIL (al giorno 0) secondo l'invenzione, il paziente riceve un'infusione endovenosa di IL-2 per via endovenosa a 720.000 UI/kg ogni 8 ore fino alla tolleranza fisiologica.

Scoperte sperimentali indicano che la linfodeplezione prima del trasferimento adottivo di linfociti T specifici per il tumore svolge un ruolo chiave nell'aumentare l'efficacia del trattamento eliminando i linfociti T regolatori e gli elementi competitivi del sistema immunitario ("riserve di citochine"). Conseguentemente, alcune forme di realizzazione dell'invenzione utilizzano un passaggio di linfodeplezione (qualche volta indicato anche con "condizionamento immunosoppressivo") sul paziente prima dell'introduzione degli rTIL dell'invenzione.

I termini "cosomministrazione", "cosomministrando", "sommministrato in combinazione con", "sommministrando in combinazione con", "simultaneo", e "concomitante", come utilizzato qui, comprendono la somministrazione di due o più principi farmaceutici attivi (in una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, per esempio, almeno un agonista dei canali del potassio in combinazione con una pluralità di TIL) a un soggetto così che entrambi i principi farmaceutici attivi e/o loro metaboliti siano presenti nel soggetto allo stesso tempo. La cosomministrazione include la somministrazione simultanea in composizioni separate, la somministrazione a tempi differenti in composizioni separate, o la somministrazione in una composizione in cui due o più principi farmaceutici attivi sono presenti. La somministrazione simultanea in composizioni separate e la somministrazione in una composizione in cui entrambi gli agenti sono presenti sono preferite.

L'espressione "quantità efficace" o "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce a quella quantità di un composto o di una combinazione di composti come descritto qui che è sufficiente ad effettuare l'applicazione desiderata comprendente, ma senza limitazione, il trattamento della malattia. Una quantità terapeuticamente efficace può variare in relazione all'applicazione desiderata (*in vitro* o *in vivo*), o al soggetto e alla condizione patologica che viene trattato/a (per esempio il peso, l'età e il sesso del soggetto), alla gravità delle condizioni patologiche, o alla modalità di somministrazione. Il termine si applica anche a una dose che indurrà una risposta particolare in cellule bersaglio (per esempio la riduzione dell'adesione piastrinica e/o della migrazione cellulare). La dose specifica varierà in relazione ai composti particolari scelti, al regime di dosaggio da seguire, al fatto che il composto venga somministrato o meno in combinazione con altri composti, alla tempistica di somministrazione, al tessuto a cui viene somministrato, e al sistema fisico di rilascio in cui il composto è trasportato.

I termini "trattamento", "trattando", "trattare" e simili, si riferiscono all'ottenimento di un effetto farmacologico e/o fisiologico desiderato. L'effetto

può essere profilattico in termini di prevenire completamente o parzialmente una malattia o un suo sintomo e/o può essere terapeutico in termini di una cura parziale o completa per una malattia e/o per un effetto avverso attribuibile alla malattia. “Trattamento”, come utilizzato qui, copre qualsiasi trattamento di una malattia in un mammifero, in particolare in un uomo, e include: (a) l’impedire alla malattia di presentarsi in un soggetto che può essere predisposto alla malattia ma a cui non è ancora stata diagnosticata; (b) l’inibire la malattia, cioè l’arrestare il suo sviluppo o la sua progressione; e (c) l’alleviare la malattia, cioè, l’indurre la regressione della malattia e/o l’attenuare uno o più sintomi della malattia. “Trattamento” è anche inteso comprendere il rilascio di un agente allo scopo di fornire un effetto farmacologico, perfino in assenza di una malattia o di una condizione. Per esempio, “trattamento” comprende il rilascio di una composizione che può provocare una risposta immunitaria o conferire immunità in assenza di una condizione patologica, per esempio, nel caso di un vaccino.

Il termine “eterologo” quando utilizzato con riferimento a porzioni di un acido nucleico o di una proteina indica che l’acido nucleico o la proteina comprende due o più sottosequenze che non si trovano nella stessa relazione l’una con l’altra in natura. Per esempio, l’acido nucleico viene tipicamente prodotto per via ricombinante, avendo due o più sequenze da geni non correlati disposte per fare un nuovo acido nucleico funzionale, per esempio, un promotore da una fonte e una regione codificante da un’altra fonte, o regioni codificanti da fonti differenti. In modo simile, una proteina eterologa indica che la proteina comprende due o più sottosequenze che non si trovano nella stessa relazione l’una con l’altra in natura (per esempio una proteina di fusione).

I termini “identità di sequenza”, “percentuale di identità”, e “percentuale di identità di sequenza” (o loro sinonimi, per esempio, “identica al 99%”) nel contesto di due o più acidi nucleici o polipeptidi, si riferiscono a due o più sequenze o sottosequenze che sono le stesse oppure hanno una percentuale specificata di nucleotidi o di residui amminoacidici che sono gli stessi, quando confrontate ed allineate (introducendo interruzioni, se necessario) per la corrispondenza massima, non considerando alcuna sostituzione amminoacidica conservativa come parte dell’identità di sequenza. La percentuale di identità può essere misurata utilizzando un programma per il confronto di sequenze o algoritmi o mediante ispezione visiva. Sono noti nell’arte vari algoritmi e programmi che possono essere utilizzati per ottenere allineamenti di sequenze amminoacidiche o nucleotidiche. I programmi adatti per determinare la percentuale di identità di sequenza includono per esempio il pacchetto di programmi BLAST disponibile dal sito web BLAST del National Center for Biotechnology Information del governo statunitense. I confronti tra due sequenze possono essere realizzati utilizzando l’algoritmo BLASTN o BLASTP. BLASTN viene utilizzato per confrontare sequenze nucleotidiche, mentre BLASTP viene utilizzato per confrontare sequenze amminoacidiche. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, San Francisco sud, California) o MegAlign, disponibile da DNASTAR, sono ulteriori programmi software disponibili al pubblico che possono essere utilizzati per allineare sequenze. Un esperto nell’arte può determinare

parametri appropriati per l'allineamento massimale mediante un particolare programma di allineamento. In alcune forme di realizzazione, vengono utilizzati i parametri preimpostati del programma di allineamento.

Come utilizzato qui, il termine "variante" comprende, ma non è limitato a, anticorpi o proteine di fusione che comprendono una sequenza amminoacidica che si differenzia dalla sequenza amminoacidica di un anticorpo di riferimento per mezzo di una o più sostituzioni, delezioni e/o addizioni a certe posizioni all'interno di o adiacenti alla sequenza amminoacidica dell'anticorpo di riferimento. La variante può comprendere una o più sostituzioni conservative nella sua sequenza amminoacidica in confronto alla sequenza amminoacidica di un anticorpo di riferimento. Le sostituzioni conservative possono implicare, per esempio, la sostituzione di amminoacidi carichi o non carichi in modo simile. La variante mantiene la capacità di legarsi specificamente all'antigene dell'anticorpo di riferimento. Il termine variante comprende anche anticorpi o proteine PEGilati/e.

Con "linfociti infiltranti il tumore" o "TIL" qui si intende una popolazione di cellule originariamente ottenuta come globuli bianchi che hanno lasciato il circolo sanguigno di un soggetto e sono migrati in un tumore. I TIL includono, ma senza limitazione, linfociti T CD8+ citotossici (linfociti), linfociti T CD4+ Th1 e Th17, le cellule natural killer, le cellule dendritiche ed i macrofagi M1. I TIL includono TIL sia primari che secondari. I "TIL primari" sono quelli che vengono ottenuti da campioni di tessuto da pazienti come descritto qui (qualche volta indicati come "raccolti di fresco"), e i "TIL secondari" sono qualsiasi popolazione cellulare di TIL che è stata espansa o ha proliferato come discusso qui, compresi, ma senza limitazione TIL non purificati, TIL espansi ("TIL REP") così come "TIL re-REP" come discusso qui. I TIL re-REP possono includere per esempio i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP).

I TIL possono essere generalmente definiti biochimicamente, utilizzando marcatori della superficie cellulare, o funzionalmente, mediante la loro capacità di infiltrare tumori ed effettuare il trattamento. I TIL possono essere in generale classificati mediante l'espressione di uno o più dei seguenti biomarcatori: CD4, CD8, TCR  $\alpha\beta$ , CD27, CD28, CD56, CCR-7, CD45Ra, CD95, PD-1, e CD25. Inoltre, e in alternativa, i TIL possono essere funzionalmente definiti dalla loro capacità di infiltrare tumori solidi a seguito della reintroduzione in un paziente. I TIL possono inoltre essere caratterizzati mediante la potenza - per esempio, i TIL possono essere considerati potenti se, per esempio, il rilascio di interferone (IFN) è superiore a circa 50 pg/ml, superiore a circa 100 pg/ml, superiore a circa 150 pg/ml, o superiore a circa 200 pg/ml.

I termini "veicolante farmaceuticamente accettabile" o "eccipiente farmaceuticamente accettabile" sono intesi includere qualsiasi e tutti i solventi, i mezzi di dispersione, i rivestimenti, gli agenti antibatterici ed antifungini, gli agenti isotonici e ritardanti l'assorbimento, e i componenti inerti. L'uso di tali veicolanti farmaceuticamente accettabili o eccipienti farmaceuticamente accettabili per principi farmaceutici attivi è ben noto nell'arte.

Eccetto nel caso in cui qualsiasi veicolante farmaceuticamente accettabile o eccipiente farmaceuticamente accettabile convenzionali sia incompatibile con il principio farmaceutico attivo, il suo uso nelle composizioni terapeutiche dell'invenzione è contemplato. Ulteriori componenti farmaceutici attivi, quali altri farmaci.

I termini "circa" e "approssimativamente" significano all'interno di un intervallo statisticamente significativo di un valore. Un tale intervallo può essere all'interno di un ordine di grandezza, preferibilmente all'interno del 50%, più preferibilmente all'interno del 20%, ancora più preferibilmente all'interno del 10%, e ancora più preferibilmente all'interno del 5% di un dato valore o intervallo. La variazione permessa compresa dai termini "circa" o "approssimativamente" dipende dal sistema particolare sotto studio, e può essere facilmente apprezzato da parte di una persona esperta nell'arte. Inoltre, come utilizzati qui, i termini "circa" e "approssimativamente" significano che dimensioni, proporzioni, formulazioni, parametri, forme e altre quantità e caratteristiche non sono e non è necessario che siano esatte, ma possono essere approssimate e/o più grandi o più piccole, come desiderato, riflettendo tolleranze, arrotondamento, errore di misurazione e simili, e altri fattori noti a coloro che sono esperti nell'arte. In generale, una dimensione, proporzione, formulazione, parametro, forma o altra quantità o caratteristica è "circa" o "approssimata" se specificato espressamente essere tale oppure no. Si noti che forme di realizzazione di dimensioni, forme e proporzioni molto differenti possono impiegare gli arrangiamenti descritti.

I termini di transizione "comprendente", "costituito essenzialmente da", e "composto da", quando utilizzati nelle rivendicazioni allegate, in forma originale e modificata, definiscono l'ambito delle rivendicazioni in relazione a quali ulteriori elementi o passaggi delle rivendicazioni non elencati, semmai presenti, sono esclusi dall'ambito della/e rivendicazione/i. Il termine "comprendente" è inteso essere inclusivo o senza limiti e non esclude qualsiasi ulteriore elemento, metodo, passaggio o materiale non elencato. Il termine "composto da" esclude qualsiasi elemento, passaggio o materiale diverso da quelli specificati nella rivendicazione e, nel secondo esempio, impurezze ordinariamente associate al/ai materiale/i specificato/i. L'espressione "costituito essenzialmente da" limita l'ambito di una rivendicazione agli elementi, ai passaggi o al/ai materiale/i specificati e a quelli che non influenzano materialmente la/le caratteristica/che basilare/i e nuova/e dell'invenzione rivendicata. Tutte/i le composizioni, i metodi, e i kit descritte/i qui che realizzano la presente invenzione possono, in forme di realizzazione alternative, essere definiti più specificamente da qualsiasi dei termini di transizione "comprendente", "costituito essenzialmente da", e "composto da".

### **III. Procedimenti di produzione dei TIL**

Un procedimento per i TIL esemplificativo noto come procedimento 2A contenente alcune di queste caratteristiche viene descritto nella figura 1, e alcuni dei vantaggi di questa forma di realizzazione della presente invenzione rispetto al procedimento 1C vengono descritti nella figura 2, così

come nella figura 84. Il procedimento 1C viene mostrato per confronto nella figura 3. Due linee temporali alternative per la terapia con TIL basata sul procedimento 2A vengono mostrate nella figura 4 (conte cellulari più elevate) e nella figura 5 (conte cellulari inferiori). Una forma di realizzazione del procedimento 2A viene mostrata nella figura 6 così come nella figura 27. Le figure 83 e 84 forniscono inoltre un esemplificativo procedimento 2A in confronto ad un esemplificativo procedimento 1C.

Come discussa qui, la presente invenzione può includere un passaggio concernente la ristimolazione di TIL crioconservati per incrementare la loro attività metabolica e così la loro salute relativa prima del trapianto in un paziente, e metodi per testare la suddetta salute metabolica. Come in generale delineato qui, i TIL vengono in generale presi dal campione di un paziente e manipolati per espandere il loro numero prima del trapianto in un paziente. In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere facoltativamente manipolati geneticamente come discusso sotto.

In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere crioconservati. Una volta scongelati, essi possono anche essere stimolati di nuovo per incrementare il loro metabolismo prima dell'infusione in un paziente.

In alcune forme di realizzazione, la prima espansione (compresi i procedimenti indicati come pre-REP così come i procedimenti mostrati nella figura 27 come passaggio A) è accorciata in da 3 a 14 giorni e la seconda espansione (comprendente i procedimenti indicati come REP così come i procedimenti mostrati nella figura 27 come passaggio B) è accorciata in da 7 a 14 giorni, come discusso in dettaglio sotto così come negli esempi e nelle figure. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione (per esempio un'espansione descritta come passaggio B nella figura 27) è accorciata a 11 giorni e la seconda espansione (per esempio, un'espansione come descritta nel passaggio D nella figura 27) è accorciata a 11 giorni, come discusso negli esempi e mostrato nelle figure 4, 5 e 27. In alcune forme di realizzazione, la combinazione della prima espansione e della seconda espansione (per esempio espansioni descritte come passaggio B e passaggio D nella figura 27) è accorciata a 22 giorni, come discusso in dettaglio sotto e negli esempi e nelle figure

Le indicazioni dei "passaggi" A, B, C, ecc., sotto sono in riferimento alla figura 27 e in riferimento ad alcune forme di realizzazione descritte qui.

La disposizione dei passaggi sotto e nella figura 27 è esemplificativa e qualsiasi combinazione o ordine dei passaggi, così come ulteriori passaggi, la ripetizione di passaggi, e/o l'omissione di passaggi è contemplata/o dalla presente domanda e dai metodi descritti qui.

#### **A. PASSAGGIO A: Ottenimento di un campione di tumore da un paziente**

In generale, i TIL sono inizialmente ottenuti da un campione di tumore da un paziente ("TIL primari") e quindi espansi in una popolazione più grande per un'ulteriore manipolazione come descritto qui, facoltativamente crioconservati, stimolati di nuovo come descritto qui e facoltativamente valutati per il fenotipo e parametri metabolici come indicazione della salute dei TIL.

Un campione di tumore da un paziente può essere ottenuto utilizzando metodi noti nell'arte, in via generale resezione chirurgica, biopsia con ago o altri mezzi per ottenere un campione che contiene una miscela di tumore e cellule TIL. In generale, il campione di tumore può essere da qualsiasi tumore solido, compresi tumori primari, tumori invasivi o tumori metastatici. Il campione di tumore può anche essere un tumore liquido, quale un tumore ottenuto da un tumore ematologico maligno. Il tumore solido può essere di qualsiasi tipo di cancro, compresi, ma senza limitazione, della mammella, pancreatico, della prostata, coloretale, del polmone, del cervello, renale, dello stomaco, e della pelle (compresi, ma senza limitazione, carcinoma a cellule squamose, carcinoma basocellulare, e melanoma). In alcune forme di realizzazione, TIL utili vengono ottenuti da tumori melanomi maligni, dal momento che questi sono stati riportati avere livelli particolarmente elevati di TIL.

Il termine "tumore solido" si riferisce a una massa anormale di tessuto che solitamente non contiene cisti o aree liquide. I tumori solidi possono essere benigni o maligni. Il termine "cancro a tumore solido" si riferisce a tumori solidi maligni, neoplastici, o cancerosi. I cancri a tumore solido includono, ma senza limitazione, sarcomi, carcinomi, e linfomi, quali tumori del polmone, della mammella, cancro della mammella triplo negativo, della prostata, del colon, del retto, e della vescica. In alcune forme di realizzazione, il cancro viene scelto tra carcinoma del collo dell'utero, cancro della testa e del collo (compreso, per esempio, il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC)), glioblastoma, cancro ovarico, sarcoma, cancro del pancreas, cancro della vescica, cancro della mammella, cancro della mammella triplo negativo, e carcinoma polmonare non a piccole cellule. La struttura del tessuto dei tumori solidi comprende compartimenti tissutali interdipendenti comprendenti il parenchima (cellule cancerose) e le cellule stromali di sostegno in cui le cellule cancerose sono disperse e che possono fornire un microambiente di sostegno.

Il termine "tumore ematologico maligno" si riferisce a tumori di mammifero e tumori dei tessuti ematopoietici e linfoidei, compresi, ma senza limitazione, tessuti del sangue, del midollo osseo, dei linfonodi, e del sistema linfatico. I tumori ematologici maligni sono indicati anche come "tumori liquidi". I tumori ematologici maligni includono, ma senza limitazione, leucemia linfoblastica acuta (ALL), linfoma linfocitico cronico (CLL), linfoma linfocitico a piccole cellule (SLL), leucemia mieloide acuta (AML), leucemia mieloide cronica (CML), leucemia monocitica acuta (AMoL), linfoma di Hodgkin, e linfomi non Hodgkin. Il termine "tumore ematologico maligno dei linfociti B" si riferisce a tumori ematologici maligni che influenzano i linfociti B.

Una volta ottenuto, il campione di tumore viene in generale frammentato utilizzando la dissezione con bisturi in piccoli pezzi tra 1 e circa 8 mm<sup>3</sup>, con quelli da circa da 2 a 3 mm<sup>3</sup> che sono particolarmente utili. I TIL vengono sottoposti a coltura da questi frammenti utilizzando digeriti tumorali enzimatici. Tale digerito tumorale può essere prodotto mediante incubazione in mezzi enzimatici (per esempio tampone 1640 da Roswell Park Memorial Institute (RPMI), glutammato 2mM, gentamicina 10 µg/ml, 30 unità/ml di DNasi e 1,0 mg/ml di collagenasi) cui segue la dissociazione

meccanica (per esempio utilizzando un dissociatore di tessuto). Il digerito tumorale può essere prodotto ponendo il tumore in mezzi enzimatici e dissociando meccanicamente il tumore per approssimativamente 1 minuto, cui segue un'incubazione per 30 minuti a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5%, cui seguono cicli ripetuti di dissociazione meccanica ed incubazione nelle condizioni precedenti fino a che non sono presenti solo piccoli pezzi di tessuto. Alla fine di questo procedimento, se la sospensione cellulare contiene un numero elevato di globuli rossi o cellule morte, una separazione per gradiente di densità utilizzando il polisaccaride idrofilico ramificato FICOLL può essere eseguita per rimuovere queste cellule. Possono essere utilizzati metodi alternativi noti nell'arte, quali quelli descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto US 2012/0244133 A1. Qualsiasi dei metodi precedenti può essere utilizzato in qualsiasi delle forme di realizzazione descritte qui per metodi di espansione dei TIL o metodi di trattamento di un cancro.

In generale, la sospensione cellulare raccolta viene chiamata "popolazione cellulare primaria" o popolazione cellulare "raccolta di fresco".

In alcune forme di realizzazione, la frammentazione comprende la frammentazione fisica, comprese per esempio, la dissezione così come la digestione. In alcune forme di realizzazione, la frammentazione è frammentazione fisica. In alcune forme di realizzazione, la frammentazione è dissezione. In alcune forme di realizzazione, la frammentazione è mediante digestione. In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere inizialmente sottoposti a coltura da digeriti tumorali enzimatici e frammenti tumorali ottenuti da pazienti. In una forma di realizzazione, i TIL possono essere inizialmente sottoposti a coltura da digeriti tumorali enzimatici e frammenti tumorali ottenuti da pazienti.

In alcune forme di realizzazione, dove il tumore è un tumore solido, il tumore subisce frammentazione fisica dopo che il campione di tumore viene ottenuto, per esempio, nel passaggio A (come fornito nella figura 27). In alcune forme di realizzazione, la frammentazione avviene prima della crioconservazione. In alcune forme di realizzazione, la frammentazione avviene dopo la crioconservazione. In alcune forme di realizzazione, la frammentazione avviene dopo aver ottenuto il tumore e in assenza di qualsiasi crioconservazione. In alcune forme di realizzazione, il tumore viene frammentato e 10, 20, 30, 40 o più frammenti o pezzi vengono posti in ciascun contenitore per la prima espansione. In alcune forme di realizzazione, il tumore viene frammentato e 30 o 40 frammenti o pezzi vengono posti in ciascun contenitore per la prima espansione. In alcune forme di realizzazione, il tumore viene frammentato e 40 frammenti o pezzi vengono posti in ciascun contenitore per la prima espansione. In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono da circa 4 a circa 50 frammenti, in cui ciascun frammento ha un volume di circa 27 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono da circa 30 a circa 60 frammenti con un volume totale da circa 1.300 mm<sup>3</sup> a circa 1.500 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono circa 50 frammenti con un volume totale di circa 1.350 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono circa 50 frammenti con una massa totale da circa 1 grammo a circa 1,5

grammi. In alcune forme di realizzazione, i frammenti multipli comprendono circa 4 frammenti.

In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono ottenuti da frammenti tumorali. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale viene ottenuto mediante dissezione con bisturi. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è circa tra 1 mm<sup>3</sup> e 10 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è circa tra 1 mm<sup>3</sup> e 8 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 1 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 2 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 3 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 4 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 5 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 6 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 7 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 8 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 9 mm<sup>3</sup>. In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è di circa 10 mm<sup>3</sup>.

In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono ottenuti da digeriti tumorali. In alcune forme di realizzazione, le digeriti tumorali sono state generate mediante incubazione in mezzi enzimatici, per esempio, ma non limitati a, RPMI 1640, GlutaMAX 2mM, gentamicina 10 mg/ml, DNasi 30 U/ml, e collagenasi 1,0 mg/ml, cui segue la dissociazione meccanica (GentleMACS, Miltenyi Biotech, Auburn, California). Dopo aver posto il tumore in mezzi enzimatici, il tumore può essere meccanicamente dissociato per approssimativamente 1 minuto. La soluzione può quindi essere incubata per 30 minuti a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5% ed esso viene quindi meccanicamente disgregato ancora per approssimativamente 1 minuto. Dopo essere stato incubato ancora per 30 minuti a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5%, il tumore può essere meccanicamente disgregato una terza volta per approssimativamente 1 minuto. In alcune forme di realizzazione, dopo la terza distruzione meccanica, se erano presenti grandi pezzi di tessuto, 1 o 2 ulteriori dissociazioni meccaniche sono state applicate al campione, con o senza 30 minuti ulteriori di incubazione a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5%. In alcune forme di realizzazione, alla fine dell'incubazione finale, se la sospensione cellulare conteneva un numero elevato di globuli rossi o cellule morte, può essere eseguita una separazione per gradiente di densità utilizzando Ficoll per rimuovere queste cellule.

In alcune forme di realizzazione, la sospensione cellulare raccolta prima del primo passaggio di espansione viene chiamata "popolazione cellulare primaria" o popolazione cellulare "raccolta di fresco".

In alcune forme di realizzazione, le cellule possono essere facoltativamente congelate dopo la raccolta dei campioni e conservate congelate prima dell'ingresso nell'espansione descritta nel passaggio B, che viene descritto in maggior dettaglio sotto, così come esemplificato nella figura 27.

## **B. PASSAGGIO B: Prima espansione**

### **1. TIL giovani**

In alcune forme di realizzazione, i presenti metodi contemplano l'ottenimento di TIL giovani, che sono capaci di aumentati cicli di replicazione dopo la somministrazione a un soggetto/paziente e pertanto possono fornire ulteriori vantaggi terapeutici rispetto a TIL più vecchi (cioè, TIL che hanno ulteriormente subito più cicli di replicazione prima della somministrazione a un soggetto/paziente). Le caratteristiche dei TIL giovani sono state descritte nella letteratura, per esempio Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157-167 (2012); Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., *J Immunother* 32:415-423 (2009); Robbins, et al., *J. Immunol.* 2004; 173:7125-7130; Shen et al., *J Immunother*, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53-62 (2005); e Tran, et al., *J Immunother*, 31:742-751 (2008).

I diversi recettori antigenici dei linfociti T e B vengono prodotti mediante ricombinazione somatica di un numero limitato ma elevato di segmenti genici. Questi segmenti genici: V (variabile), D (di diversità), J (di legame), e C (costante), determinano la specificità di legame e le applicazioni a valle di immunoglobuline e recettori dei linfociti T (TCR). La presente invenzione fornisce un metodo per generare TIL che mostrano e incrementano la diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando i metodi indicati come procedimento 1C, come esemplificato nella figura 83. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti nella prima espansione mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, l'aumento di diversità è un aumento nella diversità delle immunoglobuline e/o nella diversità dei recettori dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, la diversità nell'immunoglobulina è nella catena pesante dell'immunoglobulina. In alcune forme di realizzazione, la diversità nell'immunoglobulina è nella catena leggera dell'immunoglobulina. In alcune forme di realizzazione, la diversità è nel recettore dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, la diversità è in uno dei recettori dei linfociti T scelto nel gruppo composto dai recettori alfa, beta, gamma, e delta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) alfa e/o beta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) alfa. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) beta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione di TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ ).

Dopo la dissezione o la digestione di frammenti tumorali, per esempio come descritto nel passaggio A della figura 27, le cellule risultanti vengono

sottoposte a coltura nel siero contenente IL-2 in condizioni che favoriscono la crescita dei TIL rispetto al tumore e ad altre cellule. In alcune forme di realizzazione, le digeriti tumorali vengono incubate in pozzetti da 2 ml in mezzi comprendenti siero AB umano inattivato con 6.000 UI/ml di IL-2. Questa popolazione cellulare primaria viene messa in coltura per un periodo di giorni, in generale da 3 a 14 giorni, risultando in una popolazione di TIL non purificati, in generale circa  $1 \times 10^8$  cellule TIL non purificate. In alternativa, questa popolazione cellulare primaria viene messa in coltura per un periodo da 7 a 14 giorni, risultando in una popolazione di TIL non purificati, in generale circa  $1 \times 10^8$  cellule TIL non purificate. In alternativa, questa popolazione cellulare primaria viene messa in coltura in un periodo da 10 a 14 giorni, risultando in una popolazione di TIL non purificati, in generale circa  $1 \times 10^8$  cellule TIL non purificate. In alcune forme di realizzazione, questa popolazione cellulare primaria viene messa in coltura per un periodo di circa 11 giorni, risultando in una popolazione di TIL non purificati, in generale circa  $1 \times 10^8$  cellule TIL non purificate.

In una forma di realizzazione preferita, l'espansione dei TIL può essere eseguita utilizzando un passaggio iniziale di espansione dei TIL non purificati (per esempio quale quelli descritte nel passaggio B della figura 27, che possono includere procedimenti indicati come pre-REP) come descritto sotto e qui, cui segue una seconda espansione (passaggio D, compresi i procedimenti indicati come passaggi del protocollo di espansione rapida (REP)) come descritto sotto, alla voce del passaggio D, e qui, cui segue un'eventuale crioconservazione, e cui segue un secondo passaggio D (compresi i procedimenti indicati come passaggi REP di ristimolazione) come descritto sotto e qui. I TIL ottenuti da questo procedimento possono essere facoltativamente caratterizzati per caratteristiche fenotipiche e parametri metabolici come descritto qui.

In forme di realizzazione in cui le colture dei TIL sono iniziate in piastre da 24 pozzetti, per esempio, utilizzando piastre Costar da coltura cellulare da 24 pozzetti a fondo piatto (Corning Incorporated, Corning, New York), ciascun pozzetto può essere seminato con  $1 \times 10^6$  cellule di digerito tumorale oppure con un frammento tumorale in 2 ml di mezzo completo (CM) con IL-2 (6.000 UI/ml; Chiron Corp., Emeryville, California). In alcune forme di realizzazione, il frammento tumorale è circa tra  $1 \text{ mm}^3$  e  $10 \text{ mm}^3$ .

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione viene indicato come "CM", un'abbreviazione per terreni di coltura. In alcune forme di realizzazione, il CM per il passaggio B consiste di RPMI 1640 con GlutaMAX, arricchito con il siero AB umano al 10%, Hepes 25mM, e gentamicina 10 mg/ml. In forme di realizzazione in cui le colture vengono avviate in palloni permeabili ai gas con una capacità di 40 ml e una parte inferiore in silicio permeabile ai gas di  $10 \text{ cm}^2$  (per esempio G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Nuovo Brighton, Minnesota) (figura 1), ciascun pallone è stato caricato con  $10\text{-}40 \times 10^6$  cellule vitali di digerito tumorale o 5-30 frammenti tumorali in 10-40 ml di CM con IL-2. Entrambi il G-Rex10 e le piastre da 24 pozzetti sono stati incubati in un incubatore umidificato a  $37^\circ\text{C}$  in  $\text{CO}_2$  al 5% e, 5 giorni dopo l'inizio della coltura, metà del terreno è stato rimosso e sostituito con CM ed IL-2 freschi e, dopo al giorno 5, metà del terreno è stato sostituito ogni 2-3 giorni.

Dopo la preparazione dei frammenti tumorali, le cellule risultanti (cioè, i frammenti) vengono sottoposte a coltura nel siero contenente IL-2 in condizioni che favoriscono la crescita dei TIL rispetto al tumore e ad altre cellule. In alcune forme di realizzazione, le digeriti tumorali vengono incubate in pozzetti da 2 ml in mezzi comprendenti siero AB umano inattivato (o, in alcuni casi, come descritto qui, in presenza di una popolazione cellulare aAPC) con 6.000 UI/ml di IL-2. Questa popolazione cellulare primaria viene messa in coltura per un periodo di giorni, in generale da 10 a 14 giorni, risultando in una popolazione di TIL non purificati, in generale circa  $1 \times 10^8$  cellule TIL non purificate. In alcune forme di realizzazione, il terreno di crescita durante la prima espansione comprende IL-2 o una sua variante. In alcune forme di realizzazione, l'IL è IL-2 ricombinante umana (rhIL-2). In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 ha un'attività specifica di  $20-30 \times 10^6$  UI/mg per un flaconcino da 1 mg. In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 ha un'attività specifica di  $20 \times 10^6$  UI/mg per un flaconcino da 1 mg. In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 ha un'attività specifica di  $25 \times 10^6$  UI/mg per un flaconcino da 1 mg. In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 ha un'attività specifica di  $30 \times 10^6$  UI/mg per un flaconcino da 1 mg. In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 ha una concentrazione finale di  $4-8 \times 10^6$  UI/mg di IL-2. In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 ha una concentrazione finale di  $5-7 \times 10^6$  UI/mg di IL-2. In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 ha una concentrazione finale di  $6 \times 10^6$  UI/mg di IL-2. In alcune forme di realizzazione, la soluzione madre di IL-2 è preparata come descritto nell'esempio 4. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende circa 10.000 UI/ml di IL-2, circa 9.000 UI/ml di IL-2, circa 8.000 UI/ml di IL-2, circa 7.000 UI/ml di IL-2, circa 6.000 UI/ml di IL-2 o circa 5.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 9.000 UI/ml di IL-2 a circa 5.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 8.000 UI/ml di IL-2 a circa 6.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 7.000 UI/ml di IL-2 a circa 6.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende circa 6.000 UI/ml di IL-2. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende inoltre IL-2. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 3.000 UI/ml di IL-2. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende inoltre IL-2. In una forma di realizzazione preferita, il terreno di coltura cellulare comprende circa 3.000 UI/ml di IL-2. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 1.000 UI/ml, circa 1.500 UI/ml, circa 2.000 UI/ml, circa 2.500 UI/ml, circa 3.000 UI/ml, circa 3.500 UI/ml, circa 4.000 UI/ml, circa 4.500 UI/ml, circa 5.000 UI/ml, circa 5.500 UI/ml, circa 6.000 UI/ml, circa 6.500 UI/ml, circa 7.000 UI/ml, circa 7.500 UI/ml, o circa 8.000 UI/ml di IL-2. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende tra 1.000 e 2.000 UI/ml, tra 2.000 e 3.000 UI/ml, tra 3.000 e 4.000 UI/ml, tra 4.000 e 5.000 UI/ml, tra 5.000 e 6.000 UI/ml, tra 6.000 e 7.000 UI/ml, tra 7.000 e

8.000 UI/ml, o circa 8.000 UI/ml di IL-2.

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende circa 500 UI/ml di IL-15, circa 400 UI/ml di IL-15, circa 300 UI/ml di IL-15, circa 200 UI/ml di IL-15, circa 180 UI/ml di IL-15, circa 160 UI/ml di IL-15, circa 140 UI/ml di IL-15, circa 120 UI/ml di IL-15, o circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 500 UI/ml di IL-15 a circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 400 UI/ml di IL-15 a circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 300 UI/ml di IL-15 a circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende circa 200 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 180 UI/ml di IL-15. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende inoltre IL-15. In una forma di realizzazione preferita, il terreno di coltura cellulare comprende circa 180 UI/ml di IL-15.

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende circa 20 UI/ml di IL-21, circa 15 UI/ml di IL-21, circa 12 UI/ml di IL-21, circa 10 UI/ml di IL-21, circa 5 UI/ml di IL-21, circa 4 UI/ml di IL-21, circa 3 UI/ml di IL-21, circa 2 UI/ml di IL-21, circa 1 UI/ml di IL-21, o circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 20 UI/ml di IL-21 a circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 15 UI/ml di IL-21 a circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 12 UI/ml di IL-21 a circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 10 UI/ml di IL-21 a circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende da circa 5 UI/ml di IL-21 a circa 1 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione comprende circa 2 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 1 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 0,5 UI/ml di IL-21. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende inoltre IL-21. In una forma di realizzazione preferita, il terreno di coltura cellulare comprende circa 1 UI/ml di IL-21.

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della prima espansione viene indicato come "CM", un'abbreviazione per terreni di coltura. In alcune forme di realizzazione, viene indicato come CM1 (terreno di coltura 1). In alcune forme di realizzazione, il CM consiste di RPMI 1640 con GlutaMAX, arricchito con il siero AB umano al 10%, Hepes 25mM, e gentamicina 10 mg/ml. In forme di realizzazione in cui le colture vengono avviate in palloni permeabili ai gas con una capacità di 40 ml e una parte inferiore in silicio permeabile ai gas di 10 cm<sup>2</sup> (per esempio G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Nuovo Brighton, Minnesota) (figura 1), ciascun pallone è stato caricato con 10-40 × 10<sup>6</sup> cellule vitali di digerito

tumorale o con 5-30 frammenti tumorali in 10-40 ml di CM con IL-2. Entrambi il G-Rex10 e le piastre da 24 pozzetti sono stati incubati in un incubatore umidificato a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5% e, 5 giorni dopo l'inizio della coltura, metà del terreno è stato rimosso e sostituito con CM ed IL-2 freschi e, dopo al giorno 5, metà del terreno è stato sostituito ogni 2-3 giorni. In alcune forme di realizzazione, il CM è il di CM1 descritto negli esempi, si veda l'esempio 5. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione avviene in un terreno di coltura cellulare iniziale o un primo terreno di coltura cellulare. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare iniziale o il primo terreno di coltura cellulare comprende IL-2.

Il procedimento della prima espansione (compresi i procedimenti come, per esempio, quelli descritti nel passaggio B della figura 27, che possono includere quelli qualche volta indicati come pre-REP) può essere accorciato a 3-14 giorni, come discusso negli esempi e nelle figure. La prima espansione (compresi i procedimenti come, per esempio, quelli descritti nel passaggio B della figura 27, che possono includere quelli qualche volta indicati come pre-REP) può essere accorciata in da 7 a 14 giorni, come discusso negli esempi e mostrato nelle figure 4 e 5, così come compresa, per esempio, un'espansione come descritta nel passaggio B della figura 27. La prima espansione del passaggio B può essere accorciata a 10-14 giorni, come discusso negli esempi e mostrato nelle figure 4 e 5. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione è accorciata a 11 giorni, come discusso negli esempi e mostrato nelle figure 4 e 5, così come compresa, per esempio, un'espansione come descritta nel passaggio B della figura 27. La prima espansione dei TIL può procedere per 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, 7 giorni, 8 giorni, 9 giorni, 10 giorni, 11 giorni, 12 giorni, 13 giorni, o 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 1 giorno a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 2 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 3 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 4 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 5 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 6 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 7 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 8 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 9 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 10 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 11 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 12 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 13 giorni a 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 14 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 1 giorno a 11 giorni. La prima espansione dei TIL può procedere per da 2 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 3 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 4 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 5 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 6 giorni a 11 giorni.

In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 7 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 8 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 9 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 10 giorni a 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per 11 giorni.

In alcune forme di realizzazione, una combinazione di IL-2, IL-7, IL-15, e/o IL-21 viene impiegata come combinazione durante la prima espansione. In alcune forme di realizzazione, IL-2, IL-7, IL-15, e/o IL-21 così come qualsiasi loro combinazione possono essere incluse durante la prima espansione, compreso per esempio durante i procedimenti del passaggio B secondo la figura 27, così come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, una combinazione di IL-2, IL-15, ed IL-21 viene impiegate come combinazione durante la prima espansione. In alcune forme di realizzazione, IL-2, IL-15, ed IL-21 così come qualsiasi loro combinazione possono essere incluse durante i procedimenti del passaggio B secondo la figura 27 e come descritto qui.

Il procedimento della prima espansione (compresi i procedimenti indicati come pre-REP; per esempio, i passaggio B secondo la figura 27) può essere accorciato in da 3 a 14 giorni, come discusso negli esempi e nelle figure. La prima espansione del passaggio B può essere accorciata in da 7 a 14 giorni, come discusso negli esempi e mostrato nelle figure 4 e 5. La prima espansione del passaggio B può essere accorciata in da 10 a 14 giorni, come discusso negli esempi e mostrato nelle figure 4, 5, e 27. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione è accorciata a 11 giorni, come discusso negli esempi e mostrato nelle figure 4, 5, e 27.

In alcune forme di realizzazione, la prima espansione, per esempio, i passaggio B secondo la figura 27, viene eseguita/o in un bioreattore a sistema chiuso. In alcune forme di realizzazione, per l'espansione dei TIL viene impiegato un sistema chiuso, come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, viene impiegato un bioreattore singolo. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore singolo impiegato è per esempio un G-REX-10 o un G-REX-100. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore a sistema chiuso è un bioreattore singolo.

### **C. PASSAGGIO C: Transizione dalla prima espansione alla seconda espansione**

In alcuni casi, la popolazione di TIL non purificati ottenuti dalla prima espansione, compresa per esempio la popolazione dei TIL ottenuti da, per esempio, i passaggio B come indicato nella figura 27, può essere crioconservata immediatamente, utilizzando i protocolli discussi qui sotto. In alternativa, la popolazione dei TIL ottenuti dalla prima espansione, indicata come seconda popolazione dei TIL, può essere sottoposta a una seconda espansione (che può includere espansioni qualche volta indicate come REP) e quindi crioconservata come discusso sotto. In modo simile, nel caso in cui saranno utilizzati TIL geneticamente modificati nella terapia, la prima popolazione dei TIL (qualche volta indicata come popolazione

di TIL non purificati) o la seconda popolazione dei TIL (che può in alcune forme di realizzazione includere popolazioni indicate come popolazioni di TIL REP) possono essere sottoposte a modifiche genetiche per trattamenti adatti prima dell'espansione o dopo la prima espansione e prima della seconda espansione.

In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti dalla prima espansione (per esempio dal passaggio B come indicato nella figura 27) sono conservati fino a che non vengono fenotipizzati per la selezione. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti dalla prima espansione (per esempio dal passaggio B come indicato nella figura 27) non sono conservati e procedono direttamente alla seconda espansione. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti dalla prima espansione non sono crioconservati dopo la prima espansione e prima della seconda espansione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene a circa 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, 7 giorni, 8 giorni, 9 giorni, 10 giorni, 11 giorni, 12 giorni, 13 giorni, o 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene circa da 3 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene circa da 4 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene circa da 4 giorni a 10 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene circa da 7 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene a circa 14 giorni da quando avviene la frammentazione.

In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene a 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, 7 giorni, 8 giorni, 9 giorni, 10 giorni, 11 giorni, 12 giorni, 13 giorni, o 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 1 giorno a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la prima espansione dei TIL può procedere per da 2 giorni a 14 giorni. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 3 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 4 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 5 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 6 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 7 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima

espansione alla seconda espansione avviene da 8 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 9 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 10 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 11 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 12 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 13 giorni a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene a 14 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 1 giorno a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 2 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 3 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 4 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 5 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 6 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 7 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 8 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 9 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene da 10 giorni a 11 giorni da quando avviene la frammentazione. In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione avviene a 11 giorni da quando avviene la frammentazione.

In alcune forme di realizzazione, i TIL non vengono conservati dopo la prima espansione e prima della seconda espansione, e i TIL procedono direttamente alla seconda espansione (per esempio in alcune forme di realizzazione, non vi è alcun immagazzinamento durante la transizione dal passaggio B al passaggio D come mostrato nella figura 27). In alcune forme di realizzazione, la transizione avviene in sistema chiuso, come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, i TIL dalla prima espansione, la seconda popolazione dei TIL, procedono direttamente alla seconda

espansione senza alcun periodo di transizione.

In alcune forme di realizzazione, la transizione dalla prima espansione alla seconda espansione, per esempio, il passaggio C secondo la figura 27, viene eseguita in un bioreattore a sistema chiuso. In alcune forme di realizzazione, per l'espansione dei TIL viene impiegato un sistema chiuso, come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, viene impiegato un bioreattore singolo. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore singolo impiegato è per esempio un G-REX-10 o un G-REX-100. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore a sistema chiuso è un bioreattore singolo.

#### **D. PASSAGGIO D: Seconda espansione**

In alcune forme di realizzazione, la popolazione cellulare dei TIL viene espansa nel numero dopo la raccolta e l'iniziale lavorazione in massa, per esempio, dopo il passaggio A e il passaggio B, e la transizione indicata come passaggio C, come indicato nella figura 27). Questa ulteriore espansione è indicata qui come seconda espansione, che può includere procedimenti di espansione in generale indicati nell'arte come procedimento di espansione rapida (REP; così come procedimenti come indicati nel passaggio D della figura 27). La seconda espansione è in generale realizzata utilizzando un terreno di coltura comprendente un certo numero di componenti, comprese cellule nutritive, una fonte di citochine, e un anticorpo anti-CD3, in un contenitore permeabile ai gas.

In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione o seconda espansione dei TIL (che può includere espansioni qualche volta indicate come REP; così come procedimenti come indicati nel passaggio D della figura 27) dei TIL può essere eseguita utilizzando qualsiasi pallone o contenitore per TIL noto a coloro che sono esperti nell'arte. In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione dei TIL può procedere per 7 giorni, 8 giorni, 9 giorni, 10 giorni, 11 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per 12 giorni, 13 giorni, o 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per da circa 7 giorni a circa 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per da circa 8 giorni a circa 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per da circa 9 giorni a circa 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per da circa 10 giorni a circa 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per da circa 11 giorni a circa 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per da circa 12 giorni a circa 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per da circa 13 giorni a circa 14 giorni. La seconda espansione dei TIL può procedere per circa 14 giorni.

In una forma di realizzazione, la seconda espansione può essere eseguita in un contenitore permeabile ai gas utilizzando i metodi della presente descrizione (comprese per esempio, le espansioni indicate come REP; così come procedimenti come indicati nel passaggio D della figura 27). Per esempio, i TIL possono essere espansi rapidamente utilizzando una stimolazione non specifica del recettore dei linfociti T in presenza di interleuchina 2 (IL-2) o interleuchina 15 (IL-15). Lo stimolo non specifico del recettore dei linfociti T può includere, per esempio, un anticorpo

anti-CD3, quale circa 30 ng/ml di OKT3, un anticorpo monoclonale di topo anti-CD3 (disponibile in commercio da Ortho-McNeil, Raritan, New Jersey o Miltenyi Biotech, Auburn, California) o UHCT-1 (disponibile in commercio da BioLegend, San Diego, California, USA). I TIL possono essere fatti espandere per indurre un'ulteriore stimolazione dei TIL *in vitro* includendo uno o più antigeni durante la seconda espansione, comprese loro porzioni antigeniche, quali (un) epitopo/i, del cancro, che possono essere facoltativamente espressi da un vettore, quale il peptide legante l'antigene leucocitario umano A2 (HLA-A2), per esempio, MART-1:26-35 0,3µM (27 1) o gp1 00:209-217 (210M), facoltativamente in presenza di un fattore di crescita dei linfociti T, quale 300 UI/ml di IL-2 o IL-15. Altri antigeni adatti possono includere, per esempio, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, un antigene tumorale tirosinasi, MAGE-A3, SSX-2, e VEGFR2, o loro porzioni antigeniche. I TIL possono anche essere espansi rapidamente mediante la ristimolazione con lo/gli stesso/i antigene/i del cancro pulsato/i su cellule presentanti l'antigene esprimenti HLA-A2. In alternativa, i TIL possono essere ulteriormente ristimolati, per esempio, con linfociti autologhi irradiati o con linfociti allogenici HLA-A2+ irradiati ed IL-2. In alcune forme di realizzazione, la ristimolazione avviene come parte della seconda espansione. In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione avviene in presenza di linfociti autologhi irradiati o con linfociti allogenici HLA-A2+ irradiati ed IL-2.

In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende inoltre IL-2. In un alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 3.000 UI/ml di IL-2. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 1.000 UI/ml, circa 1.500 UI/ml, circa 2.000 UI/ml, circa 2.500 UI/ml, circa 3.000 UI/ml, circa 3.500 UI/ml, circa 4.000 UI/ml, circa 4.500 UI/ml, circa 5.000 UI/ml, circa 5.500 UI/ml, circa 6.000 UI/ml, circa 6.500 UI/ml, circa 7.000 UI/ml, circa 7.500 UI/ml, o circa 8.000 UI/ml di IL-2. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende tra 1.000 e 2.000 UI/ml, tra 2.000 e 3.000 UI/ml, tra 3.000 e 4.000 UI/ml, tra 4.000 e 5.000 UI/ml, tra 5.000 e 6.000 UI/ml, tra 6.000 e 7.000 UI/ml, tra 7.000 e 8.000 UI/ml, o 8.000 UI/ml di IL-2.

In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende l'anticorpo OKT3. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 30 ng/ml di anticorpo OKT3. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 0,1 ng/ml, circa 0,5 ng/ml, circa 1 ng/ml, circa 2,5 ng/ml, circa 5 ng/ml, circa 7,5 ng/ml, circa 10 ng/ml, circa 15 ng/ml, circa 20 ng/ml, circa 25 ng/ml, circa 30 ng/ml, circa 35 ng/ml, circa 40 ng/ml, circa 50 ng/ml, circa 60 ng/ml, circa 70 ng/ml, circa 80 ng/ml, circa 90 ng/ml, circa 100 ng/ml, circa 200 ng/ml, circa 500 ng/ml, e circa 1 µg/ml di anticorpo OKT3. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende tra 0,1 ng/ml e 1 ng/ml, tra 1 ng/ml e 5 ng/ml, tra 5 ng/ml e 10 ng/ml, tra 10 ng/ml e 20 ng/ml, tra 20 ng/ml e 30 ng/ml, tra 30 ng/ml e 40 ng/ml, tra 40 ng/ml e 50 ng/ml, e tra 50 ng/ml e 100 ng/ml di anticorpo OKT3.

In alcune forme di realizzazione, una combinazione di IL-2, IL-7, IL-15, e/o IL-21 viene impiegata come combinazione durante la seconda

espansione. In alcune forme di realizzazione, IL-2, IL-7, IL-15, e/o IL-21 così come qualsiasi loro combinazione possono essere incluse durante la seconda espansione, compreso per esempio durante i procedimenti del passaggio D secondo la figura 27, così come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, una combinazione di IL-2, IL-15, ed IL-21 viene impiegata come combinazione durante la seconda espansione. In alcune forme di realizzazione, IL-2, IL-15, ed IL-21 così come qualsiasi loro combinazione possono essere incluse durante i procedimenti del passaggio D secondo la figura 27 e come descritto qui.

In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione può essere condotta in un terreno di coltura cellulare arricchito comprendente IL-2, OKT-3, e cellule nutritive presentanti l'antigene. In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione avviene in un terreno di coltura cellulare arricchito. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare arricchito comprende IL-2, OKT-3, e cellule nutritive presentanti l'antigene. In alcune forme di realizzazione, il secondo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC; indicate anche con cellule nutritive presentanti l'antigene). In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione avviene in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2, OKT-3, e cellule nutritive presentanti l'antigene (cioè le cellule presentanti l'antigene).

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende circa 500 UI/ml di IL-15, circa 400 UI/ml di IL-15, circa 300 UI/ml di IL-15, circa 200 UI/ml di IL-15, circa 180 UI/ml di IL-15, circa 160 UI/ml di IL-15, circa 140 UI/ml di IL-15, circa 120 UI/ml di IL-15, o circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 500 UI/ml di IL-15 a circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 400 UI/ml di IL-15 a circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 300 UI/ml di IL-15 a circa 100 UI/ml di IL-15. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende circa 200 UI/ml di IL-15.

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 180 UI/ml di IL-15. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende inoltre IL-15. In una forma di realizzazione preferita, il terreno di coltura cellulare comprende circa 180 UI/ml di IL-15.

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende circa 20 UI/ml di IL-21, circa 15 UI/ml di IL-21, circa 12 UI/ml di IL-21, circa 10 UI/ml di IL-21, circa 5 UI/ml di IL-21, circa 4 UI/ml di IL-21, circa 3 UI/ml di IL-21, circa 2 UI/ml di IL-21, circa 1 UI/ml di IL-21, o circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 20 UI/ml di IL-21 a circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 15 UI/ml di IL-21 a circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 12 UI/ml di IL-21 a circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 10 UI/ml di IL-21 a

circa 0,5 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende da circa 5 UI/ml di IL-21 a circa 1 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione comprende circa 2 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 1 UI/ml di IL-21. In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende circa 0,5 UI/ml di IL-21. In una forma di realizzazione, il terreno di coltura cellulare comprende inoltre IL-21. In una forma di realizzazione preferita, il terreno di coltura cellulare comprende circa 1 UI/ml di IL-21.

In alcune forme di realizzazione, le cellule nutritive presentanti l'antigene (APC) sono le PBMC. In una forma di realizzazione, il rapporto tra i TIL e le PBMC e/o le cellule presentanti l'antigene nell'espansione rapida e/o nella seconda espansione è da circa 1 a 25, da circa 1 a 50, da circa 1 a 100, da circa 1 a 125, da circa 1 a 150, da circa 1 a 175, da circa 1 a 200, da circa 1 a 225, da circa 1 a 250, da circa 1 a 275, da circa 1 a 300, da circa 1 a 325, da circa 1 a 350, da circa 1 a 375, da circa 1 a 400, o da circa 1 a 500. In una forma di realizzazione, il rapporto tra i TIL e le PBMC nell'espansione rapida e/o nella seconda espansione è tra 1 e 50 e da 1 a 300. In una forma di realizzazione, il rapporto tra i TIL e le PBMC nell'espansione rapida e/o nella seconda espansione è tra da 1 a 100 e da 1 a 200.

In una forma di realizzazione, il REP e/o la seconda espansione viene eseguito/a in palloni con i TIL non purificati che vengono miscelati con un eccesso di 100 o 200 volte di cellule nutritive inattivate, 30 mg/ml di anticorpo OKT3 anti-CD3 e 3.000 UI/ml di IL-2 in 150 ml di terreno. Viene eseguita la sostituzione del terreno (in generale, sostituzione di 2/3 del terreno mediante aspirazione con un terreno fresco) fino a che le cellule vengono trasferire ad una camera di crescita alternativa. Le camere di crescita alternative includono palloni G-REX e contenitori permeabili ai gas come più pienamente discusso sotto.

La seconda espansione (che può includere procedimenti indicati come procedimento REP) può essere accorciata a 7-14 giorni, come discusso negli esempi e nelle figure. In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione è accorciata a 11 giorni.

In una forma di realizzazione, il REP e/o la seconda espansione può essere eseguito/a utilizzando palloni T-175 e sacche permeabili ai gas come descritto precedentemente (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) o materiale da coltura permeabile ai gas (palloni G-Rex). In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione (comprendente espansioni indicate come espansioni rapide) viene eseguita in palloni T-175, e circa  $1 \times 10^6$  TIL sospesi in 150 ml di terreno possono essere aggiunti a ciascun pallone T-175. I TIL possono essere coltivati in una miscela 1 a 1 di CM e mezzo AIM-V, arricchiti con 3.000 UI per ml di IL-2 e 30 ng per ml di anti-CD3. I palloni T-175 possono essere incubati a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5%. Metà del mezzo può essere sostituita al giorno 5 utilizzando un mezzo 50/50 con 3.000 UI per ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, al giorno 7, le cellule da due palloni T-175 possono essere combinate in una sacca da 3 l e 300 ml di AIM-

V con siero AB umano al 5% e 3.000 UI per ml di IL-2 sono stati aggiunti ai 300 ml di sospensione dei TIL. Il numero di cellule in ciascuna sacca è stato contato ogni giorno o due ed è stato aggiunto terreno fresco per mantenere la conta cellulare tra  $0,5$  e  $2,0 \times 10^6$  cellule/ml.

In una forma di realizzazione, la seconda espansione (che può includere espansioni indicate come REP, così come quelle indicate nel passaggio D della figura 27) può essere eseguita in palloni permeabili ai gas con una capacità di 500 ml con fondi in silicio permeabili ai gas da 100 cm (G-Rex 100, disponibile in commercio da Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Nuovo Brighton, Minnesota, USA),  $5 \times 10^6$  o  $10 \times 10^6$  TIL possono essere coltivati con le PBMC in 400 ml di mezzo 50/50, arricchito con siero AB umano al 5%, 3.000 UI per ml di IL-2 e 30 ng per ml di anti-CD3 (OKT3). I palloni G-Rex 100 possono essere incubati a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5%. Al giorno 5, 250 ml di surnatante possono essere rimossi e posti in bottiglie da centrifuga e centrifugati a 1.500 giri/min ( $491 \times g$ ) per 10 minuti. I precipitati dei TIL possono essere risospesi con 150 ml di terreno fresco con siero AB umano al 5%, 3.000 UI per ml di IL-2, ed essere riaggiunti ai palloni G-Rex 100 originali. Quando i TIL sono espansi in serie in palloni G-Rex 100, al giorno 7 i TIL in ciascun G-Rex 100 possono essere sospesi nei 300 ml di mezzo presenti in ciascun pallone e la sospensione cellulare può essere divisa in 3 aliquote da 100 ml che possono essere utilizzate per seminare 3 palloni G-Rex 100. Quindi, 150 ml di AIM-V con siero AB umano al 5% e 3.000 UI per ml di IL-2 possono essere aggiunti a ciascun pallone. I palloni G-Rex 100 possono essere incubati a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5% e, dopo 4 giorni, 150 ml di AIM-V con 3.000 UI per ml di IL-2 possono essere aggiunti a ciascun pallone G-REX 100. Le cellule possono essere raccolte al giorno 14 di coltura.

In una forma di realizzazione, la seconda espansione (comprendente espansioni indicate come REP) viene eseguita in palloni con i TIL non purificati che vengono miscelati con un eccesso di 100 o 200 volte di cellule nutritive inattivate, 30 mg/ml di anticorpo OKT3 anti-CD3 e 3.000 UI/ml di IL-2 in 150 ml di terreno. In alcune forme di realizzazione, viene eseguita la sostituzione del mezzo fino a che le cellule vengono trasferire ad una camera di crescita alternativa. In alcune forme di realizzazione, 2/3 del mezzo vengono sostituiti mediante aspirazione con un terreno fresco. In alcune forme di realizzazione, le camere di crescita alternative includono palloni G-REX e contenitori permeabili ai gas come più pienamente discusso sotto.

In una forma di realizzazione, la seconda espansione (comprendente espansioni indicate come REP) viene eseguita e comprende inoltre un passaggio in cui i TIL vengono scelti per la superiore reattività al tumore. Qualsiasi metodo di selezione noto nell'arte può essere utilizzato. Per esempio, i metodi descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto US 2016/0010058 A1, può essere utilizzata per la selezione dei TIL per la superiore reattività al tumore.

Facoltativamente, un saggio di vitalità cellulare può essere eseguito dopo la seconda espansione (comprendente espansioni indicate come

espansione REP), utilizzando saggi standard noti nell'arte. Per esempio, può essere eseguito su un campione dei TIL non purificati un saggio di esclusione del tripan blu, che marca selettivamente le cellule morte e permette la valutazione della vitalità. In alcune forme di realizzazione, i campioni dei TIL possono essere contati e la vitalità può essere determinata utilizzando un contatore di cellule automatizzato Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, Massachusetts). In alcune forme di realizzazione, la vitalità viene determinata secondo il protocollo del contatore di cellule automatizzato citometro per immagini Cellometer K2 descritto, per esempio, nell'esempio 15.

In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione (comprendente espansioni indicate come REP) dei TIL può essere eseguita utilizzando palloni T-175 e sacche permeabili ai gas come descritto precedentemente (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751, e Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342) o palloni G-Rex permeabili ai gas. In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione viene eseguita utilizzando palloni. In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione viene eseguita utilizzando palloni G-Rex permeabili ai gas. In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione viene eseguita in palloni T-175, e circa  $1 \times 10^6$  TIL vengono sospesi in circa 150 ml di mezzo e ciò viene aggiunto a ciascun pallone T-175. I TIL vengono sottoposti a coltura con PBMC allogeneiche irradiate (50 Gy) come cellule "nutritive" in un rapporto da 1 a 100 e le cellule vengono sottoposte a coltura in una miscela 1 a 1 di CM e mezzo AIM-V (mezzo 50/50), arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2 e 30 ng/ml di anti-CD3. I palloni T-175 vengono incubati a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5%. In alcune forme di realizzazione, metà del mezzo viene sostituita al giorno 5 utilizzando un mezzo 50/50 con 3.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, al giorno 7, le cellule da 2 palloni T-175 vengono combinate in una sacca da 3 l e 300 ml di AIM-V con siero AB umano al 5% e 3.000 UI/ml di IL-2 vengono aggiunti ai 300 ml di sospensione dei TIL. Il numero di cellule in ciascuna sacca può essere contato ogni giorno o due e può essere aggiunto terreno fresco per mantenere la conta cellulare tra circa 0,5 e circa  $2,0 \times 10^6$  cellule/ml.

In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione (comprendente espansioni indicate come REP) viene eseguita in palloni con una capacità di 500 ml con fondi in silicio permeabili ai gas da 100 cm<sup>2</sup> (G-Rex 100, Wilson Wolf) (figura 1), circa  $5 \times 10^6$  o  $10 \times 10^6$  TIL vengono sottoposti a coltura con PBMC allogeneiche irradiate in un rapporto da 1 a 100 in 400 ml di mezzo 50/50, arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2 e 30 ng/ml di anti-CD3. I palloni G-Rex 100 vengono incubati a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5%. In alcune forme di realizzazione, al giorno 5, 250 ml di surnatante vengono rimossi e posti in bottiglie da centrifuga e centrifugati a 1.500 giri/min (491 g) per 10 minuti. I precipitati dei TIL possono quindi essere risospesi con 150 ml di mezzo fresco 50/50 con 3.000 UI/ml di IL-2 ed essere riaggiunti ai palloni G-Rex 100 originali. In forme di realizzazione in cui i TIL sono espansi in serie in palloni G-Rex 100, al giorno 7 i TIL in ciascun G-Rex 100 vengono sospesi nei 300 ml di mezzo presenti in ciascun pallone e la sospensione cellulare viene divisa in tre aliquote da 100 ml che vengono utilizzate per seminare 3 palloni G-Rex 100. Quindi, 150 ml di AIM-V

con siero AB umano al 5% e 3.000 UI/ml di IL-2 vengono aggiunti a ciascun pallone. I palloni G-Rex 100 vengono incubati a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5% e, dopo 4 giorni, 150 ml di AIM-V con 3.000 UI/ml di IL-2 vengono aggiunti a ciascun pallone G-Rex 100. Le cellule vengono raccolte al giorno 14 di coltura.

I diversi recettori antigenici dei linfociti T e B vengono prodotti mediante ricombinazione somatica di un numero limitato ma elevato di segmenti genici. Questi segmenti genici: V (variabile), D (di diversità), J (di legame), e C (costante), determinano la specificità di legame e le applicazioni a valle di immunoglobuline e recettori dei linfociti T (TCR). La presente invenzione fornisce un metodo per generare TIL che mostrano e incrementano la diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti nella seconda espansione mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, l'aumento di diversità è un aumento nella diversità delle immunoglobuline e/o nella diversità dei recettori dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, la diversità nell'immunoglobulina è nella catena pesante dell'immunoglobulina. In alcune forme di realizzazione, la diversità nell'immunoglobulina è nella catena leggera dell'immunoglobulina. In alcune forme di realizzazione, la diversità è nel recettore dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, la diversità è in uno dei recettori dei linfociti T scelto nel gruppo composto dai recettori alfa, beta, gamma, e delta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) alfa e/o beta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) alfa. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) beta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione di TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ ).

In alcune forme di realizzazione, il terreno di coltura della seconda espansione (per esempio, qualche volta indicato come CM2 o secondo terreno di coltura cellulare) comprende IL-2, OKT-3, così come cellule nutritive presentanti l'antigene (APC), come discusso in maggior dettaglio sotto.

In alcune forme di realizzazione, la seconda espansione, per esempio, i passaggi D secondo la figura 27, viene eseguita in un bioreattore a sistema chiuso. In alcune forme di realizzazione, per l'espansione dei TIL viene impiegato un sistema chiuso, come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, viene impiegato un bioreattore singolo. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore singolo impiegato è per esempio un G-REX-10 o un G-REX-100. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore a sistema chiuso è un bioreattore singolo.

#### 1. Cellule nutritive e cellule presentanti l'antigene

In una forma di realizzazione, le procedure della seconda espansione descritte qui (per esempio comprendenti l'espansione, quali quelle descritte nel passaggio D dalla figura 27, così come quelle indicate come REP) richiedono un eccesso di cellule nutritive durante l'espansione dei TIL REP

e/o durante la seconda espansione. In molte forme di realizzazione, le cellule nutritive sono cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ottenute da unità di sangue intero standard da donatori di sangue sani. Le PBMC vengono ottenute utilizzando metodi standard quali la separazione per gradiente di Ficoll-Paque.

In generale, le PBMC allogene vengono inattivate, attraverso irradiazione o trattamento termico, e utilizzate nelle procedure REP, come descritto negli esempi, in particolare nell'esempio 14, che fornisce un protocollo esemplificativo per valutare l'incompetenza nella replicazione delle PBMC allogene irradiate.

In alcune forme di realizzazione, le PBMC sono considerate incapaci di replicazione ed accettate per l'uso nelle procedure di espansione dei TIL descritte qui se il numero totale di cellule vitali al giorno 14 è inferiore al numero iniziale di cellule vitali messe in coltura al giorno 0 del REP e/o al giorno 0 della seconda espansione (cioè, al giorno d'inizio della seconda espansione). Si veda, per esempio, l'esempio 14.

In alcune forme di realizzazione, le PBMC sono considerate incapaci di replicazione ed accettate per l'uso nelle procedure di espansione dei TIL descritte qui se il numero totale di cellule vitali, sottoposte a coltura in presenza di OKT3 ed IL-2, al giorno 7 e al giorno 14 non è aumentato rispetto al numero iniziale di cellule vitali messe in coltura al giorno 0 del REP e/o al giorno 0 della seconda espansione (cioè, al giorno d'inizio della seconda espansione). In alcune forme di realizzazione, le PBMC vengono sottoposte a coltura in presenza di 30 ng/ml di anticorpo OKT3 e 3.000 UI/ml di IL-2. Si veda, per esempio, l'esempio 13.

In alcune forme di realizzazione, le PBMC sono considerate incapaci di replicazione ed accettate per l'uso nelle procedure di espansione dei TIL descritte qui se il numero totale di cellule vitali, sottoposte a coltura in presenza di OKT3 ed IL-2, al giorno 7 e al giorno 14 non è aumentato rispetto al numero iniziale di cellule vitali messe in coltura al giorno 0 del REP e/o al giorno 0 della seconda espansione (cioè, al giorno d'inizio della seconda espansione). In alcune forme di realizzazione, le PBMC vengono sottoposte a coltura in presenza di 5-60 ng/ml di anticorpo OKT3 e 1.000-6.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, le PBMC vengono sottoposte a coltura in presenza di 10-50 ng/ml di anticorpo OKT3 e 2.000-5.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, le PBMC vengono sottoposte a coltura in presenza di 20-40 ng/ml di anticorpo OKT3 e 2.000-4.000 UI/ml di IL-2. In alcune forme di realizzazione, le PBMC vengono sottoposte a coltura in presenza di 25-35 ng/ml di anticorpo OKT3 e 2.500-3.500 UI/ml di IL-2.

In alcune forme di realizzazione, le cellule nutritive presentanti l'antigene sono le PBMC. In alcune forme di realizzazione, le cellule nutritive presentanti l'antigene sono cellule nutritive presentanti l'antigene artificiali. In una forma di realizzazione, il rapporto tra i TIL e le cellule nutritive presentanti l'antigene nella seconda espansione è da circa 1 a 25, da circa 1 a 50, da circa 1 a 100, da circa 1 a 125, da circa 1 a 150, da circa 1 a

175, da circa 1 a 200, da circa 1 a 225, da circa 1 a 250, da circa 1 a 275, da circa 1 a 300, da circa 1 a 325, da circa 1 a 350, da circa 1 a 375, da circa 1 a 400, o da circa 1 a 500. In una forma di realizzazione, il rapporto tra i TIL e le cellule nutritive presentanti l'antigene nella seconda espansione è tra 1 e 50 e da 1 a 300. In una forma di realizzazione, il rapporto tra i TIL e le cellule nutritive presentanti l'antigene nella seconda espansione è tra da 1 a 100 e da 1 a 200.

In una forma di realizzazione, le procedure della seconda espansione descritte qui richiedono un rapporto tra circa  $2,5 \times 10^9$  cellule nutritive e circa  $100 \times 10^6$  TIL. In un'altra forma di realizzazione, le procedure della seconda espansione descritte qui richiedono un rapporto tra circa  $2,5 \times 10^9$  cellule nutritive e circa  $50 \times 10^6$  TIL. In ancora un'altra forma di realizzazione, le procedure della seconda espansione descritte qui richiedono circa  $2,5 \times 10^9$  cellule nutritive rispetto a circa  $25 \times 10^6$  TIL.

In una forma di realizzazione, le procedure della seconda espansione descritte qui richiedono un eccesso di cellule nutritive durante la seconda espansione. In molte forme di realizzazione, le cellule nutritive sono cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ottenute da unità di sangue intero standard da donatori di sangue sani. Le PBMC vengono ottenute utilizzando metodi standard quali la separazione per gradiente di Ficoll-Paque. In una forma di realizzazione, le cellule presentanti l'antigene artificiali (aAPC) vengono utilizzate al posto delle PBMC.

In generale, le PBMC allogene vengono inattivate, attraverso irradiazione o trattamento termico, e utilizzate nelle procedure di espansione dei TIL descritte qui, comprese le procedure esemplificative descritte nelle figure 4, 5, e 27.

In una forma di realizzazione, le cellule presentanti l'antigene artificiali vengono utilizzate nella seconda espansione come sostituzione di, o in combinazione con, le PBMC.

## 2. Citochine

I metodi di espansione descritti qui in generale utilizzano terreni di coltura con dosi elevate di una citochina, in particolare IL-2, com'è noto nell'arte.

In alternativa, è inoltre possibile utilizzare combinazioni di citochine per l'espansione rapida e/o la seconda espansione dei TIL, con combinazioni di due o più tra IL-2, IL-15 ed IL-21 com'è in generale delineato nella pubblicazione internazionale WO 2015/189356 e nella pubblicazione internazionale WO 2015/189357. Così, le combinazioni possibili includono IL-2 e IL-15, IL-2 ed IL-21, IL-15 ed IL-21 ed IL-2, IL-15 ed IL-21, con quest'ultima che trova un uso particolare in molte forme di realizzazione. L'uso di combinazioni di citochine favorisce specificamente la generazione dei linfociti, e in particolare dei linfociti T come ivi descritto.

## 3. Anticorpi anti-CD3

In alcune forme di realizzazione, i terreni di coltura utilizzati nei metodi di espansione descritti qui (compresi quelli indicati come REP, si veda, per esempio, la figura 27) comprendono inoltre un anticorpo anti-CD3. Un anticorpo anti-CD3 in combinazione con IL-2 induce l'attivazione dei linfociti T e la divisione cellulare nella popolazione dei TIL. Questo effetto si può vedere con anticorpi a lunghezza intera così come con frammenti Fab e F(ab')<sub>2</sub>, con i primi essendo in generale preferiti; si veda, per esempio, Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719.

Come sarà compreso da coloro che sono esperti nell'arte, vi è un certo numero di anticorpi anti-CD3 umani adatti che trovano uso nell'invenzione, compresi anticorpi anti-CD3 umani policlonali e monoclonali da vari mammiferi, compresi, ma senza limitazione, anticorpi murini, umani, di primati, di ratto, e di cane. In forme di realizzazione particolari, viene utilizzato l'anticorpo anti-CD3 OKT3 (disponibile in commercio da Ortho-McNeil, Raritan, New Jersey o Miltenyi Biotech, Auburn, California).

#### **E. PASSAGGIO E: Raccolta dei TIL**

Dopo il secondo i passaggio di espansione, le cellule possono essere raccolte. In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono raccolti dopo uno, due, tre, quattro o più passaggi di espansione, per esempio come fornito nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono raccolti dopo due passaggi di espansione, per esempio come fornito nella figura 27.

I TIL possono essere raccolti in qualsiasi modo appropriato e sterile, compreso per esempio mediante centrifugazione. I metodi per la raccolta dei TIL sono ben noti nell'arte e qualsiasi di tali metodi noti può essere impiegato con il presente procedimento. In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono raccolti utilizzando un sistema automatizzato.

I raccoglitori cellulari e/o i sistemi di lavorazione cellulare sono disponibili in commercio da una varietà di fonti, compresi, per esempio, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer, ed Inotech Biosystems International, Inc. Qualsiasi raccoglitore a base di cellule può essere impiegato con i presenti metodi. In alcune forme di realizzazione, il raccoglitore di cellule e/o i sistemi di lavorazione cellulare è/sono un raccoglitore di cellule basato su membrana. In alcune forme di realizzazione, la raccolta delle cellule è attraverso un sistema di lavorazione cellulare, quale il sistema LOVO (prodotto da Fresenius Kabi). Il termine "sistema di lavorazione cellulare LOVO" si riferisce anche a qualsiasi strumento o dispositivo prodotto da qualsiasi fornitore che può pompare una soluzione comprendente cellule attraverso una membrana o un filtro quale una membrana rotante o un filtro rotante in un ambiente di un sistema sterile e/o chiuso, permettendo il flusso continuo e la lavorazione cellulare per rimuovere il surnatante o il terreno di coltura cellulare senza pellettizzazione. In alcune forme di realizzazione, il raccoglitore di cellule e/o il sistema di lavorazione cellulare può eseguire la separazione cellulare, il lavaggio, lo scambio di fluidi, la concentrazione, e/o altri passaggi di lavorazione cellulare in un sistema chiuso, sterile.

In alcune forme di realizzazione, la raccolta, per esempio, i passaggio E secondo la figura 27, viene eseguita da un bioreattore a sistema chiuso. In alcune forme di realizzazione, per l'espansione dei TIL viene impiegato un sistema chiuso, come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, viene impiegato un bioreattore singolo. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore singolo impiegato è per esempio un G-REX-10 o un G-REX-100. In alcune forme di realizzazione, il bioreattore a sistema chiuso è un bioreattore singolo.

#### **F. PASSAGGIO F: Formulazione finale/trasferimento alla sacca per infusione**

Dopo che i passaggi da A ad E come forniti in un ordine esemplificativo nella figura 27 e come descritti in dettaglio sopra e qui sono completi, le cellule vengono trasferire ad un contenitore per l'uso nella somministrazione a un paziente. In alcune forme di realizzazione, una volta che un numero terapeuticamente sufficiente di TIL viene ottenuto utilizzando i metodi di espansione descritti sopra, essi vengono trasferiti ad un contenitore per l'uso nella somministrazione a un paziente.

I TIL espansi utilizzando le APC della presente descrizione possono essere per la somministrazione a un paziente come composizione farmaceutica. In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è una sospensione dei TIL in un tampone sterile. I TIL espansi utilizzando le PBMC della presente descrizione possono essere somministrati mediante qualsiasi via adatta come noto nell'arte. In alcune forme di realizzazione, i linfociti T vengono somministrati come infusione endoarteriosa o endovenosa singola, che preferibilmente dura approssimativamente da 30 a 60 minuti. Altre vie di somministrazione adatte includono quella intraperitoneale, intratecale, ed intralinfatica.

##### **1. Composizioni farmaceutiche, dosaggi, e regimi di trattamento**

In una forma di realizzazione, i TIL espansi utilizzando i metodi della presente descrizione sono per la somministrazione a un paziente come composizione farmaceutica. In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è una sospensione dei TIL in un tampone sterile. I TIL espansi utilizzando le PBMC della presente descrizione possono essere somministrati mediante qualsiasi via adatta come noto nell'arte. In alcune forme di realizzazione, i linfociti T vengono somministrati come infusione endoarteriosa o endovenosa singola, che preferibilmente dura approssimativamente da 30 a 60 minuti. Altre vie di somministrazione adatte includono la somministrazione intraperitoneale, intratecale, ed intralinfatica.

Qualsiasi dose adatta dei TIL può essere somministrata. In alcune forme di realizzazione, vengono somministrati da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$  TIL, con una media di circa  $7,8 \times 10^{10}$  TIL, in particolare se il cancro è melanoma. In una forma di realizzazione, vengono somministrati da circa  $1,2 \times 10^{10}$  a circa  $4,3 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, vengono somministrati da circa  $3 \times 10$  a circa  $12 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, vengono somministrati da circa  $4 \times 10^{10}$  a circa  $10 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, vengono somministrati da

circa  $5 \times 10^{10}$  a circa  $8 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, vengono somministrati da circa  $6 \times 10^{10}$  a circa  $8 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, vengono somministrati da circa  $7 \times 10^{10}$  a circa  $8 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ . In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è circa  $7,8 \times 10^{10}$  TIL, in particolare se il cancro è melanoma. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $1,2 \times 10^{10}$  a circa  $4,3 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $3 \times 10^{10}$  a circa  $12 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $4 \times 10^{10}$  a circa  $10 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $5 \times 10^{10}$  a circa  $8 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $6 \times 10^{10}$  a circa  $8 \times 10^{10}$  TIL. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $7 \times 10^{10}$  a circa  $8 \times 10^{10}$  TIL.

In alcune forme di realizzazione, il numero dei TIL forniti nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è circa  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ , e  $9 \times 10^{13}$ . In una forma di realizzazione, il numero dei TIL forniti nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è nell'intervallo da  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$ , da  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$ , da  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$ , da  $5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$ , da  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$ , da  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$ , da  $1 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$ , da  $5 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$ , da  $1 \times 10^{10}$  a  $5 \times 10^{10}$ , da  $5 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{11}$ , da  $5 \times 10^{11}$  a  $1 \times 10^{12}$ , da  $1 \times 10^{12}$  a  $5 \times 10^{12}$ , e da  $5 \times 10^{12}$  a  $1 \times 10^{13}$ .

In alcune forme di realizzazione, la concentrazione dei TIL fornita nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è minore di, per esempio, il 100%, il 90%, l'80%, il 70%, il 60%, il 50%, il 40%, il 30%, il 20%, il 19%, il 18%, il 17%, il 16%, il 15%, il 14%, il 13%, il 12%, l'11%, il 10%, il 9%, l'8%, il 7%, il 6%, il 5%, il 4%, il 3%, il 2%, l'1%, lo 0,5%, lo 0,4%, lo 0,3%, lo 0,2%, lo 0,1%, lo 0,09%, lo 0,08%, lo 0,07%, lo 0,06%, lo 0,05%, lo 0,04%, lo 0,03%, lo 0,02%, lo 0,01%, lo 0,009%, lo 0,008%, lo 0,007%, lo 0,006%, lo 0,005%, lo 0,004%, lo 0,003%, lo 0,002%, lo 0,001%, lo 0,0009%, lo 0,0008%, lo 0,0007%, lo 0,0006%, lo 0,0005%, lo 0,0004%, lo 0,0003%, lo 0,0002% o lo 0,0001% p/p, p/v o v/v della composizione farmaceutica.

In alcune forme di realizzazione, la concentrazione dei TIL fornita nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è superiore al 90%, all'80%, al 70%, al 60%, al 50%, al 40%, al 30%, al 20%, al 19,75%, al 19,50%, al 19,25%, al 19%, al 18,75%, al 18,50%, al 18,25%, al 18%, al 17,75%, al 17,50%, al 17,25%, al 17%, al 16,75%, al 16,50%, al 16,25%, al 16%, al 15,75%, al 15,50%, al 15,25%, al 15%, al 14,75%, al 14,50%, al 14,25%,

al 14%, al 13,75%, al 13,50%, al 13,25%, al 13%, al 12,75%, al 12,50%, al 12,25%, al 12%, all'11,75%, all'11,50%, all'11,25%, all'11%, al 10,75%, al 10,50%, al 10,25%, al 10%, al 9,75%, al 9,50%, al 9,25%, al 9%, all'8,75%, all'8,50%, all'8,25%, all'8%, al 7,75%, al 7,50%, al 7,25%, al 7%, al 6,75%, al 6,50%, al 6,25%, al 6%, al 5,75%, al 5,50%, al 5,25%, al 5%, al 4,75%, al 4,50%, al 4,25%, al 4%, al 3,75%, al 3,50%, al 3,25%, al 3%, al 2,75%, al 2,50%, al 2,25%, al 2%, all'1,75%, all'1,50%, all'1,25%, all'1%, allo 0,5%, allo 0,4%, allo 0,3%, allo 0,2%, allo 0,1%, allo 0,09%, allo 0,08%, allo 0,07%, allo 0,06%, allo 0,05%, allo 0,04%, allo 0,03%, allo 0,02%, allo 0,01%, allo 0,009%, allo 0,008%, allo 0,007%, allo 0,006%, allo 0,005%, allo 0,004%, allo 0,003%, allo 0,002%, allo 0,001%, allo 0,0009%, allo 0,0008%, allo 0,0007%, allo 0,0006%, allo 0,0005%, allo 0,0004%, allo 0,0003%, allo 0,0002% o allo 0,0001% p/p, p/v, o v/v della composizione farmaceutica.

In alcune forme di realizzazione, la concentrazione dei TIL fornita nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è nell'intervallo da circa lo 0,0001% a circa il 50%, da circa lo 0,001% a circa il 40%, da circa lo 0,01% a circa il 30%, da circa lo 0,02% a circa il 29%, da circa lo 0,03% a circa il 28%, da circa lo 0,04% a circa il 27%, da circa lo 0,05% a circa il 26%, da circa lo 0,06% a circa il 25%, da circa lo 0,07% a circa il 24%, da circa lo 0,08% a circa il 23%, da circa lo 0,09% a circa il 22%, da circa lo 0,1% a circa il 21%, da circa lo 0,2% a circa il 20%, da circa lo 0,3% a circa il 19%, da circa lo 0,4% a circa il 18%, da circa lo 0,5% a circa il 17%, da circa lo 0,6% a circa il 16%, da circa lo 0,7% a circa il 15%, da circa lo 0,8% a circa il 14%, da circa lo 0,9% a circa il 12% o da circa l'1% a circa il 10% p/p, p/v o v/v della composizione farmaceutica.

In alcune forme di realizzazione, la concentrazione dei TIL fornita nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è nell'intervallo da circa lo 0,001% a circa il 10%, da circa lo 0,01% a circa il 5%, da circa lo 0,02% a circa il 4,5%, da circa lo 0,03% a circa il 4%, da circa lo 0,04% a circa il 3,5%, da circa lo 0,05% a circa il 3%, da circa lo 0,06% a circa il 2,5%, da circa lo 0,07% a circa il 2%, da circa lo 0,08% a circa l'1,5%, da circa lo 0,09% a circa l'1%, da circa lo 0,1% a circa lo 0,9% p/p, p/v o v/v della composizione farmaceutica.

In alcune forme di realizzazione, la quantità dei TIL fornita nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è uguale o inferiore a 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g, o 0,0001 g.

In alcune forme di realizzazione, la quantità dei TIL fornita nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione è maggiore di 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g, 0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04

g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5 g, 3 g, 3,5 g, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g, o 10 g.

I TIL forniti nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione sono efficaci all'interno di un ampio regime di dosaggio. Il dosaggio esatto dipenderà dalla via di somministrazione, dalla forma in cui il composto viene somministrato, dal sesso e dall'età del soggetto da trattare, dal peso corporeo del soggetto da trattare, e dalla preferenza ed esperienza del medico curante. I dosaggi dei TIL stabiliti clinicamente possono anche essere utilizzati se appropriato. Le quantità delle composizioni farmaceutiche somministrate utilizzando i metodi qui, quali i dosaggi dei TIL, saranno dipendenti dall'essere umano o dal mammifero che viene trattato, dalla gravità del disturbo o della condizione, dalla velocità di somministrazione, dalla disposizione dei principi farmaceutici attivi e dalla discrezione del medico prescrivente.

In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere per la somministrazione in una dose singola. Tale somministrazione può essere mediante iniezione, per esempio, iniezione endovenosa. In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere per la somministrazione in dosi multiple. Il dosaggio può essere una volta, due volte, tre volte, quattro volte, cinque volte, sei volte, o più di sei volte all'anno. Il dosaggio può essere una volta al mese, una volta ogni due settimane, una volta alla settimana, o una volta a giorni alterni. La somministrazione dei TIL può continuare finché necessario.

In alcune forme di realizzazione, un dosaggio efficace dei TIL è circa  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ , e  $9 \times 10^{13}$ . In alcune forme di realizzazione, un dosaggio efficace dei TIL è nell'intervallo da  $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$ , da  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$ , da  $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$ , da  $5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$ , da  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$ , da  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$ , da  $1 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$ , da  $5 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$ , da  $1 \times 10^{10}$  a  $5 \times 10^{10}$ , da  $5 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{11}$ , da  $5 \times 10^{11}$  a  $1 \times 10^{12}$ , da  $1 \times 10^{12}$  a  $5 \times 10^{12}$ , e da  $5 \times 10^{12}$  a  $1 \times 10^{13}$ .

In alcune forme di realizzazione, un dosaggio efficace dei TIL è nell'intervallo da circa 0,01 mg/kg a circa 4,3 mg/kg, da circa 0,15 mg/kg a circa 3,6 mg/kg, da circa 0,3 mg/kg a circa 3,2 mg/kg, da circa 0,35 mg/kg a circa 2,85 mg/kg, da circa 0,15 mg/kg a circa 2,85 mg/kg, da circa 0,3 mg a circa 2,15 mg/kg, da circa 0,45 mg/kg a circa 1,7 mg/kg, da circa 0,15 mg/kg a circa 1,3 mg/kg, da circa 0,3 mg/kg a circa 1,15 mg/kg, da circa 0,45

mg/kg a circa 1 mg/kg, da circa 0,55 mg/kg a circa 0,85 mg/kg, da circa 0,65 mg/kg a circa 0,8 mg/kg, da circa 0,7 mg/kg a circa 0,75 mg/kg, da circa 0,7 mg/kg a circa 2,15 mg/kg, da circa 0,85 mg/kg a circa 2 mg/kg, da circa 1 mg/kg a circa 1,85 mg/kg, da circa 1,15 mg/kg a circa 1,7 mg/kg, da circa 1,3 mg/kg a circa 1,6 mg/kg, da circa 1,35 mg/kg a circa 1,5 mg/kg, da circa 2,15 mg/kg a circa 3,6 mg/kg, da circa 2,3 mg/kg a circa 3,4 mg/kg, da circa 2,4 mg/kg a circa 3,3 mg/kg, da circa 2,6 mg/kg a circa 3,15 mg/kg, da circa 2,7 mg/kg a circa 3 mg/kg, da circa 2,8 mg/kg a circa 3 mg/kg, o da circa 2,85 mg/kg a circa 2,95 mg/kg.

In alcune forme di realizzazione, un dosaggio efficace dei TIL è nell'intervallo da circa da 1 mg a circa 500 mg, da circa 10 mg a circa 300 mg, da circa 20 mg a circa 250 mg, da circa 25 mg a circa 200 mg, da circa da 1 mg a circa 50 mg, da circa 5 mg a circa 45 mg, da circa 10 mg a circa 40 mg, da circa 15 mg a circa 35 mg, da circa 20 mg a circa 30 mg, da circa 23 mg a circa 28 mg, da circa 50 mg a circa 150 mg, da circa 60 mg a circa 140 mg, da circa 70 mg a circa 130 mg, da circa 80 mg a circa 120 mg, da circa 90 mg a circa 110 mg, o da circa 95 mg a circa 105 mg, da circa 98 mg a circa 102 mg, da circa da 10 mg a circa 250 mg, da circa 160 mg a circa 240 mg, da circa 170 mg a circa 230 mg, da circa 180 mg a circa 220 mg, da circa 190 mg a circa 210 mg, da circa 195 mg a circa 205 mg, o da circa 198 a circa 207 mg.

Una quantità efficace dei TIL può essere somministrata in dosi singole o multiple mediante qualsiasi delle modalità di somministrazione accettate di agenti aventi utilità simili, comprese le vie intranasale e transdermica, mediante iniezione endoarteriosa, per via endovenosa, per via intraperitoneale, per via parenterale, per via intramuscolare, per via sottocutanea, per via topica, mediante trapianto, o mediante inalazione.

#### **G. Eventuali analisi della vitalità cellulare**

Facoltativamente, un saggio di vitalità cellulare può essere eseguito dopo il passaggio B prima dell'espansione, utilizzando saggi standard noti nell'arte. Per esempio, può essere eseguito su un campione dei TIL non purificati un saggio di esclusione del tripan blu, che marca selettivamente le cellule morte e permette la valutazione della vitalità. Altri saggi per l'uso nella valutazione della vitalità possono includere, ma senza limitazione, il saggio Alamar Blue; e il saggio con MTT.

##### **1. Conte delle cellule, vitalità, citometria a flusso**

In alcune forme di realizzazione, vengono misurate le conte cellulari e/o la vitalità. L'espressione di marcatori quali, ma non limitati a, CD3, CD4, CD8, e CD56, così come qualsiasi altro indicato o descritto qui, può essere misurata mediante la citometria a flusso con anticorpi, per esempio, ma senza limitazione, quelli disponibili in commercio da BD Biosciences (BD Biosciences, San Jose, California) utilizzando un citometro a flusso FACSCanto™ (BD Biosciences). Le cellule possono essere contate manualmente utilizzando un emocitometro con c-chip monouso (VWR, Batavia, Illinois) e la vitalità può essere valutata utilizzando qualsiasi metodo noto nell'arte, compresa, ma senza limitazione, la colorazione con

tripan blu.

In alcuni casi, la popolazione di TIL non purificati può essere crioconservata immediatamente, utilizzando i protocolli discussi sotto. In alternativa, la popolazione di TIL non purificati può essere sottoposta a REP e quindi crioconservata come discusso sotto. In modo simile, nel caso in cui saranno utilizzati TIL geneticamente modificati nella terapia, le popolazioni di TIL non purificati o REP possono essere sottoposte a modifiche genetiche per trattamenti adatti.

## 2. Colture cellulari

In una forma di realizzazione, un metodo per espandere i TIL può includere l'utilizzare da circa 5.000 ml a circa 25.000 ml di terreno cellulare, da circa 5.000 ml a circa 10.000 ml di terreno cellulare, o da circa 5.800 ml a circa 8.700 ml di terreno cellulare. In una forma di realizzazione, l'espansione del numero dei TIL utilizza non più di un tipo di terreno di coltura cellulare. Qualsiasi terreno di coltura cellulare adatto può essere utilizzato, per esempio, il terreno di coltura cellulare AIM-V (L-glutamina, streptomicina solfato 50 $\mu$ M, e gentamicina solfato 10 $\mu$ M) (Invitrogen, Carlsbad, California). A questo proposito, i metodi dell'invenzione riducono vantaggiosamente la quantità di mezzo e il numero di tipi di mezzo richiesti per espandere il numero dei TIL. In una forma di realizzazione, l'espansione del numero dei TIL può comprendere l'aggiunta di terreno di coltura cellulare fresco alle cellule (indicato anche con alimentazione delle cellule) non più frequentemente di ogni tre o quattro giorni. L'espansione del numero di cellule in un contenitore permeabile ai gas semplifica le procedure necessarie per espandere il numero di cellule riducendo la frequenza di alimentazione necessaria per espandere le cellule.

In una forma di realizzazione, il terreno cellulare nel primo e/o nel secondo contenitore permeabile ai gas è non filtrato. L'uso di terreno cellulare non filtrato può semplificare le procedure necessarie per espandere il numero di cellule. In una forma di realizzazione, il terreno cellulare nel primo e/o nel secondo contenitore permeabile ai gas è privo di beta-mercaptoetanololo (BME).

In una forma di realizzazione, la durata del metodo comprendente l'ottenere un campione di tessuto tumorale dal mammifero; il sottoporre a coltura il campione di tessuto tumorale in un primo contenitore permeabile ai gas contenente terreno cellulare *ivi*; l'ottenere i TIL dal campione di tessuto tumorale; l'espandere il numero dei TIL in un secondo contenitore permeabile ai gas contenente terreno cellulare *ivi* utilizzando le aAPC per una durata da circa 14 a circa 42 giorni, per esempio, circa 28 giorni.

In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi in contenitori permeabili ai gas. I contenitori permeabili ai gas sono stati utilizzati per espandere i TIL utilizzando le PBMC utilizzando metodi, composizioni, e dispositivi noti nell'arte, compresi quelli descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto US 2005/0106717 A1. In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi in sacche permeabili ai gas. In una forma di

realizzazione, i TIL vengono espansi utilizzando un sistema di espansione cellulare che espande i TIL in sacche permeabili ai gas, quale il sistema di espansione Xuri Cell W25 (GE Healthcare). In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi utilizzando un sistema di espansione cellulare che espande i TIL in sacche permeabili ai gas, quale il sistema di bioreattore WAVE, noto anche come sistema di espansione Xuri Cell W5 (GE Healthcare). In una forma di realizzazione, il sistema di espansione cellulare comprende una sacca cellulare permeabile ai gas con un volume scelto nel gruppo composto da circa 100 ml, circa 200 ml, circa 300 ml, circa 400 ml, circa 500 ml, circa 600 ml, circa 700 ml, circa 800 ml, circa 900 ml, circa 1 l, circa 2 l, circa 3 l, circa 4 l, circa 5 l, circa 6 l, circa 7 l, circa 8 l, circa 9 l, e circa 10 l. In una forma di realizzazione, i TIL possono essere fatti espandere in palloni G-Rex (disponibili in commercio da Wilson Wolf Manufacturing). Tali forme di realizzazione permettono di espandere le popolazioni cellulari da circa  $5 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup> a tra  $10 \times 10^6$  e  $30 \times 10^6$  cellule/cm<sup>2</sup>. In una forma di realizzazione, questa espansione viene condotta senza aggiungere terreno di coltura cellulare fresco alle cellule (indicato anche con alimentazione delle cellule). In una forma di realizzazione, questa è senza alimentazione, a condizione che il mezzo risieda ad un'altezza di circa 10 cm nel pallone G-Rex. In una forma di realizzazione, questa è senza alimentazione ma con l'aggiunta di una o più citochine. In una forma di realizzazione, la citochina può essere aggiunta come bolo senza alcun bisogno di miscelare la citochina con il mezzo. Tali contenitori, dispositivi, e metodi sono noti nell'arte e sono stati utilizzati per espandere i TIL, e includono quelli descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2014/0377739A1, nella pubblicazione internazionale No. WO 2014/210036 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2013/0115617 A1, nella pubblicazione internazionale No. WO2013/188427 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2011/0136228 A1, nel brevetto statunitense US 8,809,050 B2, nella pubblicazione internazionale WO 2011/072088 A2, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2016/0208216 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2012/0244133 A1, nella pubblicazione internazionale No. WO 2012/129201 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2013/0102075 A1, nel brevetto statunitense US 8,956,860 B2, nella pubblicazione internazionale No. WO2013/173835 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2015/0175966 A1. Tali procedimenti vengono inoltre descritti in Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

#### Eventuale ingegnerizzazione genetica dei TIL

In alcune forme di realizzazione, i TIL sono facoltativamente ingegnerizzati geneticamente per includere ulteriori funzionalità, compresi, ma senza limitazione, un recettore dei linfociti T ad affinità elevata (TCR), per esempio, un TCR diretto verso un antigene associato al tumore quale MAGE-1, HER2, o NY-ESO-1, o un recettore chimerico per l'antigene (CAR) che si lega ad una molecola della superficie cellulare associata al tumore (per esempio la mesotelina) o una molecola della superficie cellulare limitata per la linea (per esempio CD19).

## **H. Eventuale crioconservazione dei TIL**

Come discusso sopra, ed esemplificato nei passaggi da A ad E come fornito nella figura 27, la crioconservazione può avvenire in numerosi punti in ogni parte del procedimento di espansione dei TIL. In alcune forme di realizzazione, la popolazione espansa dei TIL dopo la seconda espansione (come fornito per esempio, secondo i passaggio D della figura 27) può essere crioconservata. La crioconservazione può essere in generale realizzata ponendo la popolazione dei TIL in una soluzione di congelamento, per esempio, siero AB con complemento inattivato al 85% e dimetilsolfossido al 15% (DMSO). Le cellule in soluzione vengono poste in flaconcini criogenici e conservate per 24 ore a -80°C, con eventuale trasferimento a congelatori ad azoto gassoso per la crioconservazione. Si veda Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986. In alcune forme di realizzazione, i TIL sono crioconservati in DMSO al 5%. In alcune forme di realizzazione, i TIL sono crioconservati in terreni di coltura cellulare più DMSO al 5%. In alcune forme di realizzazione, i TIL sono crioconservati secondo i metodi forniti negli esempi 8 e 9.

Quando appropriato, le cellule vengono rimosse dal congelatore e scongelate in un bagno d'acqua a 37°C fino a che approssimativamente 4/5 della soluzione sono scongelati. Le cellule sono in generale risospese in mezzi completi e facoltativamente lavate una o più volte. In alcune forme di realizzazione, i TIL scongelati possono essere contati e valutati per la vitalità com'è noto nell'arte.

## **I. Caratteristiche fenotipiche dei TIL espansi**

In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono analizzati per l'espressione di numerosi marcatori del fenotipo dopo l'espansione, compresi quelli descritti qui e negli esempi. In una forma di realizzazione, l'espressione di uno o più marcatori fenotipici viene esaminata. In alcune forme di realizzazione, le caratteristiche fenotipiche dei TIL vengono analizzate dopo la prima espansione nel passaggio B. In alcune forme di realizzazione, le caratteristiche fenotipiche dei TIL vengono analizzate durante la transizione nel passaggio C. In alcune forme di realizzazione, le caratteristiche fenotipiche dei TIL vengono analizzate durante la transizione secondo i passaggio C e dopo la crioconservazione. In alcune forme di realizzazione, le caratteristiche fenotipiche dei TIL vengono analizzate dopo la seconda espansione secondo i passaggio D. In alcune forme di realizzazione, le caratteristiche fenotipiche dei TIL vengono analizzate dopo due o più espansioni secondo i passaggio D. In alcune forme di realizzazione, il marcatore viene scelto nel gruppo composto da TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ ), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR-7, CD4, CD3, CD38, e HLA-DR. In alcune forme di realizzazione, il marcatore viene scelto nel gruppo composto da TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ ), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, e CD8a. In una forma di realizzazione, il marcatore viene scelto nel gruppo composto da CD45RA, CD8a, CCR-7, CD4, CD3, CD38, e HLA-DR. In alcune forme di realizzazione, l'espressione di uno, due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, o quattordici marcatori viene esaminata. In alcune forme di realizzazione, l'espressione da uno o più marcatori da ciascun gruppo viene

esaminata. In alcune forme di realizzazione, una o più tra l'espressione di HLA-DR, CD38, e CD69 è mantenuta (cioè non mostra una differenza statisticamente significativa) nei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati. In alcune forme di realizzazione, lo stato di attivazione dei TIL è mantenuto nei TIL scongelati.

In una forma di realizzazione, l'espressione di uno o più marcatori regolatori viene misurata. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore viene scelto nel gruppo composto da CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, e CD154. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore viene scelto nel gruppo composto da CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, e TIM-3. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore viene scelto nel gruppo composto da CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, e CD154. In alcune forme di realizzazione, l'espressione di molecole regolatrici è diminuita nei TIL scongelati in confronto ai TIL freschi. In alcune forme di realizzazione, l'espressione delle molecole regolatrici LAG-3 e TIM-3 è diminuita nei TIL scongelati in confronto ai TIL freschi. In alcune forme di realizzazione, non vi è alcuna differenza significativa nell'espressione di CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ . In alcune forme di realizzazione, non vi è alcuna differenza significativa nell'espressione di CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ , e/o di marcatori di memoria nei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati. In alcune forme di realizzazione, non vi è alcuna differenza significativa nell'espressione di CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$  tra i TI prodotti mediante i metodi forniti qui, come esemplificato per esempio nella figura 27, e/o i TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, della popolazione dei TIL raccolta, e/o della popolazione terapeutica dei TIL sulla base dell'espressione di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$  durante qualsiasi dei passaggi, compresi quelli discussi sopra o come forniti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL sulla base di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$ . In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della seconda popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$ . In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della terza popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$ . In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$ . In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della popolazione terapeutica dei TIL sulla base dell'espressione di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$ .

In certi esempi, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, o della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$  durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (f)

del metodo per espandere i linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un paziente mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio

(c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema.

In certi esempi, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, o della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD4, CD8, e/o NK, TCR $\alpha\beta$  durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (h) del metodo per il trattamento di un soggetto con cancro, il metodo comprendendo la somministrazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) espansi comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

- (b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;
- (c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;
- (d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;
- (e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e
- (f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema;
- (g) il crioconservare facoltativamente la sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione; e
- (h) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL dalla sacca per infusione nel passaggio (g) al paziente.

In alcune forme di realizzazione, il marcatore della memoria viene scelto nel gruppo composto da CCR-7 e CD62L.

In alcune forme di realizzazione, la vitalità dei TIL freschi rispetto ai TIL scongelati è di almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, o almeno il 98%. In alcune forme di realizzazione, la vitalità di entrambi i TIL freschi e scongelati è maggiore del 70%, maggiore del 75%, maggiore dell'80%, maggiore dell'85%, maggiore del 90%, maggiore del 95%, o maggiore del 98%. In alcune forme di realizzazione, la vitalità di entrambi il prodotto fresco e scongelato è maggiore dell'80%, maggiore dell'81%, maggiore dell'82%, maggiore dell'83%, maggiore dell'84%, maggiore dell'85%, maggiore dell'86%, maggiore dell'87%, maggiore dell'88%, maggiore dell'89%, o

maggiore del 90%. In alcune forme di realizzazione, la vitalità di entrambi il prodotto fresco e scongelato è maggiore dell'86%.

In una forma di realizzazione, i TIL ristimolati possono essere valutati anche per il rilascio di citochine, utilizzando saggi del rilascio di citochine.

In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere valutati per la secrezione di interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in risposta alla stimolazione con OKT3 o con la co-coltura con un digerito tumorale autologo. Per esempio, in forme di realizzazione che impiegano la stimolazione con OKT3, i TIL vengono lavati abbondantemente, e vengono preparati pozzetti in duplicato con  $1 \times 10^5$  cellule in 0,2 ml di CM in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto prerivestite con 0,1 o 1,0  $\mu\text{g/ml}$  di OKT3 diluito in soluzione salina tamponata con fosfato. Dopo l'incubazione per una notte, i surnatanti vengono raccolti e l'IFN- $\gamma$  nel surnatante viene misurato mediante ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, Massachusetts). Per il saggio di co-coltura,  $1 \times 10^5$  cellule TIL vengono poste in una piastra da 96 pozzetti con cellule tumorali autologhe (rapporto 1:1). Dopo un'incubazione di 24 ore, surnatanti vengono raccolti e il rilascio di IFN- $\gamma$  può essere quantificato, per esempio mediante ELISA.

Analisi in citometria a flusso di biomarcatori della superficie cellulare: i campioni dei TIL sono stati suddivisi in aliquote per l'analisi in citometria a flusso di marcatori della superficie cellulare si veda, per l'esempio si vedano gli esempi 7, 8 e 9.

In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono valutati per vari regolatore marcatori. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore viene scelto nel gruppo composto da TCR  $\alpha/\beta$ , CD56, CD27, CD28, CD57, CD45RA, CD45RO, CD25, CD127, CD95, IL-2R-, CCR-7, CD62L, KLRG1, e CD122. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è TCR  $\alpha/\beta$ . In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD56. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD27. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD28. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD57. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD45RA. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD45RO. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD25. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD127. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD95. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è IL-2R-. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CCR-7. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD62L. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è KLRG1. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore è CD122.

In una forma di realizzazione, i TIL espansi vengono analizzati per l'espressione di numerosi marcatori del fenotipo, compresi quelli descritti qui e negli esempi. In una forma di realizzazione, l'espressione di uno o più marcatori fenotipici viene esaminata. In alcune forme di realizzazione, il marcatore viene scelto nel gruppo composto da TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ ), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR-7, CD4, CD3, CD38, e HLA-DR. In alcune forme di realizzazione, il marcatore viene scelto nel gruppo composto da TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ ), CD57, CD28,

CD4, CD27, CD56, e CD8a. In una forma di realizzazione, il marcatore viene scelto nel gruppo composto da CD45RA, CD8a, CCR-7, CD4, CD3, CD38, e HLA-DR. In alcune forme di realizzazione, l'espressione di uno, due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, o quattordici marcatori è esaminato. In alcune forme di realizzazione, l'espressione da uno o più marcatori da ciascun gruppo è esaminato. In alcune forme di realizzazione, una o più tra l'espressione di HLA-DR, CD38, e CD69 è mantenuta (cioè non mostra una differenza statisticamente significativa) nei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati. In alcune forme di realizzazione, lo stato di attivazione dei TIL è mantenuto nei TIL scongelati.

In una forma di realizzazione, l'espressione di uno o più marcatori regolatori viene misurata. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore viene scelto nel gruppo composto da CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, e CD154. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore viene scelto nel gruppo composto da CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, e TIM-3. In alcune forme di realizzazione, il marcatore regolatore viene scelto nel gruppo composto da CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, e CD154. In alcune forme di realizzazione, l'espressione di molecole regolatrici è diminuita nei TIL scongelati in confronto ai TIL freschi. In alcune forme di realizzazione, l'espressione delle molecole regolatrici LAG-3 e TIM-3 è diminuita nei TIL scongelati in confronto ai TIL freschi. In alcune forme di realizzazione, non vi è alcuna differenza significativa nell'espressione di CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ . In alcune forme di realizzazione, non vi è alcuna differenza significativa nell'espressione di CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ , e/o di marcatori di memoria nei TIL freschi in confronto ai TIL scongelati.

In alcune forme di realizzazione, il marcatore della memoria viene scelto nel gruppo composto da CCR-7 e CD62L.

In alcune forme di realizzazione, la vitalità dei TIL freschi rispetto ai TIL scongelati è almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, o almeno il 98%. In alcune forme di realizzazione, la vitalità di entrambi i TIL freschi e scongelati è maggiore del 70%, maggiore del 75%, maggiore dell'80%, maggiore dell'85%, maggiore del 90%, maggiore del 95%, o maggiore del 98%. In alcune forme di realizzazione, la vitalità di entrambi il prodotto fresco e scongelato è maggiore dell'80%, maggiore dell'81%, maggiore dell'82%, maggiore dell'83%, maggiore dell'84%, maggiore dell'85%, maggiore dell'86%, maggiore dell'87%, maggiore dell'88%, maggiore dell'89%, o maggiore del 90%. In alcune forme di realizzazione, la vitalità di entrambi il prodotto fresco e scongelato è maggiore dell'86%.

In una forma di realizzazione, i TIL ristimolati possono essere valutati anche per il rilascio di citochine, utilizzando saggi del rilascio di citochine.

In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere valutati per la secrezione di interferone 7 (IFN-7) in risposta alla stimolazione con OKT3 o con la co-cultura con un digerito tumorale autologo. Per esempio, in forme di realizzazione che impiegano la stimolazione con OKT3, i TIL vengono lavati abbondantemente, e vengono preparati pozzetti in duplicato con  $1 \times 10^5$  cellule in 0,2 ml di CM in piastre da 96 pozzetti a fondo

piatto prerivestite con 0,1 o 1,0 µg/ml di OKT3 diluito in soluzione salina tamponata con fosfato. Dopo l'incubazione per una notte, i surnatanti vengono raccolti e l'IFN-7 nel surnatante viene misurato mediante ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, Massachusetts). Per il saggio di co-coltura,  $1 \times 10^5$  cellule TIL vengono poste in una piastra da 96 pozzetti con cellule tumorali autologhe (rapporto 1:1). Dopo un'incubazione di 24 ore, surnatanti vengono raccolti e il rilascio di IFN-7 può essere quantificato, per esempio mediante ELISA.

In alcune forme di realizzazione, la caratterizzazione fenotipica viene esaminata dopo la crioconservazione.

#### **J. Salute metabolica dei TIL espansi**

I TIL ristimolati si caratterizzano per un significativo potenziamento della glicolisi basale in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL dopo lo scongelamento. In una forma di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, della popolazione dei TIL raccolta, e/o della popolazione terapeutica dei TIL sulla base dell'espressione di CD8 durante qualsiasi dei passaggi, compresi quelli discussi sopra o come forniti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della seconda popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della terza popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della popolazione terapeutica dei TIL sulla base dell'espressione di CD8.

In un esempio, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, o della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD8 durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (f) del metodo per espandere i linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendente:

- (a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un paziente mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;
- (b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;
- (c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c)

avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio

(c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema.

In un esempio, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, o della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD8 durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (h) del metodo per il trattamento di un soggetto con cancro, il metodo comprendendo la somministrazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) espansi comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata

sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema;

(g) il crioconservare facoltativamente la sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione; e

(h) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL dalla sacca per infusione nel passaggio (g) al paziente.

I TIL preparati mediante i metodi descritti qui si caratterizzano per un significativo potenziamento della glicolisi basale in confronto a, per esempio, i TIL raccolti di fresco e/o i TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In una forma di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, della popolazione dei TIL raccolta, e/o della popolazione terapeutica dei TIL sulla base dell'espressione di CD8 durante qualsiasi dei passaggi, compresi quelli discussi sopra o come forniti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della seconda popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della terza popolazione dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In alcune forme di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della popolazione terapeutica dei TIL sulla base dell'espressione di CD8. In una forma di realizzazione, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, o della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD8 durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (h).

La capacità respiratoria residua (SRC) e la riserva glicolitica possono essere valutate per i TIL espansi con metodi differenti della presente descrizione. La prova da stress cellulare dei mitocondri Seahorse XF misura la funzione mitocondriale misurando direttamente il tasso di consumo dell'ossigeno (OCR) delle cellule, utilizzando modulatori della respirazione che prendono come bersaglio componenti della catena di trasporto

degli elettroni nei mitocondri. I composti in esame (oligomicina, FCCP, e una miscela di rotenone ed antimicina A, descritta sotto) sono iniettati in serie per misurare la produzione di ATP, la respirazione massimale, e la respirazione non mitocondriale, rispettivamente. La perdita protonica e la capacità respiratoria residua vengono quindi calcolate utilizzando questi parametri e la respirazione basale. Ciascun modulatore prende come bersaglio un componente specifico della catena di trasporto degli elettroni. L'oligomicina inibisce l'ATP sintasi (complesso V) e la diminuzione dell'OCR dopo l'iniezione di oligomicina correla con la respirazione mitocondriale associata alla produzione cellulare di ATP. Il carbonil cianuro-4 (trifluorometossi)fenilidrazone (FCCP) è un agente di disaccoppiamento che fa collassare il gradiente protonico e altera il potenziale della membrana mitocondriale. Di conseguenza, il flusso di elettroni attraverso la catena del trasporto di elettroni non viene inibito e l'ossigeno viene consumato in modo massimale dal complesso IV. L'OCR stimolato mediante FCCP può essere quindi utilizzato per calcolare la capacità respiratoria residua, definita come la differenza tra respirazione massimale e respirazione basale. La capacità respiratoria residua (SRC) è una misura della capacità della cellula di rispondere ad una domanda aumentata di energia. La terza iniezione è una miscela di rotenone, un inibitore del complesso I, ed antimicina A, un inibitore del complesso III. Questa combinazione arresta la respirazione mitocondriale e permette il calcolo della respirazione non mitocondriale guidata da processi all'esterno dei mitocondri. In alcune forme di realizzazione, il confronto è con, per esempio, i TIL raccolti di fresco e/o i TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, il saggio metabolico è della respirazione basale. In generale, i TIL con una seconda espansione hanno un tasso di respirazione basale che è almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 97%, almeno il 98%, o almeno il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il tasso di respirazione basale è da circa il 50% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il tasso di respirazione basale è da circa il 60% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il tasso di respirazione basale è da circa il 70% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il tasso di respirazione basale è da circa l'80% a circa il 99% del

tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il tasso di respirazione basale è da circa il 90% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il tasso di respirazione basale è da circa il 95% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un tasso di respirazione basale che non è statisticamente significativamente differente rispetto al tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il confronto è con, per esempio, i TIL raccolti di fresco e/o i TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, il saggio metabolico è della capacità respiratoria residua. In generale, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno una capacità respiratoria residua che è almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 97%, almeno il 98%, o almeno il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la capacità respiratoria residua è da circa il 50% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco. In alcune forme di realizzazione, la capacità respiratoria residua è da circa il 50% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la capacità respiratoria residua è da circa il 60% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la capacità respiratoria residua è da circa il 70% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la capacità respiratoria residua è da circa l'80% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco. In alcune forme di realizzazione, la capacità

respiratoria residua è da circa il 90% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la capacità respiratoria residua è da circa il 95% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno una capacità respiratoria residua che non è statisticamente significativamente differente rispetto al tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In generale, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno una capacità respiratoria residua che è almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 97%, almeno il 98%, o almeno il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, il saggio metabolico misurato è della riserva glicolitica. In alcune forme di realizzazione, il saggio metabolico è della capacità respiratoria residua. Per misurare il metabolismo cellulare (respiratorio), le cellule sono state trattate con inibitori della respirazione mitocondriale e della glicolisi per determinare un profilo metabolico per i TIL consistente delle seguenti misure: fosforilazione ossidativa basale (misurata mediante OCR), capacità respiratoria residua, attività glicolitica basale (misurata mediante ECAR), e riserva glicolitica. I profili metabolici sono stati eseguiti utilizzando il saggio combinato Seahorse della prova da stress mitocondriale e della glicolisi (compreso il kit disponibile in commercio da Agilent®), che permette di determinare la capacità delle cellule di eseguire la glicolisi a seguito del blocco della produzione mitocondriale di ATP. In alcune forme di realizzazione, le cellule sono messe a digiuno di glucosio, quindi viene iniettato glucosio, cui segue un agente stressante. In alcune forme di realizzazione, l'agente stressante viene scelto nel gruppo composto da oligomicina, FCCP, rotenone, antimicina A e/o 2-deossiglucosio (2-DG), così come loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, l'oligomicina viene aggiunta a 10mM. In alcune forme di realizzazione, l'FCCP viene aggiunto a 10mM. In alcune forme di realizzazione, il rotenone viene aggiunto a 2,5mM. In alcune forme di realizzazione, l'antimicina viene aggiunta a 2,5mM. In alcune forme di realizzazione, il 2-deossiglucosio (2-DG) viene aggiunto a 500mM. In alcune forme di realizzazione, vengono misurate la capacità glicolitica, la riserva glicolitica, e/o l'acidificazione non glicolitica. In generale, i TIL hanno una riserva glicolitica che è almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il

60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 97%, almeno il 98%, o almeno il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 50% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 60% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 70% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa l'80% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 90% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 95% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, il saggio metabolico è della glicolisi basale. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un aumento della glicolisi basale di almeno due volte, almeno tre volte, almeno quattro volte, almeno cinque volte, almeno sei volte, almeno sette volte, almeno otto volte, almeno nove volte, o almeno dieci volte in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un aumento della glicolisi basale da circa due volte a circa dieci volte in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un aumento della glicolisi

basale da circa due volte a circa otto volte in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un aumento della glicolisi basale da circa tre volte a circa sette volte in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un aumento della glicolisi basale da circa due volte a circa quattro volte in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un aumento della glicolisi basale da circa due volte a circa tre volte in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In generale, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno una riserva glicolitica che è almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 97%, almeno il 98%, o almeno il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 50% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 60% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 70% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa l'80% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 90% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco e/o dei TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui,

compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la riserva glicolitica è da circa il 95% a circa il 99% del tasso di respirazione basale dei TIL raccolti di fresco.

Produzione di granzima B: il granzima B è un'altra misura della capacità dei TIL di uccidere le cellule bersaglio. I surnatanti dei mezzi ristimolati come descritto sopra utilizzando anticorpi contro CD3, CD28, e CD137/4-1BB sono stati valutati anche per i loro livelli di granzima B utilizzando il kit ELISA DuoSet per il granzima B umano (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota) secondo le istruzioni del produttore. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno una produzione aumentata di granzima B. In alcune forme di realizzazione, i TIL con una seconda espansione o i TIL con un'ulteriore seconda espansione (quali, per esempio, quelli descritti nel passaggio D della figura 27, compresi i TIL indicati come TIL re-REP) hanno un'attività citotossica aumentata.

In alcune forme di realizzazione, la lunghezza dei telomeri può essere utilizzata come misura della vitalità cellulare e/o della funzione cellulare. In alcune forme di realizzazione, i telomeri sono sorprendentemente della stessa lunghezza nei TI prodotti mediante la presente invenzione in confronto ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. Misurazione della lunghezza dei telomeri: diversi metodi sono stati utilizzati per misurare la lunghezza di telomeri nel DNA genomico e in preparazioni citologiche. L'analisi dei frammenti di restrizione terminali dei telomeri (TRF) è lo standard elettivo per misurare la lunghezza dei telomeri (de Lange et al., 1990). Tuttavia, la limitazione principale della TRF è il requisito di una quantità elevata di DNA (1,5  $\mu$ g). Due tecniche ampiamente utilizzate per la misurazione delle lunghezze dei telomeri e precisamente, l'ibridazione fluorescente in situ (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, California) e la PCR quantitativa possono essere impiegate con la presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, non vi è alcuna variazione nella lunghezza dei telomeri tra i TIL inizialmente raccolti nel passaggio A e i TIL espansi da, per esempio, i passaggio D come fornito nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, la salute dei TIL viene misurata mediante la secrezione di IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ). In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è indicativa di TIL attivi. In alcune forme di realizzazione, viene impiegato un saggio d'efficacia per la produzione di IFN- $\gamma$ . La produzione di IFN- $\gamma$  è un'altra misura del potenziale citotossico. La produzione di IFN- $\gamma$  può essere misurata determinando i livelli della citochina IFN- $\gamma$  nei mezzi dei TIL stimolati con anticorpi contro CD3, CD28, e CD137/4-1BB. I livelli di IFN- $\gamma$  nei mezzi da questi TIL stimolati possono essere determinati utilizzando la misurazione del rilascio di IFN- $\gamma$ . In alcune forme di realizzazione, un aumento nella produzione di IFN- $\gamma$ , per esempio, nei TIL del passaggio D come fornito nella figura 27 in confronto ai TIL inizialmente raccolti per esempio nel passaggio A come

fornito nella figura 27 è indicativo di un aumento del potenziale citotossico dei TIL del passaggio D. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di una volta, due volte, tre volte, quattro volte, o cinque volte o più. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di una volta. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di due volte. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di tre volte. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di quattro volte. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di cinque volte. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato utilizzando un kit ELISA Quantikine. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nei TIL *ex vivo*. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nei TIL *ex vivo*, compresi i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione, compresi per esempio i metodi della figura 27, così come i TIL raccolti di fresco o quei TI prodotti mediante altri metodi, quali quelli forniti per esempio nella figura 83 (quali per esempio i TIL del procedimento 1C).

In alcune forme di realizzazione, il potenziale citotossico dei TIL di lisare cellule bersaglio è stato valutato utilizzando un saggio di co-cultura dei TIL con la linea cellulare bioluminescente, P815 (clone G6), secondo un saggio bioluminescente di lisi reindirizzata (saggio d'efficacia) per il saggio dei TIL che misura la citotossicità dei TIL in un modo altamente sensibile dipendente dalla dose.

In alcune forme di realizzazione, i presenti metodi forniscono un saggio per valutare la vitalità dei TIL, utilizzando i metodi descritti sopra. In alcune forme di realizzazione, i TIL sono espansi come discusso sopra, compreso per esempio come fornito nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono crioconservati prima di essere valutati per la vitalità. In alcune forme di realizzazione, la valutazione della vitalità comprende lo scongelamento dei TIL prima di eseguire una prima espansione, una seconda espansione, e un'ulteriore seconda espansione. In alcune forme di realizzazione, i presenti metodi forniscono un saggio per valutare la proliferazione cellulare, la tossicità cellulare, la morte cellulare, e/o altri termini in relazione alla vitalità della popolazione dei TIL. La vitalità può essere misurata mediante qualsiasi dei saggi metabolici dei TIL descritti sopra così come qualsiasi dei metodi noti per valutare la vitalità cellulare che sono noti nell'arte. In alcune forme di realizzazione, i presenti metodi forniscono un saggio per la valutazione della proliferazione cellulare, della tossicità cellulare, della morte cellulare, e/o di altri termini in relazione alla vitalità dei TIL espansi utilizzando i metodi descritti qui, compresi quelli esemplificati nella figura 27.

Qui vengono inoltre descritti ma non rivendicati metodi di saggio per determinare la vitalità dei TIL. In alcune forme di realizzazione, i TIL hanno uguale vitalità in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL hanno una vitalità aumentata in confronto ai TIL raccolti di fresco e/o ai TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli

rappresentati nella figura 27. La presente descrizione fornisce metodi per saggiare i TIL per la vitalità mediante l'espansione dei linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione di TIL più grande comprendenti:

(i) l'ottenere una prima popolazione di TIL che è stata precedentemente espansa;

(ii) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL; e

(iii) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è almeno 100 volte maggiore nel numero rispetto alla seconda popolazione dei TIL, e in cui la seconda espansione viene eseguita per almeno 14 giorni allo scopo di ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, e in cui la terza popolazione viene ulteriormente saggiata per la vitalità.

Il metodo può comprendere inoltre:

(iv) l'eseguire un'ulteriore seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della terza popolazione dei TIL con ulteriore IL-2, ulteriore OKT-3, e ulteriori APC, in cui l'ulteriore seconda espansione viene eseguita per almeno 14 giorni per ottenere una popolazione di TIL più grande rispetto a quella ottenuta nel passaggio (iii), in cui la popolazione dei TIL più grande comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale in relazione alla terza popolazione dei TIL, e in cui la terza popolazione viene ulteriormente saggiata per la vitalità.

Prima del passaggio (i), le cellule possono essere crioconservate.

Le cellule possono essere scongelate prima di eseguire i passaggi (i).

Il passaggio (iv) può essere ripetuto da una a quattro volte allo scopo di ottenere TIL sufficienti per l'analisi.

I passaggi da (i) a (iii) o (iv) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 40 giorni a circa 50 giorni.

I passaggi da (i) a (iii) o (iv) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 42 giorni a circa 48 giorni.

I passaggi da (i) a (iii) o (iv) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 42 giorni a circa 45 giorni.

I passaggi da (i) a (iii) o (iv) possono essere eseguiti entro circa 44 giorni.

Le cellule dai passaggi (iii) o (iv) possono esprimere CD4, CD8, e TCR  $\alpha\beta$  a livelli simili alle cellule raccolte di fresco.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC).

Le PBMC possono essere aggiunte alla coltura cellulare a qualsiasi dei giorni da 9 a 17 nel passaggio (iii).

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale nella popolazione dei TIL più grande nel passaggio (iv) possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27, espressione di CD28, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56, rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale nella terza popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56.

Le APC possono essere APC artificiali (aAPC).

Il metodo può ulteriormente comprendere il passaggio della trasduzione della prima popolazione dei TIL con un vettore di espressione comprendente un acido nucleico codificante un recettore dei linfociti T ad affinità elevata.

Il passaggio di trasduzione può avvenire prima del passaggio (i).

Il metodo può comprendere inoltre il passaggio della trasduzione della prima popolazione dei TIL con un vettore di espressione comprendente un acido nucleico codificante un recettore chimerico per l'antigene (CAR) comprendente un frammento anticorpale variabile a catena singola fuso con almeno un endodominio di una molecola segnale dei linfociti T.

Il passaggio di trasduzione può avvenire prima del passaggio (i).

I TIL possono essere testati per la vitalità.

I TIL possono essere testati per la vitalità dopo la crioconservazione.

I TIL possono essere testati per la vitalità dopo la crioconservazione e dopo il passaggio (iv).

I diversi recettori antigenici dei linfociti T e B vengono prodotti mediante ricombinazione somatica di un numero limitato ma elevato di segmenti genici. Questi segmenti genici: V (variabile), D (di diversità), J (di legame), e C (costante), determinano la specificità di legame e le applicazioni a valle di immunoglobuline e recettori dei linfociti T (TCR). La presente invenzione fornisce un metodo per generare TIL che mostrano e incrementano la diversità del repertorio dei linfociti T (qualche volta indicata come policlonalità). In alcune forme di realizzazione, l'aumento della diversità del repertorio dei linfociti T viene confrontato con i TIL raccolti di fresco e/o i TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti nella prima espansione mostrano un aumento nella diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, l'aumento di diversità è un aumento

nella diversità delle immunoglobuline e/o nella diversità dei recettori dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, la diversità nell'immunoglobulina è nella catena pesante dell'immunoglobulina. In alcune forme di realizzazione, la diversità nell'immunoglobulina è nella catena leggera dell'immunoglobulina. In alcune forme di realizzazione, la diversità è nel recettore dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, la diversità è in uno dei recettori dei linfociti T scelto nel gruppo composto dai recettori alfa, beta, gamma, e delta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) alfa e/o beta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) alfa. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione del recettore dei linfociti T (TCR) beta. In alcune forme di realizzazione, vi è un aumento nell'espressione di TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ ).

Secondo la presente descrizione, viene qui fornito un metodo per saggiare i TIL per la vitalità e/o per il loro ulteriore uso nella somministrazione a un soggetto. Il metodo per saggiare linfociti infiltranti il tumore (TIL) può comprendere:

- (i) l'ottenere una prima popolazione di TIL;
- (ii) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL; e
- (iii) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla seconda popolazione dei TIL;
- (iv) la raccolta, il lavaggio, e la crioconservazione della terza popolazione dei TIL;
- (v) la conservazione dei TIL crioconservati ad una temperatura criogenica;
- (vi) lo scongelamento della terza popolazione dei TIL per fornire una terza popolazione di TIL scongelata; e
- (vii) l'eseguire un'ulteriore seconda espansione di una porzione della terza popolazione dei TIL scongelata integrando il terreno di coltura cellulare della terza popolazione con IL-2, OKT-3, e APC per un ulteriore periodo di espansione (qualche volta indicato come periodo re-REP) di almeno 3 giorni, in cui la terza espansione viene eseguita per ottenere una quarta popolazione di TIL, in cui il numero dei TIL nella quarta popolazione dei TIL viene confrontato con il numero dei TIL nella terza popolazione dei TIL per ottenere un rapporto;
- (viii) il determinare sulla base del rapporto nel passaggio (vii) se la popolazione dei TIL scongelata è adatta per la somministrazione a un paziente;
- (ix) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL scongelata al paziente quando il rapporto tra il numero dei TIL nella quarta popolazione dei TIL e il numero dei TIL nella terza popolazione dei TIL viene determinato essere maggiore di 5:1 nel

passaggio (viii).

L'ulteriore periodo di espansione (qualche volta indicato come periodo re-REP) può essere eseguito fino a che il rapporto tra il numero dei TIL nella quarta popolazione dei TIL e il numero dei TIL nella terza popolazione dei TIL è superiore a 50:1.

Il numero di TIL sufficiente per un dosaggio terapeuticamente efficace può essere da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

I passaggi da (i) a (vii) vengono eseguiti entro un periodo da circa 40 giorni a circa 50 giorni. I passaggi da (i) a (vii) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 42 giorni a circa 48 giorni. I passaggi da (i) a (vii) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 42 giorni a circa 45 giorni. I passaggi da (i) a (vii) possono essere eseguiti entro circa 44 giorni.

Le cellule dai passaggi (iii) o (vii) possono esprimere CD4, CD8, e TCR  $\alpha \beta$  a livelli simili alle cellule raccolte di fresco. Le cellule possono essere TIL.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Le PBMC possono essere aggiunte alla coltura cellulare a qualsiasi dei giorni da 9 a 17 nel passaggio (iii).

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale nella popolazione dei TIL più grande nei passaggi (iii) o (vii) possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27, espressione di CD28, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56, rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale nella terza popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56.

Le APC possono essere APC artificiali (aAPC).

Il passaggio della trasduzione della prima popolazione dei TIL con un vettore di espressione può comprendere un acido nucleico codificante un recettore dei linfociti T ad affinità elevata.

Il passaggio di trasduzione può avvenire prima del passaggio (i).

Il passaggio della trasduzione della prima popolazione dei TIL con un vettore di espressione può comprendere un acido nucleico codificante un recettore chimerico per l'antigene (CAR) comprendente un frammento anticorpale variabile a catena singola fuso con almeno un endodominio di una molecola segnale dei linfociti T.

Il passaggio di trasduzione può avvenire prima del passaggio (i).

I TIL possono essere testati per la vitalità dopo i passaggio (vii).

La presente descrizione fornisce anche ulteriori metodi per saggiare i TIL. La descrizione può fornire un metodo per saggiare i TIL comprendente:

- (i) l'ottenere una porzione di una prima popolazione di TIL crioconservati;
- (ii) lo scongelamento della porzione della prima popolazione di TIL crioconservati;
- (iii) l'eseguire una prima espansione coltivando la porzione della prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC) per un ulteriore periodo di espansione (qualche volta indicato come periodo re-REP) di almeno 3 giorni, per produrre una seconda popolazione di TIL, in cui la porzione dalla prima popolazione dei TIL viene confrontata con la seconda popolazione dei TIL per ottenere un rapporto del numero dei TIL, in cui il rapporto tra il numero dei TIL nella seconda popolazione dei TIL e il numero dei TIL nella porzione della prima popolazione dei TIL è superiore a 5:1;
- (iv) il determinare sulla base del rapporto nel passaggio (iii) se la prima popolazione dei TIL è adatta per l'uso nella somministrazione terapeutica a un paziente;
- (v) il determinare che la prima popolazione dei TIL è adatta per l'uso nella somministrazione terapeutica quando il rapporto tra il numero dei TIL nella seconda popolazione dei TIL e il numero dei TIL nella prima popolazione dei TIL viene determinato essere maggiore di 5:1 nel passaggio (iv).

Il rapporto tra il numero dei TIL nella seconda popolazione dei TIL e il numero dei TIL nella porzione della prima popolazione dei TIL può essere maggiore di 50:1.

Il metodo può comprendere inoltre l'eseguire l'espansione dell'intera prima popolazione di TIL crioconservati dal passaggio (i) secondo i metodi descritti in qualsiasi delle forme di realizzazione fornite qui.

Il metodo può comprendere inoltre la somministrazione dell'intera prima popolazione di TIL crioconservati dal passaggio (i) al paziente.

#### **K. Sistemi chiusi per la produzione dei TIL**

La presente invenzione fornisce l'uso di sistemi chiusi durante il procedimento di coltura dei TIL. Tali sistemi chiusi permettono di prevenire e/o ridurre la contaminazione microbica, permettono l'uso di meno palloni, e permettono riduzioni dei costi. In alcune forme di realizzazione, il sistema chiuso utilizza due contenitori.

Tali sistemi chiusi sono ben noti nell'arte e si possono trovare, per esempio, su <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> e <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>.

Come fornito sul sito web dell'FDA, i sistemi chiusi con metodi sterili sono noti e ben descritti. Si veda

<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>, come riferito sopra e fornito nella parte pertinente sotto.

## Introduzione

I dispositivi di connessione sterile (STCD) producono saldature sterili tra due pezzi di tubi compatibili. Questa procedura permette la connessione sterile di una varietà di contenitori e diametri di tubi. Queste indicazioni descrivono pratiche e procedure raccomandate per l'uso di questi dispositivi. Queste indicazioni non affrontano i dati o le informazioni che un produttore di un dispositivo di connessione sterile deve sottoporre all'FDA allo scopo di ottenere l'approvazione l'autorizzazione per il mercato. È anche importante notare che l'uso di un dispositivo di connessione sterile approvato o autorizzato per scopi non autorizzati nell'etichetta può far sì che il dispositivo sia considerato adulterato ed etichettato in modo irregolare secondo l'Atto federale sugli alimenti, i farmaci e i cosmetici.

### 1. Raccomandazioni dell'FDA

I produttori di prodotti ematici che propongono di utilizzare ordinariamente un STCD autorizzato dall'FDA dovrebbero incorporare informazioni riguardanti tale uso nei manuali delle procedure operative standard (SOP) per ciascun prodotto ematico. Queste voci dovrebbero includere la conservazione dei dati, il tracciamento dei prodotti, il controllo di qualità delle saldature dei tubi, i numeri di lotto del programma e il materiale monouso (compresa/e la/e fonte/i degli elementi da aggiungere). Il controllo delle procedure di qualità dovrebbe includere una prova dell'integrità di ciascuna saldatura.

### 2. Applicazioni dell'STCD

L'utilizzatore dovrebbe essere consapevole che l'uso del dispositivo può creare un nuovo prodotto o modificare significativamente la configurazione di un prodotto regolamentato per cui la sicurezza e l'efficacia non sono state dimostrate. Per quei "nuovi prodotti" soggetti a licenza, devono essere sottoposte/i domande, o supplementi di domanda all'FDA oltre alla sottomissione di una SOP. In generale, il raggruppamento o la miscela che implica componenti cellulari rappresenta una modifica nel prodotto che richiede la sottomissione e l'approvazione di una domanda di licenza o di un supplemento di domanda. Tali domande e supplementi di domanda dovrebbero contenere dati e descrizioni di procedure di produzione che dimostrano che il "nuovo prodotto" è sicuro ed efficace per il suo uso desiderato in ogni parte del periodo di datazione proposto.

I seguenti commenti vengono forniti come indicazioni sugli usi più comuni di un STCD autorizzato o approvato dall'FDA:

#### **L. Aggiunta di un ago nuovo o più piccolo a un apparecchio per il prelievo del sangue**

L'uso dell'STCD per aggiungere un ago prima dell'inizio di una procedura (prelievo di sangue intero, piastrinoferesi o raccolta del plasma

originale) non è considerato aprire un sistema funzionalmente chiuso. Se un ago viene aggiunto durante una procedura, dovrebbe essere utilizzato solo un STCD approvato per saldare tubi riempiti di liquido. Se la prova di integrità della saldatura è soddisfacente, l'uso di un STCD non è considerato aprire un sistema funzionalmente chiuso.

La piastrinoferesi preparata in un sistema aperto dovrebbe essere etichettata con una data di scadenza di 24 ore e i prodotti della piastrinoferesi preparati in un sistema funzionalmente chiuso dovrebbero essere etichettati con una data di scadenza di cinque giorni (si vedano le Linee guida rivedute per la raccolta della piastrinoferesi, 7 ottobre 1988).

La fonte e le specificazioni dei tubi e degli aghi aggiunti dovrebbero essere trattate nelle SOP e nei registri del centro trasfusionale. L'uso dell'STCD per aggiungere aghi non rappresenta un cambiamento importante nella produzione per cui gli stabilimenti autorizzati necessitano una preapprovazione.

#### M. Uso dell'STCD per preparare componenti

Quando l'STCD viene utilizzato per connettere ulteriori sacche per la preparazione dei componenti, dovrebbero essere propriamente mantenuti dei registri che identifichino la fonte delle sacche da trasferimento e l'appropriata verifica del numero di unità di sangue e dell'ABO/Rh. Tutto il sangue e i componenti ematici devono essere etichettati in modo appropriato (CFR 21 606,121).

Esempi:

- Aggiunta di una quarta sacca ad un sistema a tre sacche per il prelievo di sangue intero per la produzione di AHF crioprecipitato da plasma fresco congelato.
- Connessione di una soluzione additiva ad un'unità per i globuli rossi.
- Aggiunta di un filtro in linea che è stato approvato dall'FDA per l'uso nella produzione di componenti.
- Aggiunta di un terzo contenitore per la conservazione ad un impianto per la piastrinoferesi.
- Per i suddetti usi specificati, dovrebbero essere sviluppate procedure e mantenuti registri, ma i titolari di licenza non hanno bisogno dell'approvazione dell'FDA per avviare le procedure.

#### 1. Uso dell'STCD per raggruppare prodotti ematici

L'uso appropriato di un STCD per raggruppare piastrine preparate dalla raccolta di sangue intero può ovviare alla potenziale contaminazione dalle entrate di iniezione e dei portelli comunemente utilizzate. Il raggruppamento eseguito immediatamente prima della trasfusione è un esempio di tale uso appropriato. Le piastrine raggruppate dovrebbero essere somministrate non più di 4 ore dopo il raggruppamento (si veda CFR 21

606,122(1)(2)).

Tuttavia, il raggruppamento e il successivo immagazzinamento possono incrementare il rischio in confronto alla somministrazione di unità donatrici casuali; se un'unità contaminata viene raggruppata con altre e conservata prima della somministrazione, l'inoculo batterico totale somministrato può essere aumentato come risultato della replicazione nel volume supplementare. Conseguentemente, l'uso proposto di un STCD per raggruppare e conservare piastrine per più di 4 ore dovrebbe essere supportato da dati che stabiliscano in modo soddisfacente se tale raggruppamento è associato ad un rischio aumentato.

Tale raggruppamento di piastrine costituisce la produzione di un nuovo prodotto.

Il raggruppamento o la miscelazione che implica piastrine è considerato/a produzione di un nuovo prodotto che richiede la sottomissione e l'approvazione di una domanda di licenza o di un supplemento di domanda se il periodo di immagazzinamento deve superare le quattro ore.

## **2. Uso dell'STCD per preparare un'aliquota per uso pediatrico e unità divise**

Le unità pediatriche e le unità divise per sangue intero, globuli rossi, e plasma congelato di fresco preparate utilizzando un STCD non saranno considerate un nuovo prodotto per cui non è richiesto un supplemento alla domanda di licenza per sostanze biologiche (BLA), purché le seguenti condizioni siano soddisfatte:

il produttore dovrebbe avere una licenza per le sostanze biologiche o un supplemento di licenza approvata/o, per il prodotto originale (cioè non diviso), comprendente l'approvazione per ciascun anticoagulante utilizzato.

Le etichette dovrebbero essere sottoposte alla revisione ed all'approvazione prima della distribuzione. Dovrebbe essere fatta un'annotazione sotto la sezione dei commenti del modulo dell'FDA 2567, Trasmissione delle etichette e Circolari.

Dovrebbero essere utilizzati contenitori dei prodotti finali approvati per l'immagazzinamento del componente che deve essere preparato.

Le piastrine prodotte sotto licenza devono contenere almeno  $5,5 \times (10)^{10}$  piastrine (CFR 21 640,24 (c)). La piastrinoferesi prodotta sotto licenza dovrebbe contenere almeno  $3,0 \times (10)^{11}$  piastrine (si vedano le Linee guida rivedute per la raccolta della piastrinoferesi, 7 ottobre 1988).

Le procedure da seguire riguardanti l'uso di un STCD per preparare prodotti divisi da raccolte di sangue intero e da plasma e piastrine preparate mediante procedure di emafesi automatizzate dovrebbero includere descrizioni di:

- come l'impianto di aferesi o il contenitore per la raccolta saranno modificati con un STCD autorizzato dall'FDA;
- il volume minimo del plasma separato o dei prodotti ematici interi;
- il volume e la concentrazione piastrinica dei prodotti separati della piastrinoferesi;

- il tempo di conservazione del prodotto. Il prodotto dovrebbe essere in un contenitore approvato e dovrebbe essere corrispondente al tempo di conservazione sull'etichetta di tale contenitore;
- il/i metodo/i da utilizzare per etichettare e tracciare i prodotti divisi nei registri del centro trasfusionale.

NOTE: le procedure per l'etichettatura delle aliquote dovrebbero essere chiaramente specificate nella procedura, il mantenimento dei registri dovrebbe essere adeguato per permettere il tracciamento e il rinvenimento di tutti i componenti, se necessario.

### **3. Uso di un STCD per collegare ulteriori linee di soluzione salina o di anticoagulante durante una procedura automatizzata di plasmateresi**

Dovrebbero essere sviluppate procedure e mantenuti registri conformi alle istruzioni del produttore dello strumento per uso, ma i titolari di licenza non hanno bisogno dell'approvazione dell'FDA per avviare le procedure.

### **4. Uso dell'STCD per collegare soluzioni di lavorazione**

Quando si utilizza un STCD per collegare contenitori con soluzioni di lavorazione a prodotti di globuli rossi lavati o congelati, il periodo di datazione per i prodotti risultanti è di 24 ore, a meno che i dati non vengano forniti in forma di domande di licenza o supplementi di domanda al CBER per supportare un periodo di datazione più lungo (CFR 21 610,53(c)). Esenzioni o modifiche devono essere approvate in forma scritta dal direttore, CBER (CFR 21 610,53 (d)).

### **5. Uso di un STCD per aggiungere un filtro di riduzione dei leucociti approvato dall'FDA**

Alcuni filtri di riduzione dei leucociti non sono integralmente collegati ai sistemi di raccolta del sangue intero. Le procedure per l'uso di un STCD per la filtrazione pre-immagazzinamento dovrebbero essere corrispondenti alle istruzioni d'uso dei produttori del filtro.

La riduzione dei leucociti prima del rilascio costituisce un importante cambiamento di produzione. Quindi, per nuovi prodotti ridotti nei leucociti preparati utilizzando un STCD, i produttori devono sottoporre domande di licenza per le sostanze biologiche (CFR 21 601,2) o supplementi di domanda previa approvazione all'FDA (CFR 21 601,12).

Uso di un STCD per rimuovere campioni da contenitori per prodotti ematici per la valutazione (per esempio, uso di un STCD per ottenere un campione di piastrine da un contenitore di piastrine o per la piastrinoteresi per l'agglutinazione crociata).

Se il volume e/o la conta cellulare del prodotto dopo il prelievo del campione differiscono da ciò che è specificato sull'etichetta originale o nella circolare informativa, l'etichetta sul prodotto dovrebbe essere modificata per riflettere il/la nuovo/a volume e/o conta cellulare. Per esempio, possono non essere rimossi i campioni che riducono la conta piastrinica di un'unità di piastrine a meno di  $5,5 \times (10)^{10}$  piastrine (CFR 21 640,24

(c)).

## **6. Informazioni aggiuntive dalle indicazioni dell'FDA**

Le indicazioni dell'FDA presentano indicazioni generali così come informazioni specifiche ed esempi riguardanti specificazioni per la sottomissione di domande e supplementi di domanda all'FDA indirizzati all'uso di un STCD. Se si sollevano ulteriori questioni riguardanti l'uso appropriato di un STCD, le perplessità dovrebbero essere dirette all'Ufficio per la ricerca e la rassegna del sangue, Centro per la valutazione e la ricerca di sostanze biologiche.

In alcune forme di realizzazione, il sistema chiuso utilizza un contenitore dal momento in cui i frammenti tumorali vengono ottenuti fino a quando i TIL sono pronti per la somministrazione al paziente o la crioconservazione. In alcune forme di realizzazione, quando vengono utilizzati due contenitori, il primo contenitore è un contenitore G chiuso e la popolazione dei TIL viene centrifugata e trasferita a una sacca per infusione senza aprire il primo contenitore G chiuso. In alcune forme di realizzazione, quando vengono utilizzati due contenitori, la sacca per infusione è una sacca per infusione contenente HypoThermosol. Un sistema chiuso o un sistema chiuso di coltura cellulare di TIL è caratterizzato dal fatto che una volta che il campione di tumore e/o i frammenti tumorali sono stati aggiunti, il sistema viene sigillato saldamente dall'esterno per formare un ambiente chiuso libero dall'invasione di batteri, funghi, e/o qualsiasi altra contaminazione microbica.

In alcune forme di realizzazione, la riduzione nella contaminazione microbica è circa tra il 5% e circa il 100%. In alcune forme di realizzazione, la riduzione nella contaminazione microbica è circa tra il 5% e circa il 95%. In alcune forme di realizzazione, la riduzione nella contaminazione microbica è circa tra il 5% e circa il 90%. In alcune forme di realizzazione, la riduzione nella contaminazione microbica è circa tra il 10% e circa il 90%. In alcune forme di realizzazione, la riduzione nella contaminazione microbica è circa tra il 15% e circa l'85%. In alcune forme di realizzazione, la riduzione nella contaminazione microbica è circa il 5%, circa il 10%, circa il 15%, circa il 20%, circa il 25%, circa il 30%, circa il 35%, circa il 40%, circa il 45%, circa il 50%, circa il 55%, circa il 60%, circa il 65%, circa il 70%, circa il 75%, circa l'80%, circa l'85%, circa il 90%, circa il 95%, circa il 97%, circa il 98%, circa il 99%, o circa il 100%.

Il sistema chiuso permette la crescita dei TIL in assenza e/o con una riduzione significativa nella contaminazione microbica.

Inoltre, il pH, la pressione parziale di biossido di carbonio e la pressione parziale di ossigeno dell'ambiente della coltura cellulare di TIL variano ciascuno mentre le cellule vengono messe in coltura. Conseguentemente, anche se un mezzo appropriato per la coltura cellulare viene fatto circolare, l'ambiente chiuso necessita ancora di essere costantemente mantenuto come ambiente ottimale per la proliferazione dei TIL. A questo scopo, è desiderabile che i fattori fisici di pH, pressione parziale di biossido di carbonio e pressione parziale di ossigeno all'interno del liquido di

coltura dell'ambiente chiuso vengano monitorati per mezzo di un sensore, il segnale del quale viene utilizzato per controllare uno scambiatore di gas installato all'ingresso dell'ambiente di coltura, e che la pressione parziale del gas dell'ambiente chiuso sia regolata in tempo reale secondo le variazioni nel liquido di coltura in modo tale da ottimizzare l'ambiente della coltura cellulare. In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce un sistema di coltura cellulare chiuso che incorpora all'ingresso dell'ambiente chiuso uno scambiatore di gas provvisto di un dispositivo di monitoraggio che misura il pH, la pressione parziale di biossido di carbonio e la pressione parziale di ossigeno dell'ambiente chiuso, e ottimizza l'ambiente della coltura cellulare mediante la regolazione automatica delle concentrazioni dei gas in base ai segnali dal dispositivo di monitoraggio.

In alcune forme di realizzazione, la pressione all'interno dell'ambiente chiuso è controllata in modo continuo o in modo intermittente. Vale a dire, la pressione nell'ambiente chiuso può essere variata per mezzo di un dispositivo di mantenimento della pressione, per esempio, assicurando così che lo spazio sia adatto per la crescita dei TIL in uno stato di pressione positiva, o promuovendo l'essudazione di fluido in uno stato di pressione negativa e promuovendo così la proliferazione cellulare. Applicando una pressione negativa con intermittenza, inoltre, è possibile sostituire uniformemente ed efficientemente il liquido circolante nell'ambiente chiuso per mezzo di un temporaneo restringimento del volume dell'ambiente chiuso.

In alcune forme di realizzazione, possono essere sostituiti o aggiunti componenti di coltura ottimali per la proliferazione dei TIL, e compresi fattori quali IL-2 e/o OKT3, così come la combinazione, possono essere aggiunti.

### **C. Colture cellulari**

In una forma di realizzazione, un metodo per espandere i TIL, compresi quelli discussi sopra così come esemplificati nella figura 27, può includere l'utilizzare da circa 5.000 ml a circa 25.000 ml di terreno cellulare, da circa 5.000 ml a circa 10.000 ml di terreno cellulare, o da circa 5.800 ml a circa 8.700 ml di terreno cellulare. In alcune forme di realizzazione, il mezzo è un terreno privo di siero, come descritto per esempio nell'esempio 21. In alcune forme di realizzazione, il mezzo nella prima espansione è privo di siero. In alcune forme di realizzazione, il mezzo nella seconda espansione è privo di siero. In alcune forme di realizzazione, i mezzi nella prima espansione e nella seconda sono entrambi privi di siero. In una forma di realizzazione, l'espansione del numero dei TIL utilizza non più di un tipo di terreno di coltura cellulare. Qualsiasi terreno di coltura cellulare adatto può essere utilizzato, per esempio, il terreno di coltura cellulare AIM-V (L-glutammina, streptomicina solfato 50 $\mu$ M, e gentamicina solfato 10 $\mu$ M) (Invitrogen, Carlsbad, California). A questo proposito, i metodi dell'invenzione riducono vantaggiosamente la quantità di mezzo e il numero di tipi di mezzo richiesti per espandere il numero dei TIL. In una forma di realizzazione, l'espansione del numero dei TIL può comprendere

l'alimentazione delle cellule non più frequentemente di ogni tre o quattro giorni. L'espansione del numero di cellule in un contenitore permeabile ai gas semplifica le procedure necessarie per espandere il numero di cellule riducendo la frequenza di alimentazione necessaria per espandere le cellule.

In una forma di realizzazione, il terreno cellulare nel primo e/o nel secondo contenitore permeabile ai gas è non filtrato. L'uso di terreno cellulare non filtrato può semplificare le procedure necessarie per espandere il numero di cellule. In una forma di realizzazione, il terreno cellulare nel primo e/o nel secondo contenitore permeabile ai gas è privo di beta-mercaptoetanololo (BME).

La durata del metodo comprendente l'ottenere un campione di tessuto tumorale dal mammifero; il sottoporre a coltura il campione di tessuto tumorale in un primo contenitore permeabile ai gas contenente terreno cellulare ivi; l'ottenere i TIL dal campione di tessuto tumorale; l'espandere il numero dei TIL in un secondo contenitore permeabile ai gas contenente terreno cellulare, può essere una durata da circa da 7 a 14 giorni, per esempio, circa 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, il pre-REP può essere circa da 7 a 14 giorni, per esempio, circa 11 giorni. In alcune forme di realizzazione, il REP è circa da 7 a 14 giorni, per esempio, circa 11 giorni.

In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi in contenitori permeabili ai gas. I contenitori permeabili ai gas sono stati utilizzati per espandere i TIL utilizzando le PBMC utilizzando metodi, composizioni, e dispositivi noti nell'arte, compresi quelli descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto US 2005/0106717 A1. In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi in sacche permeabili ai gas. In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi utilizzando un sistema di espansione cellulare che espande i TIL in sacche permeabili ai gas, quale il sistema di espansione Xuri Cell W25 (GE Healthcare). In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi utilizzando un sistema di espansione cellulare che espande i TIL in sacche permeabili ai gas, quale il sistema di bioreattore WAVE, noto anche come sistema di espansione Xuri Cell W5 (GE Healthcare). In una forma di realizzazione, il sistema di espansione cellulare comprende una sacca cellulare permeabile ai gas con un volume scelto nel gruppo composto da circa 100 ml, circa 200 ml, circa 300 ml, circa 400 ml, circa 500 ml, circa 600 ml, circa 700 ml, circa 800 ml, circa 900 ml, circa 1 l, circa 2 l, circa 3 l, circa 4 l, circa 5 l, circa 6 l, circa 7 l, circa 8 l, circa 9 l, e circa 10 l.

In una forma di realizzazione, i TIL possono essere fatti espandere in palloni G-Rex (disponibili in commercio da Wilson Wolf Manufacturing). Tali forme di realizzazione permettono di espandere le popolazioni cellulari da circa  $5 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup> a tra  $10 \times 10^6$  e  $30 \times 10^6$  cellule/cm<sup>2</sup>. In una forma di realizzazione ciò è senza alimentazione. In una forma di realizzazione, ciò è senza alimentazione a condizione che il mezzo risieda ad un'altezza di circa 10 cm nel pallone G-Rex. In una forma di realizzazione ciò è senza alimentazione ma con l'aggiunta di una o più citochine. In una forma di realizzazione, la citochina può essere aggiunta come bolo senza alcun bisogno di miscelare la citochina con il mezzo. Tali contenitori,

dispositivi, e metodi sono noti nell'arte e sono stati utilizzati per espandere i TIL, e includono quelli descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2014/0377739A1, nella pubblicazione internazionale No. WO 2014/210036 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2013/0115617 A1, nella pubblicazione internazionale No. WO2013/188427 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2011/0136228 A1, nel brevetto statunitense US 8,809,050 B2, nella pubblicazione internazionale WO 2011/072088 A2, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2016/0208216 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2012/0244133 A1, nella pubblicazione internazionale No. WO 2012/129201 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2013/0102075 A1, nel brevetto statunitense US 8,956,860 B2, nella pubblicazione internazionale No. WO2013/173835 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2015/0175966 A1. Tali procedimenti vengono inoltre descritti in Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

#### **D. Eventuale ingegnerizzazione genetica dei TIL**

In alcune forme di realizzazione, i TIL sono facoltativamente ingegnerizzati geneticamente per includere ulteriori funzionalità, comprendenti, ma senza limitazione, un recettore dei linfociti T ad affinità elevata (TCR), per esempio, un TCR diretto verso un antigene associato al tumore quale MAGE-1, HER2, o NY-ESO-1, o un recettore chimerico per l'antigene (CAR) che si lega ad una molecola della superficie cellulare associata al tumore (per esempio la mesotelina) o una molecola della superficie cellulare limitata per la linea (per esempio CD19).

#### **E. Eventuale crioconservazione dei TIL**

La popolazione di TIL non purificati o la popolazione espansa dei TIL possono essere facoltativamente crioconservate. In alcune forme di realizzazione, la crioconservazione avviene sulla popolazione terapeutica dei TIL. In alcune forme di realizzazione, la crioconservazione avviene sui TIL raccolti dopo la seconda espansione. In alcune forme di realizzazione, la crioconservazione avviene sui TIL nel passaggio esemplificativo F della figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL sono crioconservati nella sacca per infusione. In alcune forme di realizzazione, i TIL sono crioconservati prima della sistemazione in una sacca per infusione. In alcune forme di realizzazione, i TIL sono crioconservati e non posti in una sacca per infusione. In alcune forme di realizzazione, la crioconservazione viene eseguita utilizzando un mezzo di crioconservazione. In alcune forme di realizzazione, il mezzo di crioconservazione contiene dimetilsolfossido (DMSO). Ciò viene in generale realizzato ponendo la popolazione dei TIL in una soluzione di congelamento, per esempio siero AB con complemento inattivato al 85% e dimetilsolfossido al 15% (DMSO). Le cellule in soluzione vengono poste in flaconcini criogenici e conservate per 24 ore a -80°C, con eventuale trasferimento a congelatori ad azoto gassoso per la crioconservazione. Si veda Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

Quando appropriato, le cellule vengono rimosse dal congelatore e scongelate in un bagno d'acqua a 37°C fino a che approssimativamente 4/5 della soluzione sono scongelati. Le cellule sono in generale risospese in mezzi completi e facoltativamente lavate una o più volte. In alcune forme di realizzazione, i TIL scongelati possono essere contati e valutati per la vitalità com'è noto nell'arte.

In una forma di realizzazione preferita, una popolazione di TIL è crioconservata utilizzando il mezzo di crioconservazione CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). In una forma di realizzazione preferita, una popolazione di TIL è crioconservata utilizzando un mezzo di crioconservazione contenente dimetilsolfossido (DMSO). In una forma di realizzazione preferita, una popolazione di TIL è crioconservata utilizzando un rapporto 1:1 (vol:vol) tra il CS10 e il terreno di coltura cellulare. In una forma di realizzazione preferita, una popolazione di TIL è crioconservata utilizzando un rapporto di circa 1:1 (vol:vol) tra il CS10 e il terreno di coltura cellulare, comprendente inoltre ulteriore IL-2.

Come discusso sopra nei passaggi da A ad E, la crioconservazione può avvenire in numerosi punti in ogni parte del procedimento di espansione dei TIL. In alcune forme di realizzazione, la popolazione di TIL non purificati dopo la prima espansione secondo il passaggio B o la popolazione espansa dei TIL dopo l'una o più seconde espansioni secondo il passaggio D può essere crioconservata. La crioconservazione può essere in generale realizzata ponendo la popolazione dei TIL in una soluzione di congelamento, per esempio, siero AB con complemento inattivato al 85% e dimetilsolfossido al 15% (DMSO). Le cellule in soluzione vengono poste in flaconcini criogenici e conservate per 24 ore a -80°C, con eventuale trasferimento a congelatori ad azoto gassoso per la crioconservazione. Si veda Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986.

Quando appropriato, le cellule vengono rimosse dal congelatore e scongelate in un bagno d'acqua a 37°C fino a che approssimativamente 4/5 della soluzione sono scongelati. Le cellule sono in generale risospese in mezzi completi e facoltativamente lavate una o più volte. In alcune forme di realizzazione, i TIL scongelati possono essere contati e valutati per la vitalità com'è noto nell'arte.

In alcuni casi, la popolazione dei TIL del passaggio B può essere crioconservata immediatamente, utilizzando i protocolli discussi sotto. In alternativa, la popolazione di TIL non purificati può essere sottoposta al passaggio C e al passaggio D e quindi crioconservata dopo il passaggio D.

In modo simile, nel caso in cui saranno utilizzati TIL geneticamente modificati nella terapia, le popolazioni di TIL del passaggio B o del passaggio D possono essere sottoposte a modifiche genetiche per trattamenti adatti.

#### **F. Eventuali analisi della vitalità cellulare**

Facoltativamente, un saggio di vitalità cellulare può essere eseguito dopo la prima espansione (qualche volta indicata come l'espansione iniziale in massa), utilizzando saggi standard noti nell'arte. Per esempio, può essere eseguito su un campione dei TIL non purificati un saggio di esclusione del tripan blu, che marca selettivamente le cellule morte e permette la valutazione della vitalità. Altri saggi per l'uso nella valutazione della vitalità

possono includere, ma senza limitazione, il saggio Alamar Blue; e il saggio con MTT.

#### 1. Conte delle cellule, vitalità, citometria a flusso

In alcune forme di realizzazione, vengono misurate le conte cellulari e/o la vitalità. L'espressione di marcatori quali, ma non limitati a, CD3, CD4, CD8, e CD56, così come qualsiasi altro indicato o descritto qui, può essere misurata mediante la citometria a flusso con anticorpi, per esempio, ma senza limitazione, quelli disponibili in commercio da BD Biosciences (BD Biosciences, San Jose, California) utilizzando un citometro a flusso FACSCanto™ (BD Biosciences). Le cellule possono essere contate manualmente utilizzando un emocitometro con c-chip monouso (VWR, Batavia, Illinois) e la vitalità può essere valutata utilizzando qualsiasi metodo noto nell'arte, compresa, ma senza limitazione, la colorazione con tripan blu.

In alcuni casi, la popolazione di TIL non purificati può essere crioconservata immediatamente, utilizzando i protocolli discussi sotto. In alternativa, la popolazione di TIL non purificati può essere sottoposta a REP e quindi crioconservata come discusso sotto. In modo simile, nel caso in cui saranno utilizzati TIL geneticamente modificati nella terapia, le popolazioni di TIL non purificati o REP possono essere sottoposte a modifiche genetiche per trattamenti adatti.

#### 2. Colture cellulari

In una forma di realizzazione, un metodo per espandere i TIL può includere l'utilizzare da circa 5.000 ml a circa 25.000 ml di terreno cellulare, da circa 5.000 ml a circa 10.000 ml di terreno cellulare, o da circa 5.800 ml a circa 8.700 ml di terreno cellulare. In una forma di realizzazione, l'espansione del numero dei TIL utilizza non più di un tipo di terreno di coltura cellulare. Qualsiasi terreno di coltura cellulare adatto può essere utilizzato, per esempio, il terreno di coltura cellulare AIM-V (L-glutammina, streptomicina solfato 50µM, e gentamicina solfato 10µM) (Invitrogen, Carlsbad, California). A questo proposito, i metodi dell'invenzione riducono vantaggiosamente la quantità di mezzo e il numero di tipi di mezzo richiesti per espandere il numero dei TIL. In una forma di realizzazione, l'espansione del numero dei TIL può comprendere l'alimentazione delle cellule non più frequentemente di ogni tre o quattro giorni. L'espansione del numero di cellule in un contenitore permeabile ai gas semplifica le procedure necessarie per espandere il numero di cellule riducendo la frequenza di alimentazione necessaria per espandere le cellule.

In una forma di realizzazione, il terreno cellulare nel primo e/o nel secondo contenitore permeabile ai gas è non filtrato. L'uso di terreno cellulare non filtrato può semplificare le procedure necessarie per espandere il numero di cellule. In una forma di realizzazione, il terreno cellulare nel primo e/o nel secondo contenitore permeabile ai gas è privo di beta-mercaptoetanololo (BME).

La durata del metodo comprendente l'ottenere un campione di tessuto tumorale dal mammifero; il sottoporre a coltura il campione di tessuto

tumorale in un primo contenitore permeabile ai gas contenente terreno cellulare ivi; l'ottenere i TIL dal campione di tessuto tumorale; l'espandere il numero dei TIL in un secondo contenitore permeabile ai gas contenente terreno cellulare ivi utilizzando le aAPC per una durata da circa 14 a circa 42 giorni, per esempio, circa 28 giorni.

In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi in contenitori permeabili ai gas. I contenitori permeabili ai gas sono stati utilizzati per espandere i TIL utilizzando le PBMC utilizzando metodi, composizioni, e dispositivi noti nell'arte, compresi quelli descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto US 2005/0106717 A1. In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi in sacche permeabili ai gas. In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi utilizzando un sistema di espansione cellulare che espande i TIL in sacche permeabili ai gas, quale il sistema di espansione Xuri Cell W25 (GE Healthcare). In una forma di realizzazione, i TIL vengono espansi utilizzando un sistema di espansione cellulare che espande i TIL in sacche permeabili ai gas, quale il sistema di bioreattore WAVE, noto anche come sistema di espansione Xuri Cell W5 (GE Healthcare). In una forma di realizzazione, il sistema di espansione cellulare comprende una sacca cellulare permeabile ai gas con un volume scelto nel gruppo composto da circa 100 ml, circa 200 ml, circa 300 ml, circa 400 ml, circa 500 ml, circa 600 ml, circa 700 ml, circa 800 ml, circa 900 ml, circa 1 l, circa 2 l, circa 3 l, circa 4 l, circa 5 l, circa 6 l, circa 7 l, circa 8 l, circa 9 l, e circa 10 l.

In una forma di realizzazione, i TIL possono essere fatti espandere in palloni G-Rex (disponibili in commercio da Wilson Wolf Manufacturing). Tali forme di realizzazione permettono di espandere le popolazioni cellulari da circa  $5 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup> a tra  $10 \times 10^6$  e  $30 \times 10^6$  cellule/cm<sup>2</sup>. In una forma di realizzazione, ciò è senza alimentazione. In una forma di realizzazione, ciò è senza alimentazione a condizione che il mezzo risieda ad un'altezza di circa 10 cm nel pallone G-Rex. In una forma di realizzazione, ciò è senza alimentazione ma con l'aggiunta di una o più citochine. In una forma di realizzazione, la citochina può essere aggiunta come bolo senza alcun bisogno di miscelare la citochina con il mezzo. Tali contenitori, dispositivi, e metodi sono noti nell'arte e sono stati utilizzati per espandere i TIL, e includono quelli descritti nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2014/0377739A1, nella pubblicazione internazionale No. WO 2014/210036 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2013/0115617 A1, nella pubblicazione internazionale No. WO2013/188427 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2011/0136228 A1, nel brevetto statunitense US 8,809,050 B2, nella pubblicazione internazionale WO 2011/072088 A2, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2016/0208216 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2012/0244133 A1, nella pubblicazione internazionale No. WO 2012/129201 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2013/0102075 A1, nel brevetto statunitense US 8,956,860 B2, nella pubblicazione internazionale No. WO2013/173835 A1, nella pubblicazione della domanda di brevetto statunitense No. US 2015/0175966 A1. Tali procedimenti vengono inoltre descritti in Jin et al., J.

Immunotherapy, 2012, 35:283-292.

### 3. Eventuale ingegnerizzazione genetica dei TIL

In alcune forme di realizzazione, i TIL sono facoltativamente ingegnerizzati geneticamente per includere ulteriori funzionalità, comprendenti, ma senza limitazione, un recettore dei linfociti T ad affinità elevata (TCR), per esempio, un TCR diretto verso un antigene associato al tumore quale MAGE-1, HER2, o NY-ESO-1, o un recettore chimerico per l'antigene (CAR) che si lega ad una molecola della superficie cellulare associata al tumore (per esempio la mesotelina) o una molecola della superficie cellulare limitata per la linea (per esempio CD19).

## IV. Metodi di trattamento di pazienti

I metodi di trattamento cominciano con l'iniziale raccolta dei TIL e coltura dei TIL. Tali metodi sono stati entrambi descritti nell'arte, per esempio, da Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35(3):283-292. Gli esempi di metodi di trattamento vengono descritti in ogni parte delle sezioni sotto, compresi gli esempi.

I TIL espansi prodotti secondo i metodi descritti qui, compreso per esempio come descritto nei passaggi da A a F sopra o secondo i passaggi da A a F sopra (come mostrato anche, per esempio, nella figura 27) trovano uso particolare nel trattamento di pazienti oncologici (come, per esempio, descritto in Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34(20):2389-239, così come nel contenuto integrativo). In alcune forme di realizzazione, i TIL sono stati fatti crescere da depositi resecati di melanoma metastatico come descritto precedentemente (si veda Dudley, et al., J Immunother., 2003, 26:332-342). Il tumore fresco può essere sezionato in condizioni sterili. Un campione rappresentativo può essere raccolto per le analisi patologiche formali. Singoli frammenti da 2 mm<sup>3</sup> a 3 mm<sup>3</sup> possono essere utilizzati. 5, 10, 15, 20, 25 o 30 campioni per paziente possono essere ottenuti. 20, 25, o 30 campioni per paziente possono essere ottenuti. 20, 22, 24, 26, o 28 campioni per paziente possono essere ottenuti. 24 campioni per paziente possono essere ottenuti. I campioni possono essere posti in singoli pozzetti di una piastra da 24 pozzetti, mantenuti nel terreno di crescita con IL-2 a dose elevata (6.000 UI/ml), e monitorati per la distruzione del tumore e/o la proliferazione dei TIL. Qualsiasi tumore con le cellule vitali rimanenti dopo la lavorazione può essere digerito enzimaticamente in una sospensione di singole cellule e crioconservato, come descritto qui.

In alcune forme di realizzazione, i TIL cresciuti con successo possono essere campionati per l'analisi del fenotipo (CD3, CD4, CD8, e CD56) e testati nei confronti del tumore autologo quando disponibile. I TIL possono essere considerati reattivi se la co-coltura per una notte ha fornito livelli di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) > 200 pg/ml e due volte lo sfondo. (Goff, et al., J Immunother., 2010, 33:840-847). In alcune forme di realizzazione, le colture con prova di reattività autologa o modelli di crescita sufficienti possono essere scelte per una seconda espansione (per esempio una seconda espansione come fornita secondo il passaggio D della figura 27), comprese seconde espansioni che sono qualche volta indicate come

espansione rapida (REP). In alcune forme di realizzazione, i TIL espansi con elevata reattività autologa (per esempio elevata proliferazione durante una seconda espansione), vengono scelti per un'ulteriore seconda espansione. In alcune forme di realizzazione, i TIL con elevata reattività autologa (per esempio elevata proliferazione durante la seconda espansione come fornito nel passaggio D della figura 27) vengono scelti per un'ulteriore seconda espansione secondo il passaggio D della figura 27.

In alcune forme di realizzazione, il paziente non viene spostato direttamente all'ACT (trasferimento adottivo di cellule), per esempio, in alcune forme di realizzazione, dopo la raccolta del tumore e/o una prima espansione, le cellule non vengono utilizzate immediatamente. In tali forme di realizzazione, i TIL possono essere crioconservati e scongelati 2 giorni prima della somministrazione a un paziente. In tali forme di realizzazione, i TIL possono essere crioconservati e scongelati 1 giorno prima della somministrazione a un paziente. In alcune forme di realizzazione, i TIL possono essere crioconservati e scongelati immediatamente prima della somministrazione a un paziente.

I fenotipi cellulari di campioni crioconservati di TIL della sacca per infusione possono essere analizzati mediante la citometria a flusso (per esempio FlowJo) per i marcatori di superficie CD3, CD4, CD8, CCR-7, e CD45RA (BD BioSciences), così come mediante qualsiasi metodo descritto qui. Le citochine nel siero sono state misurate utilizzando tecniche di dosaggio immunoenzimatico standard. Un aumento nel IFN- $\gamma$  sierico è stato definito come >100 pg/ml e maggiore di 43 livelli di base.

In alcune forme di realizzazione, i TI prodotti mediante i metodi forniti qui, per esempio quelli esemplificati nella figura 27, contemplano un miglioramento sorprendente nell'efficacia clinica dei TIL. In alcune forme di realizzazione, i TI prodotti mediante i metodi forniti qui, per esempio quelli esemplificati nella figura 27, mostrano un'augmentata efficacia clinica in confronto a TI prodotti da metodi diversi da quelli descritti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli esemplificati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i metodi diversi da quelli descritti qui includono metodi indicati come procedimento 1C e/o generazione 1 (Gen 1). In alcune forme di realizzazione, l'efficacia aumentata viene misurata mediante DCR, ORR, e/o altre risposte cliniche. In alcune forme di realizzazione, i TI prodotti mediante i metodi forniti qui, per esempio quelli esemplificati nella figura 27, mostrano un tempo alla risposta e un profilo di sicurezza simili in confronto a TI prodotti da metodi diversi da quelli descritti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli esemplificati nella figura 27, per esempio il procedimento della Gen 1.

In alcune forme di realizzazione, l'IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ) è indicativo di efficacia del trattamento e/o di aumentata efficacia clinica. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  nel sangue di soggetti trattati con TIL è indicativo di TIL attivi. In alcune forme di realizzazione, viene impiegato un saggio d'efficacia per la produzione di IFN- $\gamma$ . La produzione di IFN- $\gamma$  è un'altra misura del potenziale citotossico. La produzione di IFN- $\gamma$  può essere misurata determinando i livelli della citochina IFN- $\gamma$  nel sangue, nel siero, o nei TIL *ex vivo* di un soggetto trattato con i TIL preparati

mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un aumento di IFN- $\gamma$  è indicativo di efficacia del trattamento in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  è aumentato di una volta, due volte, tre volte, quattro volte, o cinque volte o più in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di una volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di tre volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di quattro volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di cinque volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato utilizzando un kit ELISA Quantikine. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nei TIL *ex vivo* di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nel siero dei TIL di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento e/o di aumentata efficacia clinica. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore nel sangue di soggetti trattati con TIL è indicativa di TIL attivi. La produzione di IP-10 può essere misurata determinando i livelli dell'IP-10 nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media

superiore correla con un aumento di una volta, due volte, tre volte, quattro volte, o cinque volte o più in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di una volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di tre volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di quattro volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di cinque volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, IP-10 viene misurata nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, IP-10 viene misurata nel siero dei TIL di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento e/o di aumentata efficacia clinica. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore nel sangue di soggetti trattati con TIL è indicativa di TIL attivi. La produzione di MCP-1 può essere misurata determinando i livelli dell'MCP-1 nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di una volta, due volte, tre volte, quattro volte, o cinque volte o più in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di una

volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di tre volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di quattro volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di cinque volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, l'MCP-1 viene misurata nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, l'MCP-1 viene misurata nel siero dei TIL di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27, esibiscono un'augmentata policlonalità in confronto a TI prodotti mediante altri metodi, compresi quelli non esemplificati nella figura 27, quali, per esempio, i metodi indicati come metodi del procedimento 1C. In alcune forme di realizzazione, una policlonalità significativamente migliorata e/o una policlonalità aumentata è indicativa di efficacia del trattamento e/o di aumentata efficacia clinica. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità si riferisce alla diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, un aumento della policlonalità può essere indicativo di efficacia del trattamento per quanto riguarda la somministrazione dei TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di una volta, due volte, dieci volte, 100 volte, 500 volte o 1.000 volte in confronto a TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di una volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a

un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di dieci volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di 100 volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di 500 volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di 1.000 volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

Le misure dell'efficacia possono includere le misurazioni del tasso di controllo di malattia (DCR) così come il tasso di risposta complessiva (ORR), come noto nell'arte così come descritto negli esempi forniti qui, compreso nell'esempio 28.

### **1. Metodi per trattare tumori e altre malattie**

Le composizioni e i metodi descritti qui possono essere utilizzati in un metodo di trattamento di malattie. In un esempio, essi sono per l'uso nel trattamento di disturbi iperproliferativi. Possono anche essere utilizzati nel trattamento di altri disturbi come descritti qui e nei paragrafi seguenti.

Il disturbo iperproliferativo può essere un cancro. Il disturbo iperproliferativo può essere un cancro a tumore solido. Il cancro a tumore solido può essere scelto nel gruppo composto da melanoma, cancro ovarico, carcinoma del collo dell'utero, cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), cancro del polmone, cancro della vescica, cancro della mammella, cancro causato da virus del papilloma umano, cancro della testa e del collo (compreso il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC)), cancro del rene, e carcinoma a cellule renali. Il disturbo iperproliferativo può essere un tumore ematologico maligno. Il cancro a tumore solido può essere scelto nel gruppo composto da leucemia linfocitica cronica, leucemia linfoblastica acuta, linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma non Hodgkin, linfoma di Hodgkin, linfoma follicolare, e linfoma a cellule mantellari.

Qui è inoltre descritto ma non rivendicato un metodo per il trattamento del cancro con una popolazione di TIL, in cui un paziente viene preventivamente trattato con una chemioterapia non mieloablativa prima di un'infusione dei TIL secondo la presente descrizione. La chemioterapia non mieloablativa può essere ciclofosfamide 60 mg/kg/giorno per 2 giorni (giorni 27 e 26 prima dell'infusione dei TIL) e fludarabina 25

mg/m2/giorno per 5 giorni (giorni da 27 a 23 prima dell'infusione dei TIL). Dopo la chemioterapia non mieloablativa e l'infusione dei TIL (al giorno 0) secondo la presente descrizione, il paziente può ricevere un'infusione endovenosa di IL-2 per via endovenosa a 720.000 UI/kg ogni 8 ore fino alla tolleranza fisiologica.

L'efficacia dei composti e delle combinazioni di composti descritti qui nel trattamento, nella prevenzione e/o nella gestione delle malattie o dei disturbi indicati può essere testata utilizzando vari modelli noti nell'arte, che forniscono indicazioni per il trattamento di malattie umane. Per esempio, i modelli per determinare l'efficacia di trattamenti per il cancro ovarico vengono descritti, per esempio, in Mullany, et al., *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92; e Fong, et al., *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12. I modelli per determinare l'efficacia di trattamenti per il cancro del pancreas vengono descritti in Herreros-Villanueva, et al., *World J. Gastroenterol.* 2012,18, 1286-1294. I modelli per determinare l'efficacia di trattamenti per il cancro della mammella vengono descritti, per esempio, in Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212. I modelli per determinare l'efficacia di trattamenti per il melanoma vengono descritti, per esempio, in Damsky, et al., *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2010, 23, 853-859. I modelli per determinare l'efficacia di trattamenti per il cancro del polmone vengono descritti, per esempio, in Meuwissen, et al., *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664. I modelli per determinare l'efficacia di trattamenti per il cancro del polmone vengono descritti, per esempio, in Kim, *Clin. Esp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2,55-60; e Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32.

In alcune forme di realizzazione, l'IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ) è indicativo di efficacia del trattamento per il trattamento di un disturbo iperproliferativo. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  nel sangue di soggetti trattati con TIL è indicativo di TIL attivi. In alcune forme di realizzazione, viene impiegato un saggio d'efficacia per la produzione di IFN- $\gamma$ . La produzione di IFN- $\gamma$  è un'altra misura del potenziale citotossico. La produzione di IFN- $\gamma$  può essere misurata determinando i livelli della citochina IFN- $\gamma$  nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo contemplano un aumentato IFN- $\gamma$  nel sangue di soggetti trattati con i TIL del presente metodo in confronto a soggetti trattati con i TIL preparati utilizzando i metodi indicati come procedimento 1C, come esemplificato nella figura 83. In alcune forme di realizzazione, un aumento di IFN- $\gamma$  è indicativo di efficacia del trattamento in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  è aumentato di una volta, due volte, tre volte, quattro volte, o cinque volte o più in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di una volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi

diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di tre volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di quattro volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la secrezione di IFN- $\gamma$  è aumentata di cinque volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato utilizzando un kit ELISA Quantikine. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato utilizzando un kit ELISA Quantikine. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nei TIL *ex vivo* da un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nel sangue in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, l'IFN- $\gamma$  viene misurato nel siero in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione.

In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento e/o di aumentata efficacia clinica per il trattamento di un disturbo iperproliferativo. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore nel sangue di soggetti trattati con TIL è indicativa di TIL attivi. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo contemplano un'IP-10 media superiore nel sangue di soggetti trattati con i TIL del presente metodo in confronto a soggetti trattati con i TIL preparati utilizzando i metodi indicati come procedimento 1C, come esemplificato nella figura 83. La produzione di IP-10 può essere misurata determinando i livelli dell'IP-10 nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di una volta, due volte, tre volte, quattro volte, o cinque volte o più in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di una volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente

trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di tre volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di quattro volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'IP-10 media superiore correla con un aumento di cinque volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento e/o di aumentata efficacia clinica per il trattamento di un disturbo iperproliferativo. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore nel sangue di soggetti trattati con TIL è indicativa di TIL attivi. In alcune forme di realizzazione, i TIL ottenuti mediante il presente metodo contemplano un'MCP-1 media superiore nel sangue di soggetti trattati con i TIL del presente metodo in confronto a soggetti trattati con i TIL preparati utilizzando i metodi indicati come procedimento 1C, come esemplificato nella figura 83. La produzione di MCP-1 può essere misurata determinando i livelli dell'MCP-1 nel sangue di un soggetto trattato con i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore è indicativa di efficacia del trattamento in un paziente trattato con i TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di una volta, due volte, tre volte, quattro volte, o cinque volte o più in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di una volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di tre volte in confronto a

un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di quattro volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, un'MCP-1 media superiore correla con un aumento di cinque volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

In alcune forme di realizzazione, i TIL preparati mediante i metodi della presente invenzione, compresi quelli come descritti per esempio nella figura 27, esibiscono aumentata policlonalità in confronto a TI prodotti mediante altri metodi, compresi quelli non esemplificati nella figura 27, quali, per esempio, i metodi indicati come metodi del procedimento 1C. In alcune forme di realizzazione, una policlonalità significativamente migliorata e/o una policlonalità aumentata è indicativa di efficacia del trattamento e/o di aumentata efficacia clinica per il trattamento del cancro. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità si riferisce alla diversità del repertorio dei linfociti T. In alcune forme di realizzazione, un aumento della policlonalità può essere indicativo di efficacia del trattamento per quanto riguarda la somministrazione dei TI prodotti mediante i metodi della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di una volta, due volte, dieci volte, 100 volte, 500 volte o 1.000 volte in confronto a TIL preparati utilizzando metodi rispetto a quelli forniti qui compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di una volta in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di due volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di dieci volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di 100 volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di 500 volte in confronto a un paziente non trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27. In alcune forme di realizzazione, la policlonalità è aumentata di 1.000 volte in confronto a un paziente non

trattato e/o in confronto a un paziente trattato con TIL preparati utilizzando altri metodi rispetto a quelli forniti qui, compresi per esempio, metodi diversi da quelli rappresentati nella figura 27.

## **2. Metodi di cosomministrazione**

In alcune forme di realizzazione, i TI prodotti come descritto qui, compresi per esempio i TIL derivati da un metodo descritto nei passaggi da A a F della figura 27, possono essere per la somministrazione in combinazione con uno o più regolatori dei checkpoint immunitari, quali gli anticorpi descritti qui sotto. Per esempio, gli anticorpi che hanno come bersaglio PD-1 e che possono essere cosomministrati con i TIL della presente invenzione includono, per esempio, ma non sono limitati a nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475 o MK-3475, Merck; Keytruda®), l'anticorpo anti-PD-1 umanizzato JS001 (ShangHai JunShi), l'anticorpo monoclonale anti-PD-1 TSR-042 (Tesar, Inc.), pidilizumab (mAb anti-PD-1 CT-011, Medivation), l'anticorpo monoclonale anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene), e/o l'anticorpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), l'anticorpo monoclonale umano REGN2810 (Regeneron), l'anticorpo monoclonale umano MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb), e/o anticorpo anti-PD-1 umanizzato IgG4 PDR001 (Novartis). In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo contro PD-1 è dal clone: RMP1-14 (IgG di ratto) - numero di catalogo BioXcell BP0146. Altri anticorpi adatti per l'uso in metodi di cosomministrazione con i TI prodotti secondo i passaggi da A a F come descritti qui sono gli anticorpi anti-PD-1 descritti nel brevetto US No. 8,008,449. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo o una sua porzione di legame all'antigene si lega specificamente a PD-L1 ed inibisce la sua interazione con PD-1, aumentando quindi l'attività immunitaria. Qualsiasi anticorpo noto nell'arte che si lega a PD-L1 e spezza l'interazione tra la PD-1 e PD-L1, e stimola una risposta immunitaria antitumorale, è adatto per l'uso in metodi di cosomministrazione con i TI prodotti secondo i passaggi da A a F come descritto qui. Per esempio, gli anticorpi che hanno come bersaglio PD-L1 e sono in studi clinici, includono BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) e MPDL3280A (Genentech). Altri anticorpi adatti che hanno come bersaglio PD-L1 vengono descritti nel brevetto US No. 7,943,743. Sarà compreso da una persona di abilità ordinaria che qualsiasi anticorpo che si lega a PD-1 o PD-L1, rompe l'interazione PD-1/PD-L1, e stimola una risposta immunitaria antitumorale, è adatto per l'uso in metodi di cosomministrazione con i TI prodotti secondo i passaggi da A a F come descritto qui. Al soggetto a cui viene somministrata la combinazione dei TIL prodotti secondo i passaggi da A a F può essere cosomministrato un anticorpo anti-PD-1 quando il paziente ha un tipo di cancro che è refrattario alla somministrazione dell'anticorpo anti-PD-1 da solo. Al paziente possono essere somministrati TIL in combinazione con un anti-PD-1 quando il paziente ha un melanoma refrattario. Al paziente possono essere somministrati TIL in combinazione con un anti-PD-1 quando il paziente non ha un carcinoma polmonare a piccole cellule (CPNPC).

## **3. Eventuale preconditionamento di linfodeplezione dei pazienti**

Qui è inoltre descritto ma non rivendicato un metodo per il trattamento del cancro con una popolazione di TIL, in cui un paziente viene preventivamente trattato con una chemioterapia non mieloablattiva prima di un'infusione dei TIL secondo la presente descrizione. È inoltre qui descritta, ma non rivendicata, una popolazione di TIL per l'uso nel trattamento del cancro in un paziente che è stato sottoposto ad un trattamento precedente con chemioterapia non mieloablattiva. La popolazione dei TIL può essere per la somministrazione mediante infusione. La chemioterapia non mieloablattiva può essere ciclofosfamide 60 mg/kg/giorno per 2 giorni (giorni 27 e 26 prima dell'infusione dei TIL) e fludarabina 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per 5 giorni (giorni da 27 a 23 prima dell'infusione dei TIL). Dopo la chemioterapia non mieloablattiva e l'infusione dei TIL (al giorno 0) secondo la presente descrizione, il paziente può ricevere un'infusione endovenosa di IL-2 (aldesleuchina, disponibile in commercio come PROLEUKIN) per via endovenosa a 720.000 UI/kg ogni 8 ore fino alla tolleranza fisiologica. La popolazione dei TIL può essere per l'uso nel trattamento del cancro in combinazione con IL-2, in cui l'IL-2 viene somministrata dopo la popolazione dei TIL.

Scoperte sperimentali indicano che la linfodeplezione prima del trasferimento adottivo di linfociti T specifici per il tumore svolge un ruolo chiave nell'aumentare l'efficacia del trattamento eliminando i linfociti T regolatori e gli elementi competitivi del sistema immunitario ("riserve di citochine"). Conseguentemente, un passaggio di linfodeplezione (qualche volta indicato anche con "condizionamento immunosoppressivo") può essere utilizzato sul paziente prima dell'introduzione dei TIL dell'invenzione.

In generale, la linfodeplezione viene ottenuta utilizzando la somministrazione di fludarabina o ciclofosfamide (la forma attiva essendo indicata come mafosfamide) e loro combinazioni. Tali metodi vengono descritti in Gassner, et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 2011, 60, 75-85, Muranski, et al., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2006, 3, 668-681, Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233-5239, e Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346-2357.

La fludarabina può essere somministrata a una concentrazione di 0,5 µg/ml-10 µg/ml di fludarabina. La fludarabina può essere somministrata a una concentrazione di 1 µg/ml di fludarabina. Il trattamento con fludarabina può essere somministrato per 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, o 7 giorni o più. La fludarabina può essere somministrata ad un dosaggio di 10 mg/kg/giorno, 15 mg/kg/giorno, 20 mg/kg/giorno, 25 mg/kg/giorno, 30 mg/kg/giorno, 35 mg/kg/giorno, 40 mg/kg/giorno, o 45 mg/kg/giorno. Il trattamento con fludarabina può essere somministrato per 2-7 giorni a 35 mg/kg/giorno. Il trattamento con fludarabina può essere somministrato per 4-5 giorni a 35 mg/kg/giorno. Il trattamento con fludarabina può essere somministrato per 4-5 giorni a 25 mg/kg/giorno.

La mafosfamide, la forma attiva della ciclofosfamide, può essere ottenuta a una concentrazione di 0,5 µg/ml-10 µg/ml mediante la somministrazione di ciclofosfamide. La mafosfamide, la forma attiva della ciclofosfamide, può essere ottenuta a una concentrazione di 1 µg/ml

mediante la somministrazione di ciclofosfamide. Il trattamento con la ciclofosfamide può essere somministrato per 1 giorno, 2 giorni, 3 giorni, 4 giorni, 5 giorni, 6 giorni, o 7 giorni o più. La ciclofosfamide può essere somministrata ad un dosaggio di 100 mg/m<sup>2</sup>/giorno, 150 mg/m<sup>2</sup>/giorno, 175 mg/m<sup>2</sup>/giorno, 200 mg/m<sup>2</sup>/giorno, 225 mg/m<sup>2</sup>/giorno, 250 mg/m<sup>2</sup>/giorno, 275 mg/m<sup>2</sup>/giorno, o 300 mg/m<sup>2</sup>/giorno. La ciclofosfamide può essere somministrata per via endovenosa (cioè e.v.) Il trattamento con la ciclofosfamide può essere somministrato per 2-7 giorni a 35 mg/kg/giorno. Il trattamento con la ciclofosfamide può essere somministrato per 4-5 giorni a 250 mg/m<sup>2</sup>/giorno e.v. Il trattamento con la ciclofosfamide può essere somministrato per 4 giorni a 250 mg/m<sup>2</sup>/giorno e.v.

La linfodeplezione può essere eseguita somministrando la fludarabina e la ciclofosfamide insieme a un paziente. La fludarabina può essere somministrata a 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno e.v. e la ciclofosfamide viene somministrata a 250 mg/m<sup>2</sup>/giorno e.v. nell'arco di 4 giorni.

La linfodeplezione può essere eseguita mediante la somministrazione di ciclofosfamide a una dose di 60 mg/m<sup>2</sup>/giorno per due giorni cui segue la somministrazione di fludarabina a una dose di 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per cinque giorni.

#### **4. Regimi di IL-2**

Il regime di IL-2 può comprendere un regime di IL-2 a dose elevata, in cui il regime di IL-2 a dose elevata comprende aldesleuchina, o un suo bioanalogo o una sua variante, somministrata/o per via endovenosa cominciando il giorno dopo la somministrazione di una porzione terapeuticamente efficace della popolazione terapeutica dei TIL, in cui l'aldesleuchina o un suo bioanalogo o una sua variante viene somministrata/o a una dose di 0,037 mg/kg o 0,044 mg/kg UI/kg (massa corporea del paziente) utilizzando infusioni in bolo di 15 minuti per via endovenosa ogni otto ore fino alla tolleranza, per un massimo di 14 dosi. Dopo 9 giorni di pausa, questo programma può essere ripetuto per altre 14 dosi, per un massimo di 28 dosi in totale.

Il regime di IL-2 può comprendere un regime decrescente di IL-2. I regimi decrescenti di IL-2 sono stati descritti in O'Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61 ed Eton, et al., Cancer 2000, 88, 1703-9. Un regime decrescente di IL-2 può comprendere 18 × 10<sup>6</sup> UI/m<sup>2</sup> somministrate per via endovenosa nel corso di 6 ore, cui seguono 18 × 10<sup>6</sup> UI/m<sup>2</sup> somministrate per via endovenosa nel corso di 12 ore, cui seguono 18 × 10<sup>6</sup> UI/m<sup>2</sup> somministrate per via endovenosa nel corso di un periodo di 24 ore, cui seguono 4,5 × 10<sup>6</sup> UI/m<sup>2</sup> somministrate per via endovenosa nel corso di 72 ore. Questo ciclo di trattamento può essere ripetuto ogni 28 giorni per un massimo di quattro cicli. In una forma di realizzazione, un regime decrescente di IL-2 comprende 18.000.000 UI/m<sup>2</sup> al giorno 1, 9.000.000 UI/m<sup>2</sup> al giorno 2, e 4.500.000 UI/m<sup>2</sup> nei giorni 3 e 4.

Il regime di IL-2 può comprendere la somministrazione di IL-2 PEGilata ogni 1, 2, 4, 6, 7, 14 o 21 giorni a una dose da 0,10 mg/giorno a 50 mg/giorno.

## 5. Trasferimento adottivo di cellule

Il trasferimento adottivo di cellule (ACT) è una forma di immunoterapia molto efficace ed implica il trasferimento di cellule immunitarie con attività antitumorale in pazienti con un cancro. L'ACT è un approccio di trattamento che implica l'identificazione, *in vitro*, di linfociti con attività antitumorale, l'espansione *in vitro* di queste cellule a grandi quantità e la loro infusione nell'ospite recante il cancro. I linfociti utilizzati per il trasferimento adottivo possono essere derivati dallo stroma di tumori resecati (linfociti infiltranti il tumore o TIL). I TIL per l'ACT possono essere preparati come descritto qui. In alcune forme di realizzazione, i TIL vengono preparati, per esempio, secondo un metodo come descritto nella figura 27. Possono essere derivati anche dal sangue se essi vengono geneticamente modificati per esprimere recettori dei linfociti T antitumorali (TCR) o recettori chimerici per l'antigene (CAR), arricchiti con colture miste di cellule tumorali e linfociti (MLTC), o clonati utilizzando le cellule presentanti l'antigene autologhe e peptidi derivati da tumori. L'ACT in cui i linfociti hanno origine dall'ospite recante il cancro che deve essere sottoposto ad infusione viene chiamato ACT autologo. La pubblicazione US No. 2011/0052530 riguarda un metodo per eseguire la terapia cellulare adottiva per promuovere la regressione di un cancro, principalmente per il trattamento di pazienti che soffrono di melanoma metastatico. I TIL possono essere somministrati come descritto qui. I TIL possono essere somministrati in una dose singola. Tale somministrazione può essere mediante iniezione, per esempio, iniezione endovenosa. In alcune forme di realizzazione, i TIL e/o i linfociti citotossici possono essere somministrati in dosi multiple. Il dosaggio può essere una volta, due volte, tre volte, quattro volte, cinque volte, sei volte, o più di sei volte all'anno. Il dosaggio può essere una volta al mese, una volta ogni due settimane, una volta alla settimana, o una volta a giorni alterni. La somministrazione dei TIL e/o dei linfociti citotossici può continuare finché necessario.

## 6. Esempi di trattamento tipici

La presente descrizione comprende un metodo per il trattamento del cancro con una popolazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) comprendente i passaggi di (a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un paziente; (b) l'eseguire un'espansione iniziale della prima popolazione dei TIL in un primo terreno di coltura cellulare per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 5 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui il primo terreno di coltura cellulare comprende IL-2; (c) l'eseguire un'espansione rapida della seconda popolazione dei TIL utilizzando una popolazione di cellule mieloidi presentanti l'antigene artificiali (aAPC mieloidi) in un secondo terreno di coltura cellulare per ottenere una terza popolazione di TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla seconda popolazione dei TIL dopo 7 giorni dall'inizio dell'espansione rapida; e in cui il secondo terreno di coltura cellulare comprende IL-2 e OKT-3; (d) il somministrare una porzione terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL a

un paziente con il cancro. La presente descrizione comprende anche una popolazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) per l'uso nel trattamento del cancro, in cui la popolazione dei TIL può essere ottenuta mediante un metodo comprendente i passaggi di (b) l'eseguire un'espansione iniziale di una prima popolazione di TIL ottenuti da un tumore resecato da un paziente in un primo terreno di coltura cellulare per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 5 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui il primo terreno di coltura cellulare comprende IL-2; (c) l'eseguire un'espansione rapida della seconda popolazione dei TIL utilizzando una popolazione di cellule mieloidi presentanti l'antigene artificiali (aAPC mieloidi) in un secondo terreno di coltura cellulare per ottenere una terza popolazione di TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla seconda popolazione dei TIL dopo 7 giorni dall'inizio dell'espansione rapida; e in cui il secondo terreno di coltura cellulare comprende IL-2 e OKT-3; (d) il somministrare una porzione terapeutamente efficace della terza popolazione dei TIL a un paziente con il cancro. Il metodo può comprendere un primo passaggio (a) di ottenimento della prima popolazione dei TIL da un tumore resecato da un paziente. L'IL-2 può essere presente ad una concentrazione iniziale di circa 3.000 UI/ml e l'anticorpo OKT-3 è presente a una concentrazione iniziale di circa 30 ng/ml nel secondo terreno di coltura cellulare. La prima espansione può essere eseguita nell'arco non superiore a 14 giorni. La prima espansione può essere eseguita utilizzando un contenitore permeabile ai gas. La seconda espansione può essere eseguita utilizzando un contenitore permeabile ai gas. Il rapporto tra la seconda popolazione dei TIL e la popolazione delle aAPC nell'espansione rapida può essere tra da 1 a 80 e da 1 a 400. Il rapporto tra la seconda popolazione dei TIL e la popolazione delle aAPC nell'espansione rapida può essere da circa 1 a 300. Il cancro per il trattamento può essere scelto nel gruppo composto da melanoma, cancro ovarico, carcinoma del collo dell'utero, cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), cancro del polmone, cancro della vescica, cancro della mammella, cancro causato da virus del papilloma umano, cancro della testa e del collo (compreso il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC)), cancro del rene, e carcinoma a cellule renali. Il cancro per il trattamento può essere scelto nel gruppo composto da melanoma, cancro ovarico, e carcinoma del collo dell'utero. Il cancro per il trattamento può essere melanoma. Il cancro per il trattamento può essere cancro ovarico. Il cancro per il trattamento può essere carcinoma del collo dell'utero. Il metodo per trattare il cancro può comprendere inoltre i passaggi di trattamento del paziente con un regime di linfodeplezione non mieloablativa prima di somministrare la terza popolazione dei TIL al paziente. Il regime di linfodeplezione non mieloablativa può comprendere i passaggi di somministrazione di ciclofosfamide a una dose di 60 mg/m<sup>2</sup>/giorno per due giorni cui segue la somministrazione di fludarabina a una dose di 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per cinque giorni. Il regime di IL-2 a dose elevata può comprendere 600.000 o 720.000 UI/kg di aldesleuchina, o un suo bioanalogo o una sua variante, somministrata/o come infusione endovenosa in bolo di 15 minuti ogni otto ore fino alla tolleranza.

## V. Esempi tipici

La presente descrizione comprende ma non rivendica un metodo per il trattamento di un soggetto con cancro, il metodo comprendendo la somministrazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) espansi comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 11 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 11 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema;

(g) la crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione; e

(h) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL dalla sacca per infusione nel passaggio (g) al paziente.

Il procedimento di crioconservazione può comprendere la crioconservazione in un mezzo comprendente DMSO. I mezzi di crioconservazione possono comprendere DMSO dal 7% al 10%. Il terreno di crioconservazione può essere CS10.

La popolazione terapeutica della raccolta dei TIL nel passaggio (e) può comprendere TIL sufficienti per somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace dei TIL nel passaggio (h).

Il numero dei TIL sufficiente per somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace nel passaggio (h) può essere da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

Le cellule presentanti l'antigene (APC) possono essere le PBMC.

Le PBMC possono essere aggiunte alla coltura cellulare ad uno qualsiasi dei giorni da 9 a 11 nel passaggio (d).

Prima di somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace di cellule TIL nel passaggio (h), può essere stato somministrato al paziente un regime di linfodeplezione non mieloablativa.

Il regime di linfodeplezione non mieloablativa può comprendere i passaggi di somministrazione di ciclofosfamida a una dose di  $60 \text{ mg/m}^2/\text{giorno}$  per due giorni cui segue la somministrazione di fludarabina a una dose di  $25 \text{ mg/m}^2/\text{giorno}$  per cinque giorni.

Il metodo può comprendere inoltre i passaggi di trattamento del paziente con un regime di IL-2 a dose elevata che ha inizio il giorno dopo la somministrazione delle cellule TIL al paziente nel passaggio (h).

Il regime di IL-2 a dose elevata può comprendere 600.000 o 720.000 UI/kg somministrate come infusione endovenosa in bolo di 15 minuti ogni otto ore fino alla tolleranza.

La terza popolazione dei TIL nel passaggio (d) può fornire un'efficacia aumentata, una produzione aumentata di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ), una policlonalità aumentata, un'IP-10 media aumentata, e/o un'MCP-1 media aumentata quando somministrata a un soggetto. L'aumento di IFN- $\gamma$ , l'aumentata IP-10 media, e/o l'aumentata MCP-1 media possono essere misurati nel sangue del soggetto trattato con i TIL.

Il cancro può essere scelto nel gruppo composto da melanoma, cancro ovarico, carcinoma del collo dell'utero, cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), cancro del polmone, cancro della vescica, cancro della mammella, cancro causato da virus del papilloma umano, cancro della testa e del collo (compreso il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC)), cancro del rene, e carcinoma a cellule renali. Il cancro può essere scelto nel gruppo composto da melanoma, HNSCC, tumori della cervice, e CPNPC. In alcune forme di realizzazione, il cancro è melanoma. Il cancro può essere HNSCC. Il cancro può essere un carcinoma del collo dell'utero. Il cancro può essere CPNPC.

In una forma di realizzazione, l'invenzione fornisce un metodo per espandere linfociti infiltranti il tumore (TIL).

Viene qui descritto un metodo per espandere linfociti infiltranti il tumore (TIL) comprendente: (a) l'ottenere un campione di tumore da un paziente, in cui il suddetto campione di tumore comprende una prima popolazione di TIL; (b) il processare il suddetto campione di tumore in frammenti

tumorali multipli; (c) l'aggiungere i suddetti frammenti tumorali in un contenitore chiuso; (d) l'eseguire un'espansione iniziale della suddetta prima popolazione dei TIL in un primo terreno di coltura cellulare per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui il suddetto primo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, in cui la suddetta espansione iniziale viene eseguita nel suddetto contenitore chiuso che fornisce almeno 100 cm<sup>2</sup> di area superficiale permeabile ai gas, in cui la suddetta espansione iniziale viene eseguita all'interno di un primo periodo di circa 7-14 giorni per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la suddetta seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla suddetta prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema; (e) l'espansione della suddetta seconda popolazione dei TIL in un secondo terreno di coltura cellulare, in cui il suddetto secondo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, OKT-3, e cellule mononucleate del sangue periferico (le PBMC, note anche come cellule mononucleate (MNC)), in cui la suddetta espansione viene eseguita entro un secondo periodo di circa 7-14 giorni per ottenere una terza popolazione di TIL, in cui la suddetta terza popolazione dei TIL mostra un'aumentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la suddetta espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce almeno 500 cm<sup>2</sup> di area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; (f) il raccogliere la suddetta terza popolazione dei TIL ottenuti dal passaggio (e), in cui la transizione dal passaggio (e) al passaggio (f) avviene senza apertura del sistema; e (g) il trasferire la suddetta popolazione della raccolta dei TIL dal passaggio (f) a una sacca per infusione, in cui il suddetto trasferimento dal passaggio (f) a (g) avviene senza apertura del sistema. Il metodo può essere un metodo *in vitro* o *ex vivo*.

Il metodo può comprendere inoltre la raccolta nel passaggio (f) attraverso un sistema di lavorazione cellulare, quale il sistema prodotto LOVO da Fresenius Kabi. Il termine "sistema di lavorazione cellulare LOVO" si riferisce anche a qualsiasi strumento o dispositivo prodotto da qualsiasi fornitore che può pompare una soluzione comprendente cellule attraverso una membrana o un filtro quale una membrana rotante o un filtro rotante in un ambiente di un sistema sterile e/o chiuso, permettendo il flusso continuo e la lavorazione cellulare per rimuovere il surnatante o il terreno di coltura cellulare senza pellettizzazione. In alcuni casi, il sistema di lavorazione cellulare può eseguire la separazione cellulare, il lavaggio, lo scambio di fluidi, la concentrazione, e/o altri passaggi di lavorazione cellulare in un sistema chiuso, sterile.

Il contenitore chiuso può essere scelto nel gruppo composto da un contenitore G e una sacca cellulare Xuri.

La sacca per infusione nel passaggio (g) può essere una sacca per infusione contenente HypoThermosol.

Il primo periodo nel passaggio (d) e il suddetto secondo periodo nel passaggio (e) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 10 giorni, 11 giorni, o 12 giorni.

Il primo periodo nel passaggio (d) e il suddetto secondo periodo nel passaggio (e) possono ciascuno essere eseguito singolarmente entro un periodo di 11 giorni.

I passaggi da (a) a (g) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 25 giorni a circa 30 giorni.

I passaggi da (a) a (g) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 25 giorni.

I passaggi da (a) a (g) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 22 giorni.

I passaggi da (a) a (g) possono essere eseguiti in 22 giorni o meno.

I passaggi da (c) a (f) possono essere eseguiti in un singolo contenitore, in cui l'esecuzione dei passaggi da (c) a (f) in un singolo contenitore risulta in un aumento della resa dei TIL per tumore resecato in confronto all'esecuzione dei passaggi da (c) a (f) in più di un contenitore.

Le PBMC possono essere aggiunte ai TIL durante il secondo periodo nel passaggio (e) senza apertura del sistema.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta terza popolazione dei TIL possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta terza popolazione dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta seconda popolazione di cellule.

Il rischio di contaminazione microbica può essere ridotto in confronto a un sistema aperto.

I TIL dal passaggio (g) possono essere infusi in un paziente.

Qui è inoltre descritto ma non rivendicato un metodo di trattamento del cancro in un paziente con una popolazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) comprendente i passaggi di: (a) l'ottenere un campione di tumore da un paziente, in cui il suddetto campione di tumore comprende una prima popolazione di TIL; (b) il processare il suddetto campione di tumore in frammenti tumorali multipli; (c) l'aggiungere i suddetti frammenti tumorali in un contenitore chiuso; (d) l'eseguire un'espansione iniziale della suddetta prima popolazione dei TIL in un primo terreno di coltura cellulare per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui il suddetto primo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, in cui la suddetta espansione iniziale viene eseguita nel suddetto contenitore chiuso che fornisce almeno 100 cm<sup>2</sup> di area superficiale permeabile ai gas, in cui la suddetta espansione iniziale viene eseguita all'interno di un primo periodo di circa 7-14 giorni per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la suddetta seconda

popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla suddetta prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema; (e) l'espansione della suddetta seconda popolazione dei TIL in un secondo terreno di coltura cellulare, in cui il suddetto secondo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, OKT-3, e cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), in cui la suddetta espansione viene eseguita entro un secondo periodo di circa 7-14 giorni per ottenere una terza popolazione di TIL, in cui la suddetta terza popolazione dei TIL mostra un'aumentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la suddetta espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce almeno 500 cm<sup>2</sup> di area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; (f) il raccogliere la suddetta terza popolazione dei TIL ottenuti dal passaggio (e), in cui la transizione dal passaggio (e) al passaggio (f) avviene senza apertura del sistema; (g) il trasferire la suddetta popolazione della raccolta dei TIL dal passaggio (f) a una sacca per infusione, in cui il suddetto trasferimento dal passaggio (f) a (g) avviene senza apertura del sistema; e (h) il somministrare una quantità terapeuticamente efficace di cellule TIL dalla suddetta sacca per infusione nel passaggio (g) al suddetto paziente.

È inoltre qui descritta, ma non rivendicata, una popolazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) per l'uso nel trattamento del cancro, in cui la popolazione dei TIL può essere ottenuta mediante un metodo comprendente i passaggi di: (b) il processare un campione di tumore ottenuto da un paziente in cui il suddetto campione di tumore comprende una prima popolazione di TIL in frammenti tumorali multipli; (c) l'aggiungere i suddetti frammenti tumorali in un contenitore chiuso; (d) l'eseguire un'espansione iniziale della suddetta prima popolazione dei TIL in un primo terreno di coltura cellulare per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui il suddetto primo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, in cui la suddetta espansione iniziale viene eseguita nel suddetto contenitore chiuso che fornisce almeno 100 cm<sup>2</sup> di area superficiale permeabile ai gas, in cui la suddetta espansione iniziale viene eseguita all'interno di un primo periodo di circa 7-14 giorni per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la suddetta seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla suddetta prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema; (e) l'espansione della suddetta seconda popolazione dei TIL in un secondo terreno di coltura cellulare, in cui il suddetto secondo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, OKT-3, e cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), in cui la suddetta espansione viene eseguita entro un secondo periodo di circa 7-14 giorni per ottenere una terza popolazione di TIL, in cui la suddetta terza popolazione dei TIL mostra un'aumentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la suddetta espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce almeno 500 cm<sup>2</sup> di area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema;

(f) il raccogliere la suddetta terza popolazione dei TIL ottenuti dal passaggio (e), in cui la transizione dal passaggio (e) al passaggio (f) avviene senza apertura del sistema; (g) il trasferire la suddetta popolazione della raccolta dei TIL dal passaggio (f) a una sacca per infusione, in cui il suddetto trasferimento dal passaggio (f) a (g) avviene senza apertura del sistema. Il metodo può comprendere un primo passaggio (a) di ottenimento del campione di tumore da un paziente, in cui il suddetto campione di tumore comprende la prima popolazione dei TIL. La popolazione dei TIL può essere per la somministrazione dalla suddetta sacca per infusione nel passaggio (g) in una quantità terapeuticamente efficace.

Prima di somministrare una quantità terapeuticamente efficace di cellule TIL nel passaggio (h), un regime di linfodeplezione non mieloablativa può essere stato somministrato al suddetto paziente. Le popolazioni dei TIL possono essere per la somministrazione a un paziente che ha subito un regime di linfodeplezione non mieloablativa.

Il regime di linfodeplezione non mieloablativa può comprendere i passaggi di somministrazione di ciclofosfamide a una dose di 60 mg/m<sup>2</sup>/giorno per due giorni cui segue la somministrazione di fludarabina a una dose di 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per cinque giorni.

Il metodo può comprendere inoltre i passaggi di trattare il suddetto paziente con un regime di IL-2 a dose elevata che ha inizio il giorno dopo la somministrazione delle suddette cellule TIL al suddetto paziente nel passaggio (h). Le popolazioni dei TIL possono essere per la somministrazione prima di un regime di IL-2 a dose elevata. La popolazione dei TIL può essere per la somministrazione un giorno prima dell'inizio del regime di IL-2 a dose elevata.

Il regime di IL-2 a dose elevata può comprendere 600.000 o 720.000 UI/kg somministrate come infusione endovenosa in bolo di 15 minuti ogni otto ore fino alla tolleranza.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta terza popolazione dei TIL possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta terza popolazione dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta seconda popolazione di cellule.

Viene inoltre qui descritto un metodo per espandere linfociti infiltranti il tumore (TIL) comprendente i passaggi di (a) l'aggiungere i frammenti tumorali trattati in un sistema chiuso; (b) l'eseguire in una prima dell'espansione della suddetta prima popolazione dei TIL in un primo terreno di

coltura cellulare per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui il suddetto primo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, in cui la suddetta prima dell'espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la suddetta prima dell'espansione viene eseguita all'interno di un primo periodo di circa 3-14 giorni per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la suddetta seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla suddetta prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (a) al passaggio (b) avviene senza apertura del sistema; (c) l'espansione della suddetta seconda popolazione dei TIL in un secondo terreno di coltura cellulare, in cui il suddetto secondo terreno di coltura cellulare comprende IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene, in cui la suddetta espansione viene eseguita entro un secondo periodo di circa 7-14 giorni per ottenere una terza popolazione di TIL, in cui la suddetta terza popolazione dei TIL mostra un'aumentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la suddetta espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema; (d) il raccogliere la suddetta terza popolazione dei TIL ottenuti dal passaggio (c), in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema; e (e) il trasferire la suddetta popolazione della raccolta dei TIL dal passaggio (d) a una sacca per infusione, in cui il suddetto trasferimento dal passaggio (d) a (e) avviene senza apertura del sistema.

Il metodo può comprendere inoltre il passaggio di crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta utilizzando un procedimento di crioconservazione. Il procedimento di crioconservazione può essere eseguito utilizzando un rapporto 1:1 tra la popolazione dei TIL raccolta e il mezzo CS10.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule presentanti l'antigene artificiali.

La raccolta nel passaggio (d) può essere eseguita utilizzando un sistema di lavorazione cellulare LOVO.

I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti, in cui ciascun frammento ha un volume di circa 27 mm<sup>3</sup>. I frammenti multipli possono comprendere da circa 30 a circa 60 frammenti con un volume totale da circa 1.300 mm<sup>3</sup> a circa 1.500 mm<sup>3</sup>. I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con un volume totale di circa 1.350 mm<sup>3</sup>. I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con una massa totale da circa 1 grammo a circa 1,5 grammi.

Il secondo terreno di coltura cellulare può essere fornito in un contenitore scelto nel gruppo composto da un contenitore G e una sacca cellulare Xuri.

La sacca per infusione nel passaggio (e) può essere una sacca per infusione contenente HypoThermosol.

Il primo periodo nel passaggio (b) e il suddetto secondo periodo nel passaggio (c) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 10 giorni, 11 giorni, o 12 giorni. Il primo periodo nel passaggio (b) e il suddetto secondo periodo nel passaggio (c) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 11 giorni.

I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 25 giorni a circa 30 giorni. I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 25 giorni. I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 22 giorni. I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti in 22 giorni o meno. I passaggi da (a) ad (e) e la crioconservazione possono essere eseguiti in 22 giorni o meno.

I passaggi da (b) a (e) possono essere eseguiti in un singolo sistema chiuso, in cui l'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in un singolo contenitore risulta in un aumento della resa dei TIL per tumore resecato in confronto all'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in più di un contenitore.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere aggiunte ai TIL durante il secondo periodo nel passaggio (c) senza apertura del sistema.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta terza popolazione dei TIL possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta terza popolazione dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla suddetta seconda popolazione di cellule.

Il rischio di contaminazione microbica può essere ridotto in confronto a un sistema aperto.

I TIL dal passaggio (e) possono essere infusi in un paziente.

Il contenitore chiuso può comprendere un bioreattore singolo. Il contenitore chiuso può comprendere un G-REX-10. Il contenitore chiuso può comprendere un G-REX-100. Il contenitore chiuso può comprendere un G-REX-500. Il contenitore chiuso può comprendere una sacca permeabile ai gas Xuri o bioreattore WAVE.

La presente descrizione fornisce un metodo per espandere i linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendente:

(b) l'aggiungere frammenti tumorali in un sistema chiuso in cui i frammenti tumorali comprendono una prima popolazione dei TIL;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema.

Il metodo può comprendere anche come primo passaggio:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un paziente mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli.

Il metodo può essere un metodo *in vitro* o *ex vivo*.

La presente descrizione può fornire un metodo per espandere i linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un paziente mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una

seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema.

Il metodo può essere un metodo *in vitro* o *ex vivo*.

Il metodo può comprendere inoltre i passaggio di crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta nel passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione.

Il procedimento di crioconservazione può essere eseguito utilizzando un rapporto 1:1 tra la popolazione dei TIL raccolta e il mezzo di crioconservazione. I mezzi di crioconservazione possono comprendere dimetilsolfossido. I mezzi di crioconservazione possono essere scelti dal gruppo composto da Cryostor CS10, HypoThermasol, o una loro combinazione.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC).

Le PBMC possono essere irradiate ed allogene.

Le PBMC possono essere aggiunte alla coltura cellulare ad uno qualsiasi dei giorni da 9 a 14 nel passaggio (d).

Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule presentanti l'antigene artificiali.

La raccolta nel passaggio (e) può essere eseguita utilizzando un sistema di lavorazione cellulare LOVO.

I frammenti tumorali possono essere frammenti multipli e comprendono da circa 4 a circa 50 frammenti, in cui ciascun frammento ha un volume di circa 27 mm<sup>3</sup>. I frammenti multipli possono comprendere da circa 30 a circa 60 frammenti con un volume totale da circa 1.300 mm<sup>3</sup> a circa 1.500 mm<sup>3</sup>. I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con un volume totale di circa 1.350 mm<sup>3</sup>. I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con una massa totale da circa 1 grammo a circa 1,5 grammi.

Il terreno di coltura cellulare può essere fornito in un contenitore scelto nel gruppo composto da un contenitore G e una sacca cellulare Xuri.

La sacca per infusione nel passaggio (f) può essere una sacca per infusione contenente HypoThermosol.

Il primo periodo nel passaggio (c) e il secondo periodo nel passaggio (e) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 10 giorni, 11 giorni, o 12 giorni. Il primo periodo nel passaggio (c) e il secondo periodo nel passaggio (e) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 11 giorni. I passaggi da (a) a (f) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 25 giorni a circa 30 giorni. I passaggi da (a) a (f) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 25 giorni. I passaggi da (a) a (f) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 22 giorni. I passaggi da (a) a (f) possono essere eseguiti in 22 giorni o meno. I passaggi da (a) a (f) e la crioconservazione possono essere eseguiti in 22 giorni o meno.

La popolazione terapeutica della raccolta dei TIL nel passaggio (e) può comprendere TIL sufficienti per un dosaggio terapeuticamente efficace dei TIL. Il numero dei TIL sufficiente per un dosaggio terapeuticamente efficace può essere da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

I passaggi da (b) a (e) possono essere eseguiti in un singolo contenitore, in cui l'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in un singolo contenitore risulta in un aumento della resa dei TIL per tumore resecato in confronto all'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in più di un contenitore.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere aggiunte ai TIL durante il secondo periodo nel passaggio (d) senza apertura del sistema.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale nella popolazione terapeutica dei TIL possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla terza popolazione dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

Il rischio di contaminazione microbica può essere ridotto in confronto a un sistema aperto.

I TIL dal passaggio (f) possono essere infusi in un paziente.

I frammenti multipli possono comprendere circa 4 frammenti. I 4 frammenti possono essere posti in un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,5 cm di diametro. I 4 frammenti possono essere posti in un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,1 cm, 0,2 cm, 0,3 cm, 0,4 cm, 0,5 cm, 0,6 cm, 0,7 cm, 0,8 cm, 0,9 cm, o 1 cm di diametro. I 4 frammenti possono essere di circa 0,1 cm, 0,2 cm, 0,3 cm, 0,4 cm, 0,5 cm, 0,6 cm, 0,7 cm, 0,8 cm, 0,9 cm, o 1 cm di diametro e vengono posti in un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,1 cm, 0,2 cm, 0,3 cm, 0,4 cm, 0,5 cm, 0,6 cm, 0,7 cm, 0,8 cm, 0,9 cm, o 1 cm di diametro e possono essere posti in un contenitore con un volume equivalente ad un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,5 cm di diametro e possono essere posti in un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,5 cm di diametro e possono essere posti in un contenitore con un volume equivalente ad un G-REX-100.

Ulteriori dettagli dei passaggi (a), (b), (c), (d), (e) e (f) vengono forniti qui sotto, comprese per esempio, ma non limitate a, le forme di realizzazione descritte sotto i titoli "Passaggio A: ottenimento di un campione di tumore da un paziente", "Passaggio B: prima espansione", "Passaggio C: transizione dalla prima espansione alla seconda espansione", "Passaggio D: seconda espansione", "Passaggio E: raccolta dei TIL" e "Passaggio F: formulazione finale/trasferimento alla sacca per infusione".

La presente descrizione fornisce metodi per trattare un soggetto con cancro, il metodo comprendendo la somministrazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) espansi comprendente:

- (a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;
- (b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;
- (c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;
- (d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'aumentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda

espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio

(c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema;

(g) il crioconservare facoltativamente la sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione; e

(h) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL dalla sacca per infusione nel passaggio (g) al paziente.

Viene inoltre qui descritta una popolazione terapeutica di linfociti infiltranti il tumore (TIL) per l'uso nel trattamento del cancro, in cui la popolazione può essere ottenuta mediante un metodo comprendente i passaggi di:

(b) l'aggiungere frammenti tumorali in un sistema chiuso in cui i frammenti tumorali comprendono una prima popolazione dei TIL;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio

(c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema; e

(g) il crioconservare facoltativamente la sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione.

È possibile che la popolazione possa essere ottenuta mediante un metodo comprendente anche come primo passaggio:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un paziente mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli.

Il metodo può essere un metodo *in vitro* o *ex vivo*.

Qualsiasi dei passaggi da (a) ad (f) può comprendere una o più caratteristiche descritte qui, per esempio una o più caratteristiche descritte qui sotto i titoli "Passaggio A: ottenimento di un campione di tumore da un paziente", "Passaggio B: prima espansione", "Passaggio C: transizione dalla prima espansione alla seconda espansione", "Passaggio D: seconda espansione", "Passaggio E: raccolta dei TIL" e "Passaggio F: formulazione finale/trasferimento alla sacca per infusione".

Il passaggio (g) può comprendere una o più caratteristiche descritte qui, per esempio una o più caratteristiche descritte qui sotto il titolo "Passaggio H: eventuale crioconservazione dei TIL". Il passaggio (h) comprende una o più caratteristiche descritte qui, per esempio una o più caratteristiche descritte qui sotto il titolo "Passaggio F:1 Composizioni farmaceutiche, dosaggi e regimi di trattamento".

La popolazione terapeutica della raccolta dei TIL nel passaggio (e) può comprendere TIL sufficienti per somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace dei TIL nel passaggio (h).

Il numero dei TIL sufficiente per somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace nel passaggio (h) può essere da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

Le cellule presentanti l'antigene (APC) possono essere le PBMC.

Le PBMC possono essere aggiunte alla coltura cellulare ad uno qualsiasi dei giorni da 9 a 14 nel passaggio (d).

Prima di somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace di cellule TIL nel passaggio (h), può essere stato somministrato al paziente un regime di linfodeplezione non mieloablativa.

Viene inoltre qui descritta una popolazione terapeutica di linfociti infiltranti il tumore (TIL) per l'uso nel trattamento del cancro e in combinazione con un regime di linfodeplezione non mieloablativa. Il regime di linfodeplezione non mieloablativa può essere somministrato prima di

somministrare la popolazione terapeutica di linfociti infiltranti il tumore (TIL).

Il regime di linfodeplezione non mieloablativa può comprendere i passaggi di somministrazione di ciclofosfamida a una dose di 60 mg/m<sup>2</sup>/giorno per due giorni cui segue la somministrazione di fludarabina a una dose di 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per cinque giorni.

Può esservi un passaggio di trattamento del paziente con un regime di IL-2 a dose elevata che ha inizio il giorno dopo la somministrazione delle cellule TIL al paziente nel passaggio (h).

Viene inoltre qui descritta una popolazione terapeutica di linfociti infiltranti il tumore (TIL) per l'uso nel trattamento del cancro e in combinazione con un regime di IL-2 a dose elevata. Il regime di IL-2 a dose elevata può iniziare il giorno dopo la somministrazione della popolazione terapeutica di cellule TIL.

Il regime di IL-2 a dose elevata può comprendere 600.000 o 720.000 UI/kg somministrate come infusione endovenosa in bolo di 15 minuti ogni otto ore fino alla tolleranza.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale nella popolazione terapeutica dei TIL possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale nella popolazione terapeutica dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

La presente descrizione fornisce anche metodi per espandere i linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendenti:

- (a) l'aggiungere i frammenti tumorali trattati da un tumore resecato da un paziente in un sistema chiuso per ottenere una prima popolazione di TIL;
- (b) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (a) al passaggio (b) avviene senza apertura del sistema;
- (c) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e

cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio

(b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (c), in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema; e

(e) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (d) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (d) a (e) avviene senza apertura del sistema.

La popolazione terapeutica della raccolta dei TIL nel passaggio (d) può comprendere TIL sufficienti per un dosaggio terapeuticamente efficace dei TIL.

Il numero dei TIL sufficiente per un dosaggio terapeuticamente efficace può essere da circa  $2,3 \times 10^{10}$  a circa  $13,7 \times 10^{10}$ .

Il metodo può comprendere inoltre il passaggio di crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta utilizzando un procedimento di crioconservazione.

Il procedimento di crioconservazione può essere eseguito utilizzando un rapporto 1:1 tra la popolazione dei TIL raccolta e il mezzo CS10.

La presente descrizione fornisce metodi per trattare un soggetto con cancro, il metodo comprendendo la somministrazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) espansi comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio

(c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema;

(g) il crioconservare facoltativamente la sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione; e

(h) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL dalla sacca per infusione nel passaggio (g) al paziente.

in cui non viene eseguita alcuna selezione della popolazione dei TIL durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (h). In un esempio, non viene eseguita alcuna selezione della seconda popolazione dei TIL (la popolazione pre-REP) sulla base del fenotipo prima di eseguire la seconda espansione del passaggio (d). In un esempio, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, o della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD8 durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (h).

La presente descrizione fornisce metodi per trattare un soggetto con cancro, il metodo comprendendo la somministrazione di linfociti infiltranti il tumore (TIL) espansi comprendente:

(a) l'ottenere una prima popolazione di TIL da un tumore resecato da un soggetto mediante il processamento di un campione di tumore ottenuto dal paziente in frammenti tumorali multipli;

(b) l'aggiungere i frammenti tumorali in un sistema chiuso;

(c) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-14 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei

TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-14 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL che comprende un'augmentata sottopopolazione di linfociti T effettori e/o di linfociti T della memoria centrale rispetto alla seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema;

(e) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (d), in cui la transizione dal passaggio (d) al passaggio (e) avviene senza apertura del sistema; e

(f) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (e) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (e) a (f) avviene senza apertura del sistema;

(g) la crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (f) utilizzando un procedimento di crioconservazione, in cui il procedimento di crioconservazione comprende la miscelazione di un mezzo di crioconservazione con la popolazione dei TIL raccolta;

(h) il somministrare un dosaggio terapeuticamente efficace della terza popolazione dei TIL dalla sacca per infusione nel passaggio (g) al paziente.

in cui non viene eseguita alcuna selezione della popolazione dei TIL durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (h). In un esempio, non viene eseguita alcuna selezione della seconda popolazione dei TIL (per esempio la popolazione pre-REP) sulla base del fenotipo prima di eseguire la seconda espansione del passaggio (d). In un esempio, non viene eseguita alcuna selezione della prima popolazione dei TIL, della seconda popolazione dei TIL, della terza popolazione dei TIL, o della popolazione raccolta dei TIL sulla base dell'espressione di CD8 durante qualsiasi dei passaggi da (a) ad (h). In alcuni esempi, il regime di linfodeplezione non mieloablativa viene somministrato prima di somministrare la popolazione dei TIL raccolta. In alcuni esempi, il regime di linfodeplezione non mieloablativa comprende i passaggi di somministrazione di ciclofosfamide a una dose di 60 mg/m<sup>2</sup>/giorno per due giorni cui segue la somministrazione di fludarabina a una dose di 25 mg/m<sup>2</sup>/giorno per cinque giorni.

In alcuni esempi, le cellule presentanti l'antigene sono cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). In alcuni esempi, le PBMC sono irradiate ed allogene. In alcuni esempi, le PBMC vengono aggiunte alla coltura cellulare ad uno qualsiasi dei giorni da 9 a 14 nel passaggio (c).

Le cellule presentanti l'antigene possono essere cellule presentanti l'antigene artificiali.

La raccolta nel passaggio (d) può essere eseguita utilizzando un sistema di lavorazione cellulare LOVO.

Il metodo può comprendere che la raccolta nel passaggio (d) è attraverso un sistema di lavorazione cellulare LOVO, quale il sistema prodotto LOVO da Fresenius Kabi. Il termine "sistema di lavorazione cellulare LOVO" si riferisce anche a qualsiasi strumento o dispositivo che può pompare una soluzione comprendente cellule attraverso una membrana o un filtro quale una membrana rotante o un filtro rotante in un ambiente di un sistema sterile e/o chiuso, permettendo il flusso continuo e la lavorazione cellulare per rimuovere il surnatante o il terreno di coltura cellulare senza pellettizzazione. In alcuni casi, il sistema di lavorazione cellulare può eseguire la separazione cellulare, il lavaggio, lo scambio di fluidi, la concentrazione, e/o altri passaggi di lavorazione cellulare in un sistema chiuso, sterile.

I frammenti tumorali possono essere frammenti multipli e comprendono da circa 4 a circa 50 frammenti, in cui ciascun frammento ha un volume di circa  $27 \text{ mm}^3$ . I frammenti multipli possono comprendere da circa 30 a circa 60 frammenti con un volume totale da circa  $1.300 \text{ mm}^3$  a circa  $1.500 \text{ mm}^3$ . I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con un volume totale di circa  $1.350 \text{ mm}^3$ . I frammenti multipli possono comprendere circa 50 frammenti con una massa totale da circa 1 grammo a circa 1,5 grammi.

I frammenti multipli possono comprendere circa 4 frammenti. I 4 frammenti possono essere posti in un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,1 cm, 0,2 cm, 0,3 cm, 0,4 cm, 0,5 cm, 0,6 cm, 0,7 cm, 0,8 cm, 0,9 cm, o 1 cm di diametro. I 4 frammenti possono essere di circa 0,1 cm, 0,2 cm, 0,3 cm, 0,4 cm, 0,5 cm, 0,6 cm, 0,7 cm, 0,8 cm, 0,9 cm, o 1 cm di diametro e vengono posti in un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,1 cm, 0,2 cm, 0,3 cm, 0,4 cm, 0,5 cm, 0,6 cm, 0,7 cm, 0,8 cm, 0,9 cm, o 1 cm di diametro e vengono posti in un contenitore con un volume equivalente ad un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,5 cm di diametro e possono essere posti in un G-REX-100. I 4 frammenti possono essere di circa 0,5 cm di diametro e possono essere posti in un contenitore con un volume equivalente ad un G-REX-100.

Il terreno di coltura cellulare può essere fornito in un contenitore scelto nel gruppo composto da un contenitore G e una sacca cellulare Xuri.

La sacca per infusione nel passaggio (e) può essere una sacca per infusione contenente HypoThermosol.

Il primo periodo nel passaggio (b) e il secondo periodo nel passaggio (c) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 10 giorni, 11 giorni, o 12 giorni. Il primo periodo nel passaggio (b) e il secondo periodo nel passaggio (c) possono essere ciascuno eseguito singolarmente entro un periodo di 11 giorni. I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 25 giorni a circa 30 giorni. I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 25 giorni. I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 22 giorni. I passaggi da (a) ad (e) possono essere eseguiti in 22 giorni o meno. I passaggi da (a) ad (e) e la

crioconservazione possono essere eseguiti in 22 giorni o meno.

I passaggi da (b) a (e) possono essere eseguiti in un singolo contenitore, in cui l'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in un singolo contenitore risulta in un aumento della resa dei TIL per tumore resecato in confronto all'esecuzione dei passaggi da (b) a (e) in più di un contenitore.

Le cellule presentanti l'antigene possono essere aggiunte ai TIL durante il secondo periodo nel passaggio (c) senza apertura del sistema.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti nella popolazione terapeutica dei TIL possono esibire una o più caratteristiche scelte dal gruppo composto da espressione di CD27+, espressione di CD28+, telomeri più lunghi, aumentata espressione di CD57, e diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

I linfociti T effettori e/o i linfociti T della memoria centrale ottenuti nella popolazione terapeutica dei TIL possono esibire un'aumentata espressione di CD57 e una diminuita espressione di CD56 rispetto ai linfociti T effettori, e/o ai linfociti T della memoria centrale ottenuti dalla seconda popolazione di cellule.

Il rischio di contaminazione microbica può essere ridotto in confronto a un sistema aperto.

I TIL dal passaggio (e) possono essere infusi in un paziente.

Il contenitore chiuso può comprendere un bioreattore singolo. In alcune forme di realizzazione, il contenitore chiuso comprende un G-REX-10. In alcune forme di realizzazione, il contenitore chiuso comprende un G-REX-100.

## **ESEMPI**

Le forme di realizzazione comprese qui vengono ora descritte con riferimento agli esempi seguenti. Questi esempi vengono forniti al solo scopo di informazione e la descrizione compresa qui non dovrebbe in alcun modo essere intesa come essere limitata a questi esempi, ma piuttosto dovrebbe essere intesa comprendere qualsiasi e tutte le variazioni che diventano evidenti come risultato degli insegnamenti forniti qui.

### **ESEMPIO 1: SAGGI A SISTEMA CHIUSO**

Come discusso qui, sono stati sviluppati protocolli e saggi per generare TIL da tumori di pazienti in un sistema chiuso.

Questo esempio descrive una nuova procedura abbreviata per generare numeri di TIL clinicamente pertinenti da tessuto tumorale resecato da pazienti in dispositivi G-REX e la crioconservazione del prodotto cellulare finale. Ulteriori aspetti di questa procedura vengono descritti negli esempi da 2 a 8.

### **Definizioni/Abbreviazioni**

BSC - cabina di sicurezza biologica

°C - gradi Celsius

CO<sub>2</sub> - biossido di carbonio

CD3 - cluster di differenziazione 3

CM1 - mezzo completo 1

CM2 - mezzo completo 2

TIWB - tampone di lavaggio di isolamento del tumore

CM4 - mezzo completo 4

CRF - congelatore programmabile

EtOH - etanolo

GMP - buone pratiche di fabbricazione

IL-2, rIL-2 - interleuchina 2, interleuchina 2 ricombinante umana

UI - unità internazionali

l - litro

LN<sub>2</sub> - azoto liquido

ml - millilitro

μl - microlitro

mM - millimolare

μM - micrometro

NA - non applicabile

PBMC - cellula mononucleata del sangue periferico

PPE - attrezzatura protettiva personale

pre-REP - colture iniziali di TIL che hanno origine da frammenti tumorali

REP - protocollo di espansione rapida

TIL - linfociti infiltranti il tumore

TIWB - tampone di lavaggio di isolamento dei TIL

SOP - procedura operativa standardizzata

Procedura

1. Preparazione preliminare: giorno 0 (eseguita fino a 36 ore in anticipo)

1.1 Preparare il tampone di lavaggio di isolamento dei TIL (TIWB) integrando 500 ml di soluzione salina bilanciata di Hank con 50 µg/ml di gentamicina. Per una soluzione madre di gentamicina 10 mg/ml, trasferire 2,5 ml in HBSS. Per una soluzione madre 50 mg/ml, trasferire 0,5 ml in HBSS.

1.2 Preparare il mezzo CM1 con GlutaMax™ mediante le istruzioni LAB-005 per il CM2 "Preparazione di mezzi per pre-REP e REP". Conservare a 4°C fino a 24 ore. Far riscaldare a 37°C per almeno 1 ora prima dell'uso.

1.3 Rimuovere la/e aliquota/e di IL-2 da congelatore a -20°C e porre la/e aliquota/e in frigorifero a 2-8°C.

2. Ricezione del tessuto tumorale

2.1 Conservare tutta la documentazione ricevuta con il tessuto tumorale e ottenere le foto del contenitore di trasporto e del tessuto tumorale.

2.2 Se è stato fornito il TempTale, stampare e salvare il documento associato; salvare il PDF.

2.3 Rimuovere il campione di tumore e il contenitore secondario (sacca con cerniera nella parte superiore) dallo spedizioniere e conservare a 4°C fino a che non è pronto per la lavorazione.

2.4 Spedire il tumore non utilizzato in HypoThermasol o come frammenti congelati in CryoStor CS10 (entrambi disponibili in commercio da BioLife Solutions, Inc.).

3. Lavorazione del tumore per i TIL

3.1 Trasferire asetticamente i materiali seguenti alla BSC, come richiesto, ed etichettarli secondo la tabella 3 sotto.

Tabella 3. Materiali per l'isolamento del tumore.

Articolo	Quantità minima	Etichetta durante la lavorazione
tumore	1	N/A
piastra di Petri, 150 mm	1	dissezione
piastra di Petri, 100 mm	4	lavaggio 1, 2, 3, 4
piastra di Petri, 100 mm	1	tessuto non favorevole

piastra da 6 pozzetti	2	etichetta del coperchio - “frammenti tumorali” parte inferiore della piastra - “tessuto favorevole”
righello	2	N/A
tampone di lavaggio	1	N/A
pinze	1	N/A
pinze lunghe	1	N/A
bisturi	come richiesto	N/A

3.2 Marcare i cerchi delle piastre dei frammenti tumorali con le lettere A-J.

3.3 Marcare le parti inferiori dei pozzetti delle piastre del tessuto favorevole con le lettere A-J.

3.4 Trasferire 5 ml di gentamicina alla bottiglia di HBSS. Marcare come TIWB.

3.5 Far girare vorticosamente per miscelare.

3.6 Pipettare 50 ml di TIWB a ciascuna delle seguenti:

1. Piastra di lavaggio 1

2. Piastra di lavaggio 2

3. Piastra di lavaggio 3

4. Piastra di lavaggio 4

3.7 Pipettare 2 ml di TIWB nei pozzetti A-J della piastra del tessuto favorevole.

3.8 Coprire le piastre del tessuto favorevole (parte inferiore della piastra da 6 pozzetti) con la piastra dei frammenti tumorali corrispondente (coperchio della piastra da 6 pozzetti).

3.9 Utilizzando pinze lunghe, rimuovere il/i tumore/i dalla bottiglia da campione e trasferirlo alla piastra di lavaggio 1.

3.10 Incubare il tumore a temperatura ambiente nella piastra di lavaggio 1 per 3 minuti.

3.11 Durante l’incubazione, rietichettare la bottiglia del campione con “carico biologico” e conservare a 2-8°C fino a che non verrà sottoposta al controllo di qualità per la valutazione.

3.12 Eliminare le pinze lunghe e utilizzare pinze corte per manipolazioni ulteriori.

- 3.13 Utilizzando delle pinze, trasferire il tumore alla piastra di lavaggio 2.
- 3.14 Incubare il tumore a temperatura ambiente nella piastra di lavaggio 2 per 3 minuti.
- 3.15 Utilizzando delle pinze, trasferire il tumore alla piastra di lavaggio 3.
- 3.16 Incubare il tumore a temperatura ambiente nella piastra di lavaggio 3 per 3 minuti.
- 3.17 Rimuovere le piastre dei frammenti tumorali (coperchi delle piastre da 6 pozzetti) dalle piastre del tessuto favorevole (fondi delle piastre da 6 pozzetti) e porre le piastre dei frammenti tumorali sottosopra sulla superficie della BSC.
- 3.18 Utilizzando una pipetta per trasferimento, aggiungere approssimativamente 4 gocce singole di TIWB uniformemente distanziate a ciascun cerchio delle piastre dei frammenti tumorali.
- 3.19 Porre un righello sotto la piastra da dissezione.
- 3.20 Utilizzando delle pinze, trasferire il tumore alla piastra da dissezione.
- 3.21 Utilizzando il righello sotto la piastra da dissezione, misurare e registrare la lunghezza del tumore.
- 3.22 Per tumori superiori a 1 cm, sono state realizzate ulteriori piastre del tessuto favorevole.
- 3.23 Eseguire una dissezione iniziale dei pezzi di tumore nella piastra da dissezione in 10 pezzi intermedi e fare attenzione a conservare la struttura del tumore di ciascun pezzo intermedio.
- 3.24 Trasferire qualsiasi pezzo intermedio di tumore che non viene attivamente sezionato in frammenti alla piastra di lavaggio 4 per garantire che il tessuto rimanga idratato durante l'intera procedura di dissezione.
- 3.25 lavorando con un pezzo di tumore intermedio alla volta, affettare con attenzione il tumore in frammenti fino a 3×3×3 mm nella piastra da dissezione, utilizzando il righello sotto la piastra per riferimento. Quando il bisturi si spunta, sostituirlo con un nuovo bisturi.
- 3.26 Continuare a dissezionare i frammenti dal pezzo di tumore intermedio fino a che tutto il tessuto nel pezzo intermedio è stato valutato.
- 3.27 Scegliere i frammenti favorevoli e, utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire fino a 4 frammenti favorevoli nelle gocce di TIWB in un cerchio nella piastra dei frammenti tumorali.
- 3.28 Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire qualsiasi frammento favorevole rimanente dal pezzo di tumore, quando disponibile, nel pozzetto corrispondente nella piastra del tessuto favorevole.
- 3.29 Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire quanto possibile del tessuto non favorevole e del prodotto di scarto alla piastra del tessuto non favorevole per pulire la piastra da dissezione. Il tessuto non favorevole è indicato da tessuto adiposo giallo o tessuto necrotico.

3.30 Continuare la lavorazione ripetendo i passaggi 7.3.25-7.3.30 per i rimanenti pezzi intermedi di tumore, lavorando un pezzo intermedio alla volta fino a che tutto il tumore non è stato trattato.

3.31 Se sono disponibili meno di 4 frammenti tumorali nel cerchio corrispondente della piastra dei frammenti tumorali, è accettabile utilizzare frammenti da un pozzetto non corrispondente della piastra del tessuto favorevole come disponibile per raggiungere lo scopo di 40 frammenti.

Quando meno di 40 frammenti, 10-40 sono stati posti in un pallone G-Rex 100M scelto.

#### 4. Semina del pallone G-Rex 100M

4.1 Trasferire asetticamente i materiali seguenti alla BSC, come richiesto, ed etichettarli secondo la tabella 4 sotto.

Tabella 4. Materiali addizionali per la semina dei palloni.

<b>Articolo</b>	<b>Quantità minima</b>	<b>Etichetta durante la lavorazione</b>
pallone G-Rex 100M	Come richiesto	# di lotto
CM1 caldo	Come richiesto	# di lotto
aliquote di IL-2	Come richiesto	# di lotto

4.2 Arricchire ciascun litro di CM1 con 1 ml di soluzione madre di IL-2 ( $6 \times 10^6$  UI/ml).

4.3 Porre 1.000 ml di CM1 preriscaldato contenente 6.000 UI/ml di IL-2 in ciascun bioreattore G-REX 100M richiesto come determinato mediante la tabella 5 sotto.

4.4 Utilizzando una pipetta per trasferimento, trasferire il numero appropriato di frammenti tumorali a ciascun pallone G-Rex 100M, distribuendo i frammenti secondo la tabella 5.

4.5 Quando uno o più frammenti tumorali trasferiti al pallone G-Rex 100M galleggiano, ottenere un ulteriore frammento tumorale se disponibile dalla piastra del tessuto favorevole e trasferirlo al pallone G-Rex 100M.

4.6 Registrare il numero totale di frammenti aggiunti a ciascun pallone.

4.7 Eliminare la piastra del tessuto non favorevole.

4.8 Porre ciascun bioreattore G-REX 100M in un incubatore a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%.

4.9 Quando sono disponibili più di 40 frammenti:

4.9.1. Quando sono stati ottenuti >41 frammenti, porre 1.000 ml di CM1 completo preriscaldato in un secondo bioreattore G-REX 100M.

Tabella 5. Numero di bioreattori G-REX richiesto.

Numero di frammenti	G-REX	Numero di G-REX	CM1 richiesto
1-40	G-REX 100M	1	1.000 ml
41-80 distribuiti tra i palloni	G-REX 100M	2	2.000 ml
>80	Congelare i frammenti in CS10 dopo 15 minuti di preincubazione		

5. Preparazione preliminare: giorno 11 (preparata fino a 24 ore in anticipo)

5.1 Preparare 6 l di CM2 con GlutaMax. Utilizzare le procedure di laboratorio di riferimento per la “preparazione di mezzi per pre-REP e REP” mediante le istruzioni per il CM2”. Scaldare a 37°C un’ora prima dell’uso.

5.2 Scongellare le aliquote di IL-2: rimuovere le aliquote di IL-2 dal congelatore e porle a 4°C.

6. raccolta dei TIL (giorno 11)

6.1 Rimuovere con attenzione i palloni G-REX-100M dall’incubatore e porli nella BSC2. Stare attenti a non danneggiare le cellule sulla parte inferiore del pallone.

6.2 Utilizzando GatherRex o una pompa peristaltica, aspirare ~900 ml di surnatante della coltura cellulare dal/i pallone/i.

6.3 Risospendere i TIL facendo ruotare delicatamente il pallone. Osservare che tutte le cellule siano state liberate dalla membrana.

6.4 Utilizzando la pompa peristaltica o GatherRex, trasferire la sospensione cellulare residua ad una sacca per il trasferimento del sangue di dimensioni appropriate (300-1.000 ml). Fare attenzione a non permettere che i frammenti vengano trasferiti alla sacca per il trasferimento del sangue.

6.5 Iniettare la sacca da trasferimento con un sistema di trasferimento del plasma da 4” (garantire che il morsetto sia chiuso).

6.6 Massaggiare la confezione per garantire che la sospensione cellulare sia ben miscelata e utilizzando una siringa da 3 ml, rimuovere 1 ml di sospensione di TIL per le conte cellulari. Fissare i tubi e ritappare il connettore luer femmina con un nuovo tappo luer sterile.

6.7 Porre la sacca da trasferimento in una sacca di plastica con cerniera nella parte superiore e rimetterla nell’incubatore fino a che non è pronta per l’uso.

## 7. Preparazione dei mezzi

7.1 Permettere che i mezzi si riscaldino a 37°C per > 1 ora.

7.2 Aggiungere 3 ml di soluzione madre di rhIL-2  $6 \times 10^6$  UI/ml a 6 l di CM2 per raggiungere una concentrazione finale di 3.000 UI/ml di rhIL-2.

Marcare come “CM2 completo”.

7.3. Saldare in modo sterile un sistema di trasferimento del plasma da 4” con un luer femmina ad una sacca da trasferimento da 1 l.

7.4 Trasferire 500 ml di CM2 completo ad una sacca da trasferimento da 1 l. Staccare il sistema di trasferimento di fluidi o la siringa e attaccare una spina luer sterile al portello luer femmina.

7.5 Inserire nella confezione un accoppiatore del sito di campionamento.

7.6 Utilizzando una siringa da 1,0 ml con ago, prelevare 150 µl di anti-CD3 1 mg/ml (clone OKT3) e trasferire a 500 ml di “CM2 completo” attraverso l'accoppiatore del sito di campionamento. Aspirare sulla siringa per garantire che tutto il reagente sia stato risciacquato dalla linea.

Conservare a 37°C fino al momento dell'uso.

## 8. Preparazione dei palloni

8.1 Trasferire 4,5 l di “CM2 completo” ad un pallone G-REX-500M utilizzando le gradazioni sul pallone per riferimento.

8.2 Porre il pallone in un incubatore a 37°C fino a che non è pronto.

## 9. Scongellare le cellule nutritive irradiate

9.1 Utilizzare  $5,0 \times 10^9$  cellule nutritive allogene irradiate da due o più donatori per l'uso.

9.2 Rimuovere le cellule nutritive dal congelatore LN2 e porle in una sacca da trasporto per rischio biologico.

9.3 Con le sacche di cellule nutritive nella sacca da trasporto per rischio biologico, scongelare le cellule nutritive in un incubatore a 37°C o un bagno di sfere. Mantenere le sacche statiche e sommerse. Rimuovere le cellule nutritive dal bagno quando quasi completamente scongelate ma ancora fredde.

9.4 Spruzzare o pulire le sacche di cellule nutritive con EtOH al 70% e porre nella BSC2. Aggiungere ciascuna sacca di cellule nutritive direttamente al G-REX-500M aperto per assicurare un numero sufficiente di cellule irradiate ( $5 \times 10^9$  cellule,  $\pm 20\%$ ).

9.5 Chiudere entrambe le pinze su un raccordo Fenwal di tipo a Y con una chiusura luer maschio.

9.6. Inserire in ciascuna sacca di cellule nutritive una gamba del raccordo ad Y.

9.7 Rimuovere la sacca da trasferimento da 1 l con 500 ml di “CM2 completo” + OKT3 e trasferirla alla BSC.

9.8 Collegare asetticamente una siringa da 60 ml ad un rubinetto d'arresto a 3 vie, e collegare asetticamente la sacca da trasferimento all'estremità maschio dell'arresto.

9.9 Collegare asetticamente il raccordo ad Y al rubinetto d'arresto a 3 vie.

9.10 Aspirare l'intero contenuto delle sacche di cellule nutritive nella siringa, registrare il volume, e distribuire  $5,0 \times 10^9$  cellule nutritive allogene irradiate nella sacca da trasferimento.

9.11 pinzare e staccare la sacca da trasferimento dall'apparecchio, e inserire nella chiusura luer femmina una nuova spina luer sterile.

9.12 Utilizzando un ago e una siringa da 3 ml, aspirare 1 ml per le conte cellulari dall'accoppiatore del sito di campionamento.

9.13 Quando +/- il 10% del numero di cellule bersaglio ( $5,0 \times 10^9$ ) è stato raggiunto con una vitalità >70%, procedere.

9.14 Quando meno del 90% del numero di cellule bersaglio ( $5,0 \times 10^9$ ) è stato raggiunto con una vitalità >70%, scongelare un'altra sacca e ripetere

7.9.4-7.9.12. Quando più del 110% del numero di cellule bersaglio è stato ottenuto, calcolare il volume opportuno richiesto per la dose di cellule desiderata e procedere.

10. Co-coltura di TIL e cellule nutritive in pallone G-REX-500M

10.1 Rimuovere il pallone G-REX-500M contenente i mezzi preparati dall'incubatore e porlo nella BSC2.

10.2 Attaccare la sacca da trasferimento di cellule nutritive al G-REX-500M e permettere al contenuto della sacca di drenare nel 500M.

10.3 Rimuovere la sospensione di TIL dall'incubatore e porla nella BSC.

10.4 Calcolare il volume della sospensione dei TIL da aggiungere per raggiungere  $200 \times 10^6$  cellule vitali totali.

$$(TVC/ml)/200 \times 10^6 = ml$$

10.5. Quando i TIL sono tra 5 e  $200 \times 10^6$  cellule vitali totali, aggiungere tutti i TIL (volume totale) al G-REX-500M. Quando i conta dei TIL è maggiore di  $200 \times 10^6$  cellule vitali totali, aggiungere il volume calcolato necessario per  $200 \times 10^6$  TIL da distribuire a un singolo G-REX-500M. I TIL rimanenti sono stati fatti precipitare e congelati in almeno due crioprovette a fino a  $10^8/ml$  in CS10, etichettate con l'identificazione dei TIL e la data di congelamento.

10.6 Porre il G-REX-500M in un incubatore a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% per 5 giorni.

11. Preparazione preliminare: giorno 16-18

11.1. Scaldare 1 sacca da 10 l di AIM-V per colture iniziate con meno di  $50 \times 10^6$  TIL, scaldarne 2 per quelle iniziate con più di  $50 \times 10^6$  TIL, a 37°C per almeno 1 ora o fino a che non sono pronte per l'uso.

12. Eseguire la conta delle cellule TIL: giorno 16-18

12.1 Rimuovere il pallone G-REX-500M dall'incubatore e porlo nella BSC2. Stare attenti a non danneggiare la coltura cellulare sulla parte inferiore del pallone.

12.2 Rimuovere asetticamente 4 l di terreno di coltura cellulare dal pallone G-REX-500M e porlo in un contenitore sterile.

12.3 Far girare vorticosamente il G-REX-500M fino a che tutti i TIL non sono stati risospesi dalla membrana.

12.4 Utilizzando GatherRex o una pompa peristaltica, trasferire la sospensione cellulare ad una sacca da trasferimento da 2 l. Conservare il pallone 500M per un uso successivo. Sigillare il portello con l'accoppiatore del sito di campionamento per evitare la perdita dei TIL.

12.5 Inserire nella sacca da trasferimento un accoppiatore del sito di campionamento e utilizzando una siringa da 3 ml e un ago rimuovere 2x1 ml di campioni indipendenti per una conta cellulare.

12.6 Calcolare il numero totale di palloni richiesti per la sottocoltura secondo la formula seguente. Arrotondare per eccesso le frazioni.

$$\text{Cellule vitali totali} / 1,0 \times 10^9 = \# \text{ di palloni}$$

13. Preparare il CM4

13.1 Preparare una sacca da 10 l di AIM-V ogni due palloni 500M richiesti. Scaldare ulteriore terreno secondo necessità.

13.2 Per ogni 10 l di AIM-V richiesto, aggiungere 100 ml di GlutaMAX per fare il CM4.

13.3 Arricchire il mezzo CM4 con rhIL-2 per una concentrazione finale di 3.000 UI/ml di rhIL-2.

14. Separare la coltura cellulare

14.1 Utilizzando le gradazioni sul pallone, riempire per gravità ciascun G-REX-500M a 5 l.

14.2 Distribuire equamente il volume dei TIL tra il numero calcolato di G-REX-500M.

14.3 Porre i palloni in un incubatore a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% fino alla raccolta al giorno 22 di REP.

15. Preparazione preliminare: giorno 22-24

15.1 Preparare 2 l del tampone di lavaggio con HSA all'1% aggiungendo 40 ml di HSA al 25% a ciascuna delle due sacche da 1 l di PlasmaLyte A 7,4. Raggruppare in una sacca LOVO complementare.

15.2 Arricchire 200 ml di CS10 con IL-2 a 600 UI/ml.

15.3 Preraffreddare quattro scatolette metalliche in alluminio per congelatore da 750 ml a 4°C.

16. raccolta dei TIL: giorno 22-24

16.1 Rimuovere i palloni G-REX-500M dall'incubatore a 37°C e porli nella BSC2. Stare attenti a non danneggiare la coltura cellulare sulla parte inferiore del pallone.

16.2 Aspirare ed eliminare 4,5 l di surnatante della coltura cellulare da ciascun pallone.

16.3 Far girare vorticosamente il pallone G-REX-500M per risospendere completamente i TIL.

16.4 Pesare la sacca per bioprocessi da 3-5 l prima dell'uso.

16.5 Utilizzando GatherRex o una pompa peristaltica, raccogliere i TIL nella sacca per bioprocessi.

16.6 Miscelare bene la sacca e utilizzando una siringa da 3 ml prelevare 2x2 ml di campioni dal portello della siringa per il campionamento per la conta cellulare.

16.7 Pesare la sacca e trovare la differenza tra il peso iniziale e finale. Utilizzare il seguente calcolo per determinare il volume di sospensione cellulare.

$$\text{Peso netto della sospensione cellulare (ml)} / 1,03 = \text{volume (ml)}$$

17. Filtrare i TIL e preparare la sacca d'origine LOVO

17.1 Porre la sacca contenente la coltura cellulare nella BSC2.

17.2 Porre un filtro da 170 µm per il sangue nella BSC2 e chiudere tutte le pinze.

17.3 Saldare in modo sterile una gamba d'origine del filtro alla sospensione cellulare.

17.4 Pesare una nuova sacca per bioprocessi appropriatamente dimensionata (questa è stata indicata come sacca d'origine LOVO).

17.5 Saldare in modo sterile l'estremità terminale del filtro alla sacca d'origine LOVO.

17.6 Elevare la sospensione cellulare appendendo le cellule su un palo per IV per installare un trasferimento di cellule a flusso di gravità.

Nota: (Non permettere alla sacca d'origine di pendere dall'apparecchio di filtrazione.)

17.7 Aprire tutte le pinze necessarie e permettere ai TIL di drenare dalla sacca della sospensione cellulare attraverso il filtro e nella sacca d'origine LOVO.

17.8 Una volta che tutte le cellule sono state trasferite alla sacca d'origine LOVO, chiudere tutte le pinze e sigillare i tubi della sacca d'origine LOVO per rimuovere il filtro.

17.9 Pesare la sacca d'origine LOVO e calcolare il volume.

17.10 La sacca d'origine LOVO è pronta per il LOVO.

17.11. Rimuovere le sacche dei prodotti finali LOVO dal kit monouso sigillando i tubi vicino la sacca.

18. Formulare i TIL 1:1 in CS10 freddo arricchito con 600 UI/ml di rhIL-2

18.1 Calcolare il numero richiesto di criosacche necessarie.

$$(Volume\ del\ prodotto\ cellulare \times 2) / 100 = numero\ di\ sacche\ richieste\ (arrotondare\ per\ difetto)$$

18.2 Calcolare il volume da dispensare in ciascuna sacca.

$$(Volume\ del\ prodotto\ cellulare \times 2) / numero\ di\ sacche\ richieste = volume\ da\ aggiungere\ a\ ciascuna\ sacca$$

18.3 Trasferire asetticamente i materiali seguenti nella tabella 6 alla BSC.

Tabella 6. Materiali per la crioconservazione dei TIL.

Articolo	Quantità minima	Etichetta durante la lavorazione
prodotto cellulare	1	# di lotto
cassetta in alluminio da congelatore (750 ml)	1	n/a
CS10 freddo + IL-2 @600 UI/ml	Come richiesto	# di lotto
dispositivo Cell Connect CC1	1	n/a
criosacche da 750 ml	calcolata	etichettare le aliquote da 1 al # più alto
siringa da 100 ml	# di criosacche + 1	n/a
rubinetto d'arresto a 3 vie	1	n/a
crioprovette	5	flaconcini satellite di crio-prodotto dei TIL

19. Formulazione dei TIL

19.1 Chiudere tutte le pinze sul Cell Connect CC1.

19.2 Al dispositivo Cell Connect collegare asetticamente la chiusura luer della sacca del prodotto finale LOVO con CS10 e il numero appropriato di criosacche. Sostituire la siringa da 60 ml con una siringa da 100 ml.

19.3 La quantità di volume di CS10 richiesto era equivalente al volume delle sacche dei prodotti finali LOVO.

19.4 Aprire la via del rubinetto d'arresto e collegare la linea tra le sacche dei prodotti finali LOVO e la siringa per aspirare il CS10 nella siringa, ricollegare il percorso del CS10. Collegare il percorso alla sacca cellulare per spingere il CS10 nelle sacche dei prodotti finali LOVO. Utilizzare la

siringa per misurare il volume aggiunto alle sacche dei prodotti finali LOVO. Ripetere come necessario utilizzando una nuova siringa fino a che viene trasferita la quantità desiderata di CS10.

19.5 Miscelare le sacche dei prodotti finali LOVO mediante inversione.

19.6 Sostituire la siringa da 100 ml.

19.7 Aprire le pinze sulle criosacche da 750 ml una alla volta.

19.8 Aprire solo le pinze che sono direttamente associate al prodotto formulato e alla criosacca in uso.

19.9 Utilizzare la siringa da 100 ml per misurare il volume di prodotto formulato diretto alla criosacca.

19.1. Trasferire 100 ml di prodotto formulato in ciascuna criosacca.

19.11 Dopo l'aggiunta a ciascuna sacca, aspirare sulla siringa per rimuovere tutte le bolle d'aria dalle criosacche e ricollegare la linea associata.

19.12 Sulla sacca finale aspirare un volume da conservare di 10 ml per la valutazione QC.

19.13 Sigillare ciascuna criosacca, lasciando quanti meno tubi possibile.

19.14 Rimuovere la siringa contenente il campione conservato e trasferirlo in una provetta conica da 50 ml; trasferire 1,5 ml in singole crioprovette e congelare in un congelatore a velocità controllata.

19.15 Trasferire le sacche sigillate a 4°C mentre vengono preparate le etichette.

19.16 Etichettare ciascuna criosacca con la descrizione del prodotto, il nome e la data, il volume, la conta cellulare, e la vitalità.

19.17 Porre ciascuna criosacca in scatolette metalliche in alluminio per congelatore preraffreddate.

20. Criococonservazione dei TIL utilizzando un congelatore programmabile (CRF)

20.1 Seguire la procedura standard per il congelatore a velocità controllata.

20.2 dopo aver utilizzato il CRF, conservare le criosacche in atmosfera di azoto liquido (LN<sub>2</sub>).

21. Determinare i risultati attesi e misurare i criteri di accettabilità.

## **ESEMPIO 2: PROCEDIMENTO ESEGUITO SUI TUMORI DI 8 PAZIENTI**

Il procedimento dell'esempio 1 è stato eseguito utilizzando i tumori di 8 pazienti per produrre 8 lotti di TIL. Il buon recupero dalla coltura, la vitalità, le conte cellulari, CD3+ (indicante la % del contenuto di linfociti T) e il rilascio di IFN-gamma (IFN-g o IFN- $\gamma$ ) sono stati ottenuti, come mostrato nella tabella 7 sotto e nelle figure dalla 7 alla figura 10.

Tabella 7. Risultati della valutazione dell'identità, della potenza, e della/del vitalità/recupero del procedimento dell'esempio 1.

IFN- $\gamma$ (pg/1e6 cellule/24 ore)		CD3 (%)	Cellule/ml (vitali + non vitali)	% di recupero	% di vitalità
				<b>Fresche/Lovo</b>	
<b>M1061T</b>	4.570	95,3	1,27E+08	103	88,1
<b>M1062T</b>	3.921	99,7	1,65E+08	89	84,5
<b>M1063T</b>	5.587	98,7	1,51E+08	112	82,1
<b>M1064T</b>	619	84,5	1,75E+08	83	86,8
<b>M1065T</b>	1.363	96,8	3,42E+07	128	76,4
<b>EP11001T</b>	4.263	90,4	1,82E+08	92	77,9
<b>M1056T</b>	6.065	94,2	2,11E+08	85	84,8
<b>M1058T</b>	1.007	99	2,72E+08	89	87,5

### ESEMPIO 3: SCALABILITÀ DEL PROCEDIMENTO DEI TIL MODIFICATO

Gli studi presentati qui sono stati eseguiti in un laboratorio di sviluppo di procedimenti (PD), e successivamente, è stato eseguito uno studio di qualificazione del procedimento (PQ) che utilizzava cicli di ingegnerizzazione nella camera pulita in accordo con le GMP presso un impianto di produzione. Tre corse di PQ/ingegnerizzazione sono state completate nella camera pulita dell'impianto in accordo con le GMP secondo un protocollo di qualificazione, e un registro dei lotti basato sugli studi di PD presentati qui. I criteri di accettabilità per i cicli di ingegnerizzazione sono stati impostati in prospettiva. Lo studio di PQ è ulteriormente riassunto sotto, e i risultati della prova ottenuti per i lotti di ingegnerizzazione vengono forniti nei seguenti sezioni.

Il numero di cellule generate da colture del protocollo di pre-espansione rapida (pre-REP) spesso superava  $100 \times 10^6$  cellule vitali. Inoltre, l'inclusione di un ciclo di congelamento/scongelamento tra i passaggi di coltura pre-REP e REP ha ridotto la resa di cellule vitali. Eliminando il passaggio di crioconservazione durante il procedimento, il REP potrebbe essere iniziato in modo affidabile e regolarmente con un numero aumentato di TIL. Questo cambiamento ha permesso di diminuire la durata del REP di una quantità proporzionale dei tempi di raddoppiamento delle cellule a grossolanamente 11 giorni senza impattare la dose di cellule. Inoltre, il tempo di coltura ridotto dall'attivazione alla raccolta risulta in un prodotto che è meno differenziato e potenzialmente meglio in grado di persistere *in vivo* (Tran 2008).

Lo studio di PD ha validato l'inizio della coltura REP con fino a  $200 \times 10^6$  cellule con un numero fissato di cellule nutritive. Il tempo ottimale per raccogliere la coltura REP è stato quindi valutato nell'arco di da 9 a 14 giorni. Le colture sono state seminate a rapporti tra cellule nutritive e TIL variabili da 100:1 a 25:1. L'ottimizzazione del tempo di raccolta è stata determinata misurando la conta cellulare totale, la vitalità, l'immunofenotipo, il consumo dei mezzi, l'analisi dei metaboliti, l'analisi dell'interleuchina 2 (IL-2), e le analisi funzionali descritte qui sotto.

L'immunofenotipizzazione delle cellule alla fine della coltura REP è stata valutata sulla base dei marcatori elencati nella tabella 8 sotto.

L'attivazione fenotipica e lo stadio di differenziazione delle cellule sono stati valutati. Non sono state osservate differenze statistiche nel fenotipo tra qualsiasi delle condizioni sperimentali.

Tabella 8. Marcatori di attivazione e di differenziazione valutati su colture di ottimizzazione del procedimento.

Bersaglio	Marcatore per il rilevamento	Clone
<b>Pannello 1</b>		
TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ )	PE/Cy7	IP26
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1
CD28	PE	CD28.2
CD4	FITC	OKT4
CD27	APC-H7	M-T271
CD56	APC	N901
CD8a	PB	RPA-T8
<b>Pannello 2</b>		
CD45RA	PE/Cy7	HI100
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
CCR-7	PE	150503
CD8	FITC	HIT8
CD4	APC/Cy7	OKT4
CD38	APC	HB-7

HLA-DR	PB	L243
<b>Pannello 3</b>		
CD137	PE/Cy7	4B4-1
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
Lag3	PE	3DS223H
CD8	FITC	HIT8
CD4	APCCy7	OKT4
PD1	APC	EH12.2H7
Tim-3	BV421	F38-2E2
Abbreviazioni: PE/Cy7 = coniugato in tandem ficoeritrina: Cy-7; PerCP-Cy5.5 = coniugato complesso di peridinina-clorofilla-proteina: Cy5.5; PE = ficoeritrina; FITC = coniugato di isotiocianato di fluoresceina; APC-H7 = coniugato in tandem alloficocianina: H7; APC = alloficocianina; PB = Pacific Blue™		

Il consumo di mezzo e la produzione di metaboliti rimanevano all'interno dei limiti tollerabili per tutte le condizioni testate; e i livelli di IL-2 rimanevano superiori a 150 UI/ml di surnatante della coltura (dati non mostrati).

L'uccisione delle cellule tumorali da parte dei linfociti T è intesa essere mediata dall'attivazione del recettore dei linfociti T sul linfocita T effettore in risposta a peptidi presentati sulla superficie delle cellule tumorali. I linfociti T espansi *ex vivo* devono mantenere la capacità di essere attivati e proliferare in risposta all'attivazione dei TCR se essi devono persistere *in vivo* a seguito dell'infusione e mediare la regressione del tumore.

Per valutare il potenziale dell'attivazione delle cellule sottoposte a coltura, TIL raccolti a momenti differenti sono stati riattivati con PBMC allogene irradiate caricate con OKT3. Le colture dei TIL sono state raccolte dopo 7 giorni e saggiate per l'espansione in termini di numero di volte. I risultati di questo studio vengono riassunti nella tabella 9.

Tabella 9. Riassunto dei risultati: proliferazione dei TIL post-REP a seguito di nuova coltura con PBMC allogene caricate con OKT3.

Giorno di raccolta	Espansione in termini di numero di volte	DS	Valore di P (test t di Student)
<b>Esperimento 1</b>			

giorno 9	43	6,088	NA
giorno 10	48	3,105	NA
giorno 11	71	11,137	0,135
giorno 14	60	6,995	
<b>Esperimento 2</b>			
giorno 9	44	6,276	NA
giorno 10	27	4,762	NA
giorno 11	72	18,795	0,045
giorno 14	41	7,050	
<b>Esperimento 3</b>			
giorno 9	54	5,810	NA
giorno 10	54	9,468	NA
giorno 11	65	1,674	0,071
giorno 14	50	8,541	

Questo studio ha dimostrato che il potenziale dei TIL di essere attivati in questo saggio è aumentato con ogni giorno di coltura fino al giorno 11 (giorni di raccolta 9-11). Le cellule raccolte al giorno 11 del procedimento modificato si sono comportate in modo simile ai TIL di controllo mantenuti in coltura per 14 giorni in modo simile al procedimento corrente.

Questi studi hanno dimostrato la scalabilità del procedimento dei TIL modificato e stabilito un intervallo accettabile di rapporti di semina tra i TIL e le cellule nutritive. Inoltre, è stato trovato che le caratteristiche di crescita persistevano fino al giorno 14 di coltura, mentre le condizioni di coltura rimanevano ottimali fino al giorno 11. Le condizioni testate non hanno mostrato alcun effetto misurabile sul fenotipo dei TIL. Le cellule raccolte al giorno 11 di coltura REP hanno dimostrato la miglior capacità di rispondere alla riattivazione mentre le condizioni di coltura cellulare rimanevano all'interno delle tolleranze. Queste variazioni sono state adottate e validate su scala completa con la separazione della coltura che avviene al giorno 5 e la raccolta al giorno 11.

I cicli di ingegnerizzazione sono stati attuati presso l'impianto di sviluppo di procedimenti allo scopo di acquisire esperienza nella produzione e di

testare il prodotto dei TIL prima della produzione in GMP del prodotto dei TIL autologhi per la somministrazione a pazienti. La procedura di produzione utilizzata per i cicli di ingegnerizzazione era alla stessa scala di quella da utilizzare nella produzione del prodotto dei TIL secondo GMP. L'esperienza nella crescita dei TIL da vari tipi di tumori, comprendenti metastasi di melanoma, della mammella, carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC), carcinoma del collo dell'utero, e cancro del polmone ha determinato che la dissezione e lo sviluppo dei TIL da campioni tumorali metastatici è simile per questi tumori (Sethuraman 2016, JTC P42). Poiché l'isolamento iniziale di frammenti tumorali e lo sviluppo di linfociti sembra essere simile tra istologie tumorali, questi cicli di ingegnerizzazione sono sufficienti per qualificare il procedimento per la produzione dei TIL da tumori HNSCC, cervicali e melanomi.

La tabella 10 mostra la fonte e le caratteristiche dei campioni tumorali utilizzati per i cicli di ingegnerizzazione.

Tabella 10. Campioni di tumore testati per i cicli di ingegnerizzazione.

Campione di tumore	Ciclo di ingegnerizzazione 1	Ciclo di ingegnerizzazione 2	Ciclo di ingegnerizzazione 3
ID del paziente	1001185	600-D455	40231
Fonte	Biotheme Research	BioOptions	Moffitt
Tessuto	Polmone, sinistro	Mammella, ERPR+Her2-	Melanoma
Data di processamento	5 gennaio 2017	12 gennaio 2017	26 gennaio 2017

La valutazione del rilascio dei tre cicli di ingegnerizzazione dei TIL presso l'impianto di sviluppo di procedimenti è stata completata (tabella 11) come descritto sotto. Il prodotto è stato testato al giorno 16 e al giorno 22. È stata anche determinata la secrezione di IFN- $\gamma$  per i tre cicli di ingegnerizzazione (tabella 12) come descritto in dettaglio altrove.

Tabella 11. Risultati della prova di rilascio dei prodotti per i cicli di ingegnerizzazione presso un impianto di sviluppo di procedimenti.

	Parametro	Metodo della prova	Criteri di accettabilità	Cicli di ingegnerizzazione		
				Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
giorno 16	sterilità*	BacTAlert	Nessuna crescita	nessuna crescita	nessuna crescita	nessuna crescita
	Micoplasma	PCR	negativo dalla separazione al giorno 7	negativo	negativo	negativo

giorno 22	vitalità (%)	AOPI	≥ 70%	82,3%	85,13%	84,6%
	cellule vitali totali	AOPI	Risultati del resoconto	$2,6 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{11}$
	sterilità	colorazione per Gram	negativo	negativo	negativo	negativo
	sterilità del prodotto finale*	BacT/Alert	nessuna crescita	negativo	negativo	in attesa
	% CD45 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>	citometria a flusso	≥ 90%	99,3%	96,3%	99,8%
	endotossina	EndoSafe	≤ 0,7 EU/ml	<0,5 EU/ml	<0,5 EU/ml	<0,5 EU/ml
	Micoplasma nel prodotto finale	PCR	negativo	negativo	negativo	negativo
	aspetto	ispezione visiva	sacca intatta senza alcun agglomerato visibile	sacca intatta, nessun agglomerato visibile	sacca intatta, nessun agglomerato visibile	sacca intatta, nessun agglomerato visibile

\*I risultati della sterilità finale al giorno 16 e al giorno 22 non sono disponibili fino a dopo il rilascio del prodotto finale per la spedizione. I risultati del colorante di Gram dal giorno 22 vengono utilizzati per il rilascio della spedizione in sterilità.

Tabella 12. Ulteriore caratterizzazione funzionale: misurazione della secrezione di IFN- $\gamma$ .

Caratterizzazione funzionale	Metodo	Risultati attesi	Cicli di ingegnerizzazione		
			Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
stimolazione dell'IFN- $\gamma$ con anti-CD3, CD28, CD137 (pg/milione di cellule)	ELISA	>2 deviazioni standard rispetto alle non stimulate	$3.085 \pm 182$	$2.363 \pm 437$	in attesa
non stimulate per IFN- $\gamma$ (pg/milione di cellule)	ELISA	non applicabile	$34 \pm 5$	$27 \pm 10$	in attesa

In conclusione, i dati dai cicli di ingegnerizzazione dimostrano che il prodotto farmaceutico dei TIL può essere prodotto con lo scopo della somministrazione autologa a pazienti.

#### **ESEMPIO 4: LINFODEPLEZIONE**

Le conte delle cellule possono essere prese al giorno 7 e prima della linfodeplezione. Il prodotto cellulare finale includeva fino ad approssimativamente  $150 \times 10^9$  cellule vitali formulate in un minimo di HypoThermosol™ al 50% in Plasma-Lyte A™ (volume/volume) e fino allo 0,5% di HSA (compatibile per infusione umana) contenente 300 UI/ml di IL-2. Il prodotto finale era disponibile per la somministrazione in uno di due volumi per infusione:

1) 250 ml (in una sacca per infusione con una capacità di 300 ml) quando i TIL raccolti totali sono  $\leq 75 \times 10^9$

#### **OPPURE**

2) 500 ml (in una sacca per infusione con una capacità di 600 ml) quando i TIL raccolti totali sono  $< 150 \times 10^9$

Il numero totale di cellule che potrebbero essere generate per il prodotto di infusione dei TIL finale per ciascun paziente a causa della variazione da paziente a paziente nei tassi di espansione dei linfociti T durante il passaggio REP non può essere previsto. Un limite inferiore di cellule al giorno 3, 4, 5, 6, 7 del REP da 3 a 14 giorni è regolato in base al numero minimo di cellule richiesto allo scopo di prendere la decisione di sottoporre a linfodeplezione il paziente utilizzando il regime di chemioterapia con ciclofosfamide più fludarabina. Una volta che abbiamo cominciato la linfodeplezione sulla base di questo numero di cellule minimo conseguito, ci impegniamo a trattare il paziente con il numero disponibile dei TIL che generiamo nel REP per qualsiasi dei giorni da 3 a 14, e in molti casi il giorno 7. Il limite superiore dell'intervallo per l'infusione ( $150 \times 10^9$  cellule vitali) è in base al limite superiore noto pubblicato infuso in modo sicuro dove è stata conseguita una risposta clinica. Radvanyi, et al., Clin. Cancer Res. 2012, 18, 6758-6770.

#### **ESEMPIO 5: PROCEDIMENTO 2A - GIORNO 0**

Questo esempio descrive il protocollo dettagliato del giorno 0 per il procedimento 2A descritto negli esempi da 1 a 4.

##### **Preparazione**

1. Confermare che il mezzo di lavaggio del tumore, il di CM1, e l'IL-2 siano all'interno della data di scadenza.
2. Porre il di CM1 (terreno per le cellule 1) in incubatore.

##### **Metodo.**

1. Pulire la cabina di sicurezza biologica (BSC).

2. Allestire piastre di sorveglianza durante il procedimento e lasciarle in cappa di sicurezza biologica per da 1 ora a 2 ore durante la procedura.
3. Porre il mezzo per i TIL CM1 nella cabina di sicurezza biologica.
4. Preparare il mezzo per i TIL CM1 contenente 6.000 UI/ml di IL-2:
  - 4.1 1 l di CM1
  - 4.2 1 ml di IL-2 (6.000.000 UI/ml)
  - 4.3 Porre 25 ml di CM1+IL2 in un pallone da 50 ml da utilizzare per i frammenti quando si aggiungono al G-REX.
  - 4.4 Porre in un incubatore a 37°C per preriscaldare
5. Pulire l'involucro del G-REX 100MCS con alcol al 70% e porre in cappa di sicurezza biologica. Chiudere tutte le pinze eccetto la linea del filtro.
6. Eseguire la calibrazione della pompa Acacia.
7. Attaccare la linea rossa del pallone G-REX 100MCS alla linea di uscita dell'avvio della pompa Acacia.
8. Attaccare il Pumpmatic alla linea d'ingresso dell'avvio della pompa e porre in bottiglia con il mezzo. Rilasciare le pinze per avviare la pompa.
9. Pompate i rimanenti 975 ml di CM1 preriscaldato contenente 6.000 UI/ml di IL-2 in ciascun bioreattore G-REX 100MCS.
10. Scaldare la linea rossa sigillata, disconnettere dall'avvio della pompa.
11. Porre l'etichetta sul G-REX.
12. Porre il G-REX 100MCS in incubatore fino a quando richiesto.

#### Dissezione del tessuto

1. Registrare il tempo di inizio della lavorazione del tumore.
2. Trasferire il mezzo di lavaggio del tumore alla BSC.
3. Porre 5 piastre di Petri da 100 mm in cappa di sicurezza biologica, 3 per i lavaggi, 1 per il mantenimento e 1 per il tessuto non favorevole. etichettare le piastre di conseguenza. Il tessuto non favorevole è indicato da tessuto adiposo giallo o tessuto necrotico.
4. Porre tre piastre da 6 pozzetti in cappa di sicurezza biologica.
5. Pipettare 3-5 ml di mezzo di lavaggio del tumore in ciascun pozzetto di una piastra da sei pozzetti per i pezzi di tumore in eccesso.
6. Pipettare 50 ml di mezzo di lavaggio del tumore per lavare le piastre 1-3 e la piastra di mantenimento.
7. Porre due piastre da dissezione da 150 mm in cappa di sicurezza biologica.
8. Porre 3 provette coniche sterili da 50 ml nella BSC.

9. etichettarne una come mezzo di lavaggio delle pinze per il tumore, la seconda come mezzo di lavaggio del bisturi per il tumore, e la terza per mezzo di lavaggio del tumore utilizzato per le gocce dei coperchi.
10. Aggiungere 5-20 ml di mezzo di lavaggio del tumore a ciascun pallone. Le pinze e i bisturi sono stati immersi nel mezzo di lavaggio del tumore come richiesto durante il lavaggio del tumore e il procedimento di dissezione.
11. Porre il bisturi e le pinze in provette appropriate.
12. Utilizzando pinze lunghe, rimuovere il/i tumore/i dalla bottiglia da campione e trasferirlo/i alla piastra di lavaggio 1.
13. Incubare il tumore a temperatura ambiente nella piastra di lavaggio 1 per  $\geq 3$  minuti.
14. Durante l'incubazione, rietichettare la bottiglia del campione come "carico biologico" e conservare a 2-8°C fino a che è richiesta la raccolta finale o un'ulteriore valutazione della sterilità.
15. Utilizzando delle pinze, trasferire il tumore alla piastra di lavaggio 2.
16. Incubare il tumore a temperatura ambiente nella piastra di lavaggio 2 per  $\geq 3$  minuti.
17. Durante l'incubazione, utilizzando una pipetta per trasferimento, aggiungere approssimativamente 4 gocce singole uniformemente distanziate di mezzo di lavaggio del tumore a ciascun cerchio dei coperchi delle piastre da 6 pozzetti indicati come piastre dei frammenti tumorali.
18. Utilizzando delle pinze, trasferire il tumore alla piastra di lavaggio 3.
19. Incubare il tumore a temperatura ambiente nella piastra di lavaggio 3 per  $\geq 3$  minuti.
20. Il coperchio della piastra da 150 mm è stato utilizzato per la dissezione. Porre un righello sotto.
21. Utilizzando delle pinze, trasferire il tumore alla piastra da dissezione, misurare e registrare la lunghezza del tumore.
22. Fare una fotografia del tumore.
23. Eseguire una dissezione iniziale dei pezzi di tumore nella piastra da dissezione in pezzi intermedi facendo attenzione a conservare la struttura del tumore di ciascun pezzo intermedio.
24. Trasferire qualsiasi pezzo intermedio di tumore che non viene attivamente sezionato in frammenti alla piastra di mantenimento del tessuto per garantire che il tessuto rimanga idratato durante l'intera procedura di dissezione.
25. Lavorare con un pezzo di tumore intermedio alla volta, affettare con attenzione il tumore in frammenti di approssimativamente 3×3×3 mm nella piastra da dissezione, utilizzando il righello sotto la piastra come riferimento
26. Continuare a dissezionare i frammenti dal pezzo di tumore intermedio fino a che tutto il tessuto nel pezzo intermedio è stato valutato.

27. Scegliere i frammenti favorevoli e, utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire fino a 4 frammenti favorevoli nelle gocce di mezzo di lavaggio in un cerchio nella piastra dei frammenti tumorali. Utilizzando una pipetta di trasferimento, un bisturi o pinze, trasferire quanto possibile del tessuto non favorevole e del prodotto di scarto alla piastra del tessuto non favorevole per pulire la piastra da dissezione. Tutto il tessuto rimanente è stato posto in uno dei pozzetti della piastra da sei pozzetti. (Il tessuto non favorevole è indicato da tessuto adiposo giallo o tessuto necrotico.)
28. Continuare la lavorazione ripetendo i passaggi 23-26 per i rimanenti pezzi intermedi di tumore, lavorando un pezzo intermedio alla volta fino a che non è stato trattato l'intero tumore. (ottenere un bisturi o pinze nuovi come richiesto, da decidere da parte del tecnico della lavorazione.)
29. Spostare le piastre dei frammenti verso la parte posteriore della cappa.
30. Utilizzando la pipetta di trasferimento, il bisturi, o le pinze, trasferire fino a 50 dei frammenti tumorali migliori alla provetta conica da 50 ml etichettata con frammenti tumorali contenente il CM1.
31. Rimuovere i corpi galleggianti dal pallone da 50 ml con una pipetta di trasferimento. Registrare il numero di frammenti e corpi galleggianti.
32. Rimuovere tutti gli articoli da cappa non necessari, conservando le piastre del tessuto favorevole se esse contengono frammenti extra. Pulire la cappa con una salvietta con alcol.
33. Rimuovere il G-REX 100MCS dall'incubatore, pulire con una salvietta con alcol al 70% e porre in cappa di sicurezza biologica.
34. Far girare vorticosamente il pallone con i frammenti tumorali e versare il contenuto sul pallone da 50 ml nel pallone G-Rex 100MCS
35. Se uno o più frammenti tumorali trasferiti al pallone G-Rex 100M galleggia/no, ottenere un ulteriore frammento tumorale quando disponibile dalla piastra del tessuto favorevole e trasferirlo al pallone G-Rex 100M.
36. Registrare il # di incubatore/i e il numero totale di frammenti aggiunti a ciascun pallone.
37. Porre il bioreattore G-REX 100M in un incubatore a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%
38. Qualsiasi tumore non utilizzato è stato posto in 100 ml di HypoThermosol e rilasciato al laboratorio.
39. Registrare il tempo di arresto della lavorazione del tumore.
40. Eliminare qualsiasi mezzo completo per i TIL inutilizzato contenente IL-2 e qualsiasi aliquota inutilizzata di IL-2.
41. Pulire la cabina di sicurezza biologica.
42. Porre il campione di carico biologico nelle condizioni opportune di immagazzinamento.
43. Registrare i dati.

44. Salvare l'immagine come file: identificativo del campione, # procedimento del tumore, data nel file del paziente preparato.

45. Ordinare ed assicurare la spedizione delle piastre di deposito al laboratorio di microbiologia.

#### **ESEMPIO 6: PROCEDIMENTO 2A - GIORNO 11**

Questo esempio descrive il protocollo dettagliato del giorno 11 per il procedimento 2A descritto negli esempi da 1 a 4.

Preparazione preliminare

1. Giorno prima della lavorazione:

1.1 IL CM2 potrebbe essere preparato il giorno prima che avvenga la lavorazione. Porre a 4°C.

2. Giorno di lavorazione.

2.1 Preparare l'impianto delle cellule nutritive.

2.1.1 Chiudere tutte le pinze su una serie di raccordi CC2 e 4S-4M60.

2.1.2. Saldare in modo sterile 4 deflussori dell'impianto 4S-4M60 alla linea del deflussore sul CC2 rimuovendo il deflussore.

2.1.3 Mettere da parte per il raggruppamento delle cellule nutritive.

2.2 Preparare 5 ml di mezzo di crioconservazione per CTF-FORM-318 e porre a 4°C fino a quando richiesto.

Monitoraggio ambientale della camera pulita - Pre-lavorazione

1. Registrare le informazioni della camera pulita.

2. Le cabine di biosicurezza (BSC) sono stati puliti con salviette grandi imbevute di alcol o con uno spray all'alcol.

3. Verificare le conte particellari per 10 minuti prima dell'inizio della lavorazione.

4. Allestire piastre di sorveglianza durante il procedimento e lasciarle in cappa di sicurezza biologica per da 1 ora a 2 ore durante la procedura.

Preparare il pallone G-REX-500MCS:

1. Utilizzando una siringa da 10 ml, trasferire asepticamente 0,5 ml di IL-2 (la soluzione madre è  $6 \times 10^6$  UI/ml) per ciascun litro di CM2 (terreno per le cellule 2) nella sacca per bioprocessi attraverso un connettore luer femmina sterile non utilizzato.

2. Utilizzare l'eccesso d'aria nella siringa per pulire la linea, prelevare un po' di mezzo dalla sacca ed espellerlo indietro. Questo assicura che tutta l'IL-2 venga miscelata con il mezzo. Miscelare bene.

3. Aprire la confezione esterno e porre il G-REX-500MCS nella BSC. Chiudere tutte le pinze sul dispositivo eccetto la linea del filtro grande.

4. Saldare in modo sterile la linea di raccolta rossa dal G-REX-500MCS alla linea di uscita dei tubi della pompa.

5. Collegare il luer femmina della sacca per bioprocessi al luer maschio dell'avvio della pompa.
6. Appendere la sacca per bioprocessi sul palo per IV, aprire le pinze e pompare 4,5 litri del mezzo CM2 nel G-REX-500MCS. Pulire la linea, la pinza, e sigillare a caldo.
7. Conservare la linea dalla pompa al mezzo. È stata utilizzata nel preparare le cellule nutritive.
8. Porre il G-REX-500MCS nell'incubatore.

#### Preparazione delle cellule nutritive irradiate

1. Sigillare e rimuovere il/i deflussore/i dalla TP da 1 l. Fissare entrambe le linee.
2. Registrare il peso secco di una sacca da trasferimento da 1 l (TP).
3. Saldare in modo sterile la sacca da trasferimento da 1 l all'avvio della pompa Acacia a ~12" dalla sacca.
4. L'altra estremità dei tubi della pompa è ancora connessa al Labyrinth da 10 l.
5. Pompare 500 ml di CM2 in peso nella TP.
6. Chiudere il morsetto e sigillare vicino alla giunzione saldata.
7. Porre in incubatore.
8. Verificare e scollegare le sacche di cellule nutritive.
9. Registrare lotto di cellule nutritive utilizzato.
10. Pulire le sacche con alcol.
11. Porre in sacche con chiusura a cerniera.
12. Scongela le cellule nutritive nel bagno d'acqua a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Registrare la temperatura del bagno d'acqua.
13. Rimuovere e far essiccare con una garza.
14. Passare le cellule nutritive attraverso il passaggio nella stanza di preparazione.
15. Trasferire alla BSC in camera pulita.
16. Utilizzando l'impianto di cellule nutritive preparato precedentemente, saldare la TP da 1 l con il mezzo a una delle linee non utilizzate sul lato del portello del campione del rubinetto d'arresto a 3 vie il più vicino possibile alla giunzione sigillata sciogliendo meno tubi possibile.
17. Mettere impianto di cellule nutritive nella BSC.
18. Inserire in ciascuna delle 3 sacche di cellule nutritive il deflussore dall'impianto di cellule nutritive nel singolo portello della sacca di cellule

nutritive.

19. Far ruotare la valvola del rubinetto d'arresto così che la TP da 1 l sia nella posizione "spenta".

20. Lavorando con una sacca alla volta, aprire le pinze sulla linea alla sacca di cellule nutritive, espellere l'aria nella siringa e aspirare il contenuto della sacca di cellule nutritive nella siringa. Espellere l'aria dalla siringa aiuta nel recupero delle cellule. Chiudere il morsetto alla sacca di cellule nutritive.

21. Registrare il volume recuperato di cellule nutritive scongelate in ciascuna sacca.

22. Far ruotare la valvola del rubinetto d'arresto così che la sacca di cellule nutritive sia nella posizione "spenta".

23. Aprire il morsetto sulla TP e dispensare il contenuto della siringa nella TP.

24. Assicurarsi che la linea sia stata pulita e pinzare di nuovo la TP. Potreste dover aspirare un po' d'aria nella siringa dalla TP per l'uso nella pulizia della linea.

25. Miscelare bene le cellule.

26. Chiudere il morsetto alla sacca di cellule nutritive.

27. Far ruotare il rubinetto d'arresto così che il portello della siringa sia nella posizione "spenta". Disconnettere la siringa da 60 ml dal rubinetto d'arresto.

28. Sostituire con una nuova siringa per ciascuna sacca di cellule nutritive.

29. Lasciare su la siringa dopo la sacca finale.

30. Miscelare bene la formulazione finale di cellule nutritive.

31. Far ruotare il rubinetto d'arresto così che la sospensione di cellule nutritive sia nella posizione "spenta".

32. Miscelare le cellule e utilizzando una siringa da 5 ml e un portello senza ago, risciacquare il portello con un po' di soluzione di cellule per garantire un campionamento accurato e rimuovere 1 ml di cellule, porle in provetta marcata per la conta.

33. Ripetere con una seconda siringa. Questi due campioni indipendenti hanno avuto ciascuno una singola conta cellulare eseguita.

34. Girare il rubinetto d'arresto così che la sospensione di cellule nutritive sia nella posizione "aperta" e utilizzando la siringa da 60 ml attaccata all'impianto espellere l'aria nella TP per pulire la linea.

35. Rimuovere la siringa e coprire il portello luer con un nuovo tappo sterile.

36. Sigillare a caldo la TP vicino alla giunzione saldata, rimuovere l'impianto.

37. Registrare la massa della sacca da trasferimento con la sospensione cellulare e calcolare il volume di sospensione cellulare.
38. Porre in incubatore.
39. Eseguire una singola conta cellulare sul campione di cellule nutritive e registrare i dati e allegare i dati grezzi della conta al registro del lotto.
40. Documentare il programma di conta Cellometer.
41. Verificare che sia stata inserita la diluizione corretta nel Cellometer.
42. Calcolare la densità totale delle cellule vitali nella sacca da trasferimento di cellule nutritive.
43. Se la conta cellulare era  $< 5 \times 10^9$ , scongelare più cellule, contarle, e aggiungerle alle cellule nutritive.
44. Ripesare la sacca di cellule nutritive e calcolare il volume.
45. Calcolare il volume delle cellule da rimuovere.

#### Aggiunta delle cellule nutritive al G-REX

1. Saldare in modo sterile un sistema di trasferimento da 4" alla TP delle cellule nutritive.
2. Nella BSC, attaccare una siringa di dimensioni appropriate al luer femmina saldato alla sacca da trasferimento di cellule nutritive.
3. Miscelare bene le cellule e rimuovere il volume calcolato nel passaggio 40 o 41 per raggiungere  $5,0 \times 10^9$  cellule. Eliminare cellule non richieste.
4. Utilizzando una siringa da 1 ml e un ago 18G prelevare 0,150 ml di OKT3, rimuovere l'ago e trasferire alla TP delle cellule nutritive attraverso il luer femmina.
5. Risciacquare i tubi e la siringa con le cellule nutritive e miscelare bene la sacca. Pulire la linea con l'aria dalla siringa.
6. Rimuovere il G-REX-500MCS dall'incubatore, pulire con fazzolettini imbevuti di alcol e porlo accanto all'SCD.
7. Saldare in modo sterile la sacca di cellule nutritive alla linea rossa sul G-REX-500MCS. Collegare la linea e permettere alle cellule nutritive di scorrere nel pallone per gravità.
8. Assicurarsi che la linea sia stata pulita completamente, quindi sigillare termicamente la linea vicino alla saldatura originale e rimuovere la sacca di cellule nutritive.
9. Riportare il G-REX-500MCS all'incubatore e registrare il tempo.

#### Preparare i TIL: registrare il tempo d'inizio della raccolta dei TIL

1. Rimuovere con attenzione il G-Rex 100MCS dall'incubatore e chiudere tutte le pinze eccetto la linea del filtro grande.
2. Saldare una sacca da trasferimento da 1 l alla linea rossa sul G-REX 100MCS.

3. Chiudere il morsetto su una TP da 300 ml. Saldare a caldo ~12 pollici dalla sacca rimuovendo il deflussore. Registrare il peso secco/la massa.
4. Saldare in modo sterile la sacca da trasferimento da 300 ml alla linea di raccolta delle cellule sul 100MCS vicino alla saldatura a caldo. Fissare la linea.
5. Rilasciare tutte le pinze che conducono alla TP da 1 l.
6. Utilizzando il GatheRex, trasferire ~900 ml del surnatante della coltura alla sacca da trasferimento da 1 l. Il Gatherex si ferma quando entra aria nella linea. Fissare la linea e saldare a caldo.
7. Far girare vorticosamente il pallone fino a che tutte le cellule non si staccano dalla membrana. Controllare la membrana per accertarsi che tutte le cellule si siano staccate.
8. Inclinare il pallone via dai tubi di raccolta e permesso ai frammenti tumorali di sedimentare lungo il bordo.
9. Inclinare lentamente il pallone verso i tubi di raccolta così che i frammenti rimangano sul lato opposto del pallone.
10. Utilizzando il GatheRex, trasferire la sospensione cellulare residua nella sacca da trasferimento da 300 ml evitando i frammenti tumorali.
11. Ricontrollare che tutte le cellule siano state rimosse dalla membrana.
12. Se necessario, controllavare rilasciando le pinze sul GatheRex e permettere ad un po' di mezzo di scorrere nel pallone G-Rex 100MCS per gravità.
13. Drenare vigorosamente il pallone per rilasciare le cellule e pomparle nella TP da 300 ml.
14. Dopo che il prelievo è stato completato, chiudere la linea rossa e saldare a caldo.
15. Sigillare a caldo la linea di raccolta lasciando grossolanamente la stessa lunghezza dei tubi di quando è stato registrato il peso secco.
16. Registrare la massa (compresa la massa secca) della TP da 300 ml contenente la sospensione cellulare e calcolare il volume di sospensione cellulare.
17. Nella BSC, inserire nella TP da 300 ml un impianto di trasferimento del plasma da 4". Miscelare bene le cellule. Collegare asetticamente una siringa da 5 ml, prelevare 1 ml, porlo in crioprovetta. Ripetere con una seconda siringa. Questi sono stati utilizzati per la conta cellulare, la vitalità.
18. Ricollegare e sostituire il tappo luer con nuovo tappo luer sterile.
19. Porre in incubatore e registrare il tempo di collocamento nell'incubatore.
20. Eseguire una singola conta cellulare su ciascun campione e registrare i dati e allegare i dati grezzi della conta al registro del lotto.
21. Documentare il programma di conta Cellometer.

22. Verificare che sia stata inserita la diluizione corretta nel Cellometer.
  23. Se necessario, regolare la densità totale dei TIL vitali a  $\leq 2 \times 10^8$  cellule vitali.
  24. Calcolare il volume da rimuovere o annotare che la regolazione non è necessaria.
  25. Nella BSC, collegare asetticamente una siringa di dimensioni appropriate alla TP da 300 ml.
  26. Se richiesto, rimuovere il volume di cellule calcolato nella tabella “calcolare il volume da rimuovere”.
  27. Fissare e sigillare termicamente la TP da 300 ml.
  28. Trasferire le cellule in eccesso ad una provetta conica di dimensioni appropriate e porle nell’incubatore con il tappo allentato per la crioconservazione successiva.
  29. Rimuovere il G-REX-500MCS dall’incubatore e porlo accanto all’SCD.
  30. Saldare in modo sterile la TP da 300 ml alla linea d’ingresso della pompa Acacia.
  31. Saldare in modo sterile la linea rossa del G-REX-500MCS alla linea di uscita della pompa Acacia.
  32. Pompare le cellule nel pallone.
  33. Assicurarsi che la linea sia stata pulita completamente, quindi sigillare termicamente la linea rossa vicino alla saldatura originale.
  34. Controllare che tutte le pinze sul G-REX-500MCS siano state chiuse eccetto la linea del filtro grande.
  35. Riportare il G-REX-500MCS all’incubatore e registrare il tempo di collocamento del G-Rex nell’incubatore.
  36. Ordinare ed assicurare la spedizione delle piastre di deposito al laboratorio di microbiologia.
- Crioconservazione dell’eccesso
- Quantità calcolata di mezzo di congelamento da aggiungere alle cellule:

Tabella 13: La concentrazione cellulare bersaglio era  $1 \times 10^8$ /ml

A. Cellule totali rimosse (dal passaggio 15)	ml
B. Concentrazione cellulare bersaglio	$1 \times 10^8$ cellule/ml
Volume di mezzo di congelamento da aggiungere (A/B)	ml

37. Far precipitare mediante centrifugazione i TIL a  $400 \times g$  per 5 minuti a  $20^\circ\text{C}$  con freno completo e accelerazione completa.
38. Aspirare asetticamente il surnatante.

39. Picchiettare delicatamente la parte inferiore della provetta per risospendere le cellule nel fluido rimanente.
40. Mentre si picchietta delicatamente la provetta, aggiungere lentamente il mezzo di congelamento preparato.
41. Suddividere in aliquote in crioprovette di dimensione appropriata e registrare il tempo di collocamento delle cellule a -80°C.

#### **ESEMPIO 7: PROCEDIMENTO 2A - GIORNO 16**

Questo esempio descrive il protocollo dettagliato del giorno 16 per il procedimento 2A descritto negli esempi da 1 a 4.

Monitoraggio ambientale della camera pulita - Pre-lavorazione.

1. Le cabine di biosicurezza sono state pulite con salviette grandi imbevute di alcol o con uno spray all'alcol.
2. Verificare le conte partecellari per 10 minuti prima dell'inizio della lavorazione.
3. Allestire piastre di sorveglianza durante il procedimento e lasciarle in cappa di sicurezza biologica per 1-2 ore durante la procedura.

Raccolta e conta dei TIL.

1. Scaldare una sacca da 10 l di CM4 per colture iniziate con meno di  $50 \times 10^6$  TIL in un incubatore a 37°C per almeno 30 minuti o fino a che non è pronta per l'uso.
2. Nella BSC collegare asetticamente un dispositivo di estensione Baxter ad una sacca Labtainer da 10 l.
3. Rimuovere il pallone G-REX-500MCS dall'incubatore e porlo sul bancone vicino al GatheRex. Controllare che tutte le pinze siano state chiuse eccetto la linea del filtro grande. Spostare il morsetto sulla linea di connessione rapida vicino alla giunzione a "T".
4. Saldare in modo sterile un Labtainer da 10 l alla linea di raccolta rossa sul G-REX-500MCS attraverso i tubi saldabili sull'estensione Baxter.
5. Saldare a caldo una sacca da trasferimento da 2 l 2" sotto la "Y" rimuovendo il deflussore e registrare il peso secco. Saldare in modo sterile la TP da 2 l alla linea di raccolta pulita sul G-REX-500MCS.
6. Sistemare il G-REX-500MCS su una superficie piana.
7. Collegare tutte le pinze che conducono al Labtainer da 10 l e utilizzando il GatheRex, trasferire ~4 l di surnatante della coltura al Labtainer da 10 l.
8. Raccogliere secondo le istruzioni di raccolta GatheRex appropriate.
9. Fissare la linea rossa e registrare il tempo di inizio della raccolta dei TIL.
10. GatheRex si ferma quando entra aria nella linea. Fissare la linea rossa.
11. Dopo la rimozione del surnatante, far girare vorticosamente il pallone fino a che tutte le cellule non si staccano dalla membrana. Inclinare il

pallone per garantire che la tubazione flessibile sia al bordo del pallone.

12. Rilasciare tutte le pinze che conducono alla TP da 2 l e utilizzando il GatheRex, trasferire la sospensione cellulare residua nella TP da 2 l mantenendo il bordo inclinato finché tutte le cellule non sono state raccolte.

13. Esaminare la membrana per le cellule aderenti.

14. Se necessario, controllare rilasciando le pinze nella linea rossa e permettere ad un po' di mezzo di scorrere nel pallone per gravità.

15. Chiudere la linea rossa e saldare triplamente a caldo.

16. Drenare vigorosamente il pallone per rilasciare le cellule.

17. Aggiungere le cellule alla TP da 2 l.

18. Sigillare a caldo la sacca da trasferimento da 2 l lasciando grossolanamente la stessa lunghezza dei tubi di quando è stato registrato il peso secco.

19. Conservare il G-REX-500MCS, è stato riutilizzato nella divisione.

20. Registrare la massa della sacca da trasferimento con la sospensione cellulare e calcolare il volume di sospensione cellulare.

21. Determinare il volume della sospensione cellulare, compresa la massa secca.

22. Saldare in modo sterile un sistema di trasferimento da 4" alla sacca della sospensione cellulare.

23. Nella BSC miscelare le cellule delicatamente e con una siringa da 20cc prelevare 11 ml e suddividerli in aliquote come mostrato nella tabella

14:

Tabella 14. Parametri di valutazione.

<b>Prova</b>	<b>Volume del campione</b>	<b>Recipiente</b>
Conta cellulare e vitalità	2 campioni da 2 ml	crioprovette
Micoplasma	1 ml	crioprovetta conservata a 4°C fino al completamento della valutazione.
Sterilità	1 ml	inoculati 0,5 ml in ciascuna bottiglia di coltura anaerobica ed aerobica
Flusso	2- 2 ml	conta delle cellule non utilizzate (crioconservate per una valutazione futura del lotto)
Cellule rimanenti		eliminate

24. Saldare a caldo. Chiudere la connessione luer mantenendo il morsetto.
25. Etichettare e porre la sospensione cellulare nell'incubatore e registrare il tempo di collocamento nell'incubatore.
26. Calcolare il nuovo volume.
27. Registrare il volume nella sacca da trasferimento da 2 l sulla base del volume di sospensione cellulare e del volume rimosso per il QC (11 ml).
28. Inoculare e ordinare la valutazione della sterilità.
29. Conservare il campione di micoplasma a 4°C nel supporto di attesa per la valutazione del micoplasma.
30. Mettere da parte fino a che i TIL sono stati seminati.

Conta cellulare:

Eseguire una singola conta cellulare e registrare i dati e allegare i dati grezzi della conta al registro del lotto. Documentare la diluizione. Documentare il programma di conta Cellometer. Verificare che sia stata inserita la diluizione corretta nel Cellometer.

Metodo continuato:

31. Calcolare il numero totale di palloni richiesti per la sottocoltura

\*\*Riutilizzare il recipiente originale e arrotondare per eccesso le frazioni di ulteriori recipienti.

Aggiunta di IL-2 al CM

1. Porre la sacca da 10 l di AIM-V con Glutamax nella BSC.
2. Inserire nella sacca con il mezzo un sistema di trasferimento del plasma da 4".
3. Attaccare un ago da 18G a una siringa da 10 ml e prelevare 5 ml di IL-2 nella siringa (la concentrazione finale è 3.000 UI/ml).
4. Rimuovere l'ago ed attaccare asetticamente la siringa al sistema di trasferimento del plasma e distribuire IL-2 nella sacca.
5. Far scorrere aria nella linea, prelevare un po' di mezzo e dispensarlo nella sacca. Questo assicura che tutta l'IL-2 sia nel mezzo.
6. Ripetere per le sacche di AIM-V rimanenti.

Preparare i palloni G-REX500MCS

1. Determinare la quantità di CM4 da aggiungere ai palloni. Registrare il volume di cellule aggiunte per pallone e il volume di CM4 5.000 ml-A.
2. Chiudere tutte le pinze eccetto la linea del filtro grande.
3. Saldare in modo sterile la linea d'ingresso della pompa Acacia al sistema di trasferimento del plasma da 4" sulla sacca con il mezzo contenente CM4.

4. Saldare in modo sterile la linea di uscita della pompa al G-REX-500MCS attraverso la linea rossa di raccolta.
5. Pompate una determinata quantità di CM4 nel G-REX-500MCS utilizzando le linee sul pallone come guide.
6. Sigillare a caldo la linea rossa del G-REX-500MCS.
7. Ripetere i passaggi 4-6 per ciascun pallone. Multipli palloni potrebbero essere riempiti allo stesso tempo utilizzando il riempimento per gravità o pompe multiple. Un raccordo a “y” potrebbe essere saldato alla linea di uscita della pompa e i due bracci saldati a due palloni G-REX-500MCS riempiendo entrambi allo stesso tempo.
8. Porre i palloni a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%.

Seminare i palloni con i TIL

1. Chiudere tutte le pinze sul G-REX-500MCS eccetto la linea del filtro grande.
2. Saldare in modo sterile la sacca del prodotto cellulare alla linea d'ingresso della pompa Acacia.
3. Saldare in modo sterile l'altra estremità della pompa alla linea rossa sul G-REX-500MCS.
4. Porre l'avvio della pompa nella pompa.
5. Porre la sacca del prodotto cellulare su una bilancia analitica e registrare il tempo di aggiunta dei TIL al pallone G-REX.
6. Azzerare il bilancio.
7. Collegare linee e pompate il volume di cellule richiesto nel G-REX-500MCS in peso assumendo che 1 g = 1 ml.
8. Girare la sacca cellulare sottosopra e pompate aria per pulire la linea. Scaldare la linea rossa sigillata del G-REX-500MCS. Porre il pallone in incubatore.
9. Saldare in modo sterile la linea di uscita della pompa al G-REX-500MCS successivo attraverso la linea rossa di raccolta.
10. Miscelare bene le cellule.
11. Ripetere il trasferimento cellulare per tutti i palloni.
12. Porre i palloni a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% e registrare il tempo di aggiunta dei TIL al pallone G-REX.
13. Ordinare la valutazione per le piastre di deposito al laboratorio di microbiologia.
14. Registrare i numeri di accesso.
15. Ordinare la valutazione per la sterilità aerobica ed anaerobica.
16. Assicurare la spedizione di piastre e bottiglie al laboratorio di microbiologia.

Crioconservazione del flusso o delle cellule in eccesso:

1. Quantità calcolata di mezzo di congelamento richiesto:

a. La concentrazione cellulare bersaglio era  $1 \times 10^8$ /ml; registrare le cellule totali rimosse. La concentrazione cellulare bersaglio era  $1 \times 10^8$  cellule/ml. Calcolare il volume totale di mezzo di congelamento da aggiungere.

2. Preparare il mezzo di crioconservazione e porlo a  $40^\circ\text{C}$  fino a quando richiesto.

3. Far precipitare mediante centrifugazione i TIL a  $400 \times g$  per 5 minuti a  $20^\circ\text{C}$  con freno completo e accelerazione completa.

4. Aspirare asetticamente il surnatante.

5. Picchiettare delicatamente la parte inferiore della provetta per risospendere le cellule nel fluido rimanente.

6. Mentre si picchietta delicatamente la provetta, aggiungere lentamente il mezzo di congelamento preparato.

7. Suddividere in aliquote in crioprovette etichettate di dimensioni appropriate.

8. Porre il flaconcino in un Mr. Frosty o equivalente e porlo in un congelatore a  $-80^\circ\text{C}$ .

9. Entro 72 ore, trasferire ad una posizione di immagazzinamento permanente e documentare e registrare la data e il tempo di collocamento in un congelatore a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **ESEMPIO 8: PROCEDIMENTO 2A - GIORNO 22**

Questo esempio descrive il protocollo dettagliato del giorno 22 per il procedimento 2A descritto negli esempi da 1 a 4.

Documentare i risultati di sterilità negativi durante il procedimento

Prima dell'inizio della raccolta, ottenere al giorno 16 risultati preliminari della sterilità da laboratorio di microbiologia. Contattare il Direttore del Laboratorio o la persona designata per ulteriori istruzioni se i risultati fossero positivi.

Monitoraggio ambientale della camera pulita - Pre-lavorazione

1. Verificare le conte particellari per 10 minuti prima dell'inizio della lavorazione.

2. Le cabine di biosicurezza sono state pulite con salviette grandi imbevute di alcol o con uno spray all'alcol.

3. Allestire piastre di sorveglianza durante il procedimento e lasciarle in cappa di sicurezza biologica per 1-2 ore durante la procedura.

Preparazione preliminare

1. In BSC collegare asetticamente un dispositivo di estensione Baxter ad una sacca Labtainer da 10 l o equivalente. etichettare la sacca del filtrato LOVO.

2. Porre tre sacche da 1 l di PlasmaLyte A nella BSC.
3. Preparare il raggruppamento e marcare le sacche di PlasmaLyte A con HSA all'1%.
  - 3.1 Chiudere tutte le pinze su un dispositivo di raccordo 4S-4M60 e iniettare ciascuna delle sacche di PlasmaLyte.
  - 3.2 Saldare una delle estremità maschio del 4S-4M60 alla linea d'ingresso dell'avvio della pompa Acacia.
  - 3.3 Saldare la linea di uscita dell'avvio della pompa ad una sacca per la raccolta da 3 litri. Chiudere tutte le pinze sulla sacca da 3 l eccetto la linea diretta alla pompa.
  - 3.4 Pompate i 3 litri di Plasmalyte nella sacca da 3 litri. Se necessario, rimuovere l'aria dalla sacca da 3 l mediante l'inversione della pompa.
  - 3.5 Chiudere tutte le pinze eccetto la linea con un luer femmina.
  - 3.6 Utilizzando due siringhe da 100 ml e aghi da 16-18G, caricare 120 ml di HSA al 25%. Attappare le siringhe con i tappi rossi.
  - 3.7 Attaccare una siringa al luer femmina sulla sacca da 3 litri e trasferire l'HSA alla sacca di PlasmaLyte da 3 l. Miscelare bene.
  - 3.8 Ripetere con una seconda siringa.
  - 3.9 Miscelare bene.
  - 3.10 Chiudere tutte le pinze.
  - 3.11 Utilizzando una siringa da 10 ml, rimuovere 5 ml di PlasmaLyte con HSA all'1% dal portello senza ago sulla sacca da 3 litri.
  - 3.12 Riattappare la siringa e mantenerla nella BSC per la diluizione di IL-2.
  - 3.13 Chiudere tutte le pinze.
  - 3.14 Sigillare a caldo rimuovendo la linea del luer femmina dall'avvio della pompa.
  - 3.15 Etichettare con il tampone di lavaggio LOVO e la data. Scade entro 24 ore a temperatura ambiente.

#### Preparazione di IL-2

1. Distribuire Plasmalyte/HSA all'1% da una siringa da 5 ml in una provetta conica sterile da 50 ml etichettata.
2. Aggiungere 0,05 ml di soluzione madre di IL-2 alla provetta contenente PlasmaLyte.
3. etichettare IL-2  $6 \times 10^4$ .
4. Attappare, etichettare e conservare a 2-8°C. Registrare i volumi.

#### Preparazione delle cellule

1. Chiudere tutte le pinze su una sacca Labtainer da 10 l. Attaccare un dispositivo di estensione Baxter alla sacca da 10 l mediante una connessione

luer.

2. Rimuovere i palloni G-REX-500M dai 37°C.
  3. Saldare in modo sterile la linea rossa di rimozione del mezzo dal G-REX-500MCS a un gruppo di estensione sulla sacca per bioprocessi da 10 l.
  4. Saldare in modo sterile la linea pulita di rimozione delle cellule dal G-REX-500MCS ad una sacca da 3 l per la raccolta ed etichettare "sospensione cellulare raggruppata".
  5. Collegare la linea rossa e la sacca da 10 l.
  6. Utilizzare la pompa GatheRex, ridurre il volume del primo pallone.
- Nota: se è stata rilevata una bolla d'aria, allora la pompa potrebbe arrestarsi prematuramente. Se la riduzione completa del volume non è stata completata, riattivare la pompa GatheRex.
7. Chiudere il morsetto sulla sacca del surnatante e sulla linea rossa.
  8. Far girare vorticosamente il pallone G-REX-500M fino a che i TIL sono completamente risospesi mentre si evitano spruzzi o la formazione di schiuma. Accertarsi che tutte le cellule siano state staccate dalla membrana.
  9. Aprire le pinze sulla linea pulita e sulla sacca cellulare da 3 l.
  10. Inclinare il pallone G-Rex in modo tale che la sospensione cellulare venga raccolta nel lato del pallone dove è localizzato il cannello di raccolta.
  11. Avviare il GatherRex per raccogliere la sospensione cellulare. Nota: se il cannello di raccolta delle cellule non è al congiungimento tra la parete e la parte inferiore della membrana, il picchiettare il pallone mentre è inclinato a un angolo di 45° è solitamente sufficiente per posizionare propriamente il cannello.
  12. Assicurarsi che tutte le cellule siano state rimosse dal pallone.
  13. Se rimangono cellule nel pallone, riaggiungere 100 ml di surnatante al pallone, far girare vorticosamente, e raccogliercle nella sacca della sospensione cellulare.
  14. Chiudere il morsetto sulla linea alla sacca per la raccolta delle cellule. Rilasciare le pinze sul GatheRex.
  15. Sigillare a caldo la linea pulita del G-REX-500MCS.
  16. Scaldare la linea rossa sigillata del G-REX-500MCS.
  17. Ripetere i passaggi 3-16 per ulteriori palloni.
  18. È necessario sostituire la sacca del surnatante da 10 l come richiesto dopo ogni secondo pallone.

19. Multipli GatherRex potrebbero essere utilizzati.
20. Documentare il numero del G-REX-500MCS trattato.
21. Sigillare a caldo sacca per la raccolta delle cellule. Registrare il numero di G-REX raccolti.
22. Con un pennarello fare un segno a ~2" da uno dei raccordi luer femmina su una nuova sacca per la raccolta da 3 litri.
23. Sigillare a caldo e rimuovere il luer femmina appena sotto il segno.
24. etichettare come sacca d'origine LOVO.
25. Registrare il peso secco.
26. Chiudere tutte le pinze di un filtro da 170 µm per il sangue.
27. Saldare in modo sterile l'estremità terminale del filtro alla sacca d'origine LOVO appena sotto il segno.
28. Saldare in modo sterile una linea d'origine del filtro alla sacca contenente la sospensione cellulare.
29. Elevare la sospensione cellulare appendendo le cellule su un palo per IV per iniziare il trasferimento di cellule a flusso di gravità. (Nota: Non permettere alla sacca d'origine di pendere dall'apparecchio di filtrazione.)
30. Aprire tutte le pinze necessarie e permettere ai TIL di drenare dalla sacca della sospensione cellulare attraverso il filtro e nella sacca d'origine LOVO.
31. Una volta che tutte le cellule sono state trasferite alla sacca d'origine LOVO, chiudere tutte le pinze, saldare a caldo appena sopra il segno e staccare per rimuovere il filtro.
32. Miscelare bene la sacca e utilizzando una siringa da 3 ml prendere 2 campioni indipendenti di 2 ml dal portello della siringa per il campionamento per la conta cellulare e la vitalità.
33. Pesare la sacca e determinare la differenza tra il peso iniziale e finale.
34. Registrare i dati e porre in incubatore, compresa la massa secca.

#### Conta cellulare

Eseguire una singola conta cellulare su ciascun campione e registrare i dati e allegare i dati grezzi della conta al registro del lotto. Documentare il programma di conta Cellometer. Verificare che sia stata inserita la diluizione corretta nel Cellometer. Determinare il numero totale di cellule nucleate. Determinare il numero di TNC da rimuovere per mantenere =  $1,5 \times 10^{11}$  cellule per la lavorazione LOVO. Porre le cellule rimosse in un contenitore di dimensioni appropriate per l'eliminazione.

## Raccolta LOVO

Il Labtainer da 10 l con estensione Baxter allestito nella preparazione preliminare era la sacca del filtrato di sostituzione saldata al kit LOVO più tardi. Accendere il LOVO e seguire le visualizzazioni a schermo.

Controllare le bilance e il sensore di pressione

Per accedere al profilo di operazione dello strumento:

1. Premere il pulsante delle informazioni.
2. Premere la schermata delle impostazioni dello strumento.
3. Premere il pulsante del profilo di operazione dello strumento.
4. Viene mostrato il profilo di operazione dello strumento.

Controllare le bilance

1. Accertarsi che non vi sia nulla appeso su qualsiasi delle bilance ed esaminare la lettura per ciascuna bilancia.
2. Se qualcuna delle letture delle bilance è all'esterno di un intervallo di  $0 \pm 2$  g, eseguire la calibrazione della bilancia come descritto nel Manuale di calibrazione delle bilance dal produttore.
3. Se tutte le bilance sono in tolleranza senza alcun peso pendente, procedere ad appendere un peso da 1 kg su ciascuna scala (#1-4) ed esaminare la lettura.
4. Se qualcuna delle letture delle bilance è all'esterno di un intervallo di  $1.000 \pm 10$  g quando un peso da 1 kg è stato appeso, eseguire la calibrazione della bilancia come descritto nel Manuale dell'operatore LOVO dal produttore.

Controllare il sensore di pressione

1. Esaminare il sensore di lettura della pressione sulla schermata del profilo di operazione dello strumento.
2. N/A: se la lettura del sensore di pressione è all'esterno di  $0 \pm 10$  mmHg, salvare una nuova impostazione della pressione atmosferica in modalità di servizio come descritto nel Manuale dell'operatore LOVO dal produttore.
  - a. Premere il pulsante di controllo sulla schermata del profilo di operazione dello strumento.
  - b. Premere il pulsante di controllo sulla schermata delle impostazioni dello strumento.
3. Se la calibrazione della bilancia è stata eseguita o una nuova impostazione della pressione atmosferica è stata salvata, ripetere le sezioni pertinenti.

Per iniziare la procedura, scegliere il protocollo di “raccolta dei G-Rex con i TIL” dal menu a tendina sulla schermata di selezione del protocollo e premere inizio.

1. Viene visualizzata la schermata di messa a punto della procedura.

2. Premere le pulsante delle informazioni sulle soluzioni.

3. Viene visualizzata la schermata della soluzione 1. Rivedere il tipo di tampone di lavaggio richiesto per la soluzione 1. (Si dovrebbe leggere PlasmaLyte.)

4. Premere il pulsante Avanti per passare alla schermata della soluzione 2. Esaminare il tipo di tampone di lavaggio richiesto per la soluzione 2. (Si dovrebbe leggere “nessuno”, indicando che il protocollo è stato configurato per utilizzare un solo tipo di tampone di lavaggio, che è PlasmaLyte)

5. Premere il pulsante di controllo sulla schermata delle informazioni sulla soluzione 2 per ritornare alla schermata di messa a punto della procedura.

6. Premere il pulsante delle informazioni sulla procedura.

7. Viene visualizzata la schermata delle informazioni sulla procedura.

8. Premere campo di immissione dell’ID dell’utilizzatore. Verrà mostrata una tastierina. Inserire le iniziali dell’esecutore e del verificatore. Premere il pulsante per accettare l’immissione.

9. Premere il campo di immissione dell’ID della fonte. Verrà visualizzata una tastierina. Immettere il # di lotto del prodotto. Premere il pulsante per accettare l’immissione.

10. Premere il campo di immissione dell’ID della procedura. Verrà visualizzata una tastierina. Immettere “raccolta dei TIL”. Premere il pulsante per accettare l’immissione.

11. Se vi sono note extra da registrare, toccare il campo di immissione delle note della procedura. Viene visualizzata una tastierina. Immettere qualsiasi nota. Premere il pulsante per accettare l’immissione.

**NOTE: Il campo di immissione delle note della procedura è facoltativo e può essere lasciato bianco.**

12. Premere il pulsante di controllo sulla schermata delle informazioni sulla procedura per ritornare alla schermata di messa a punto della procedura.

13. Verificare che venga visualizzato un “controlla” nel pulsante delle informazioni sulla procedura. Se non viene visualizzato un “controlla”, toccare ancora il pulsante delle informazioni sulla procedura ed assicurarsi che i campi dell’ID dell’utilizzatore, dell’ID della fonte, e dell’ID della

procedura siano tutti stati compilati.

14. Premere il pulsante di configurazione dei parametri.

15. Viene visualizzata la schermata delle informazioni generali sulla procedura.

16. Premere il campo di immissione del volume (ml) della fonte. Viene visualizzata una tastierina numerica. Immettere il volume calcolato di sospensione cellulare (ml) dalla tabella 1.

17. Premere il pulsante per accettare l'immissione.

18. Premere il campo di immissione del PCV (%) della fonte. Viene visualizzata la schermata dei TIL (vitali + morti).

19. Premere il campo di immissione della concentrazione cellulare. Viene visualizzata una tastierina numerica. Immettere la concentrazione cellulare totale/ml dalla tabella 14 nel prodotto d'origine nelle unità di "× 10<sup>6</sup>/ml". L'immissione potrebbe variare da 00,0 a 99,9. Premere il pulsante per accettare l'immissione e ritornare alla schermata delle informazioni generali sulla procedura. NOTE: dopo che la concentrazione cellulare è stata accettata, il campo di immissione del PCV (%) della fonte sulla schermata delle informazioni generali sulla procedura mostra il PCV% calcolato mediante il LOVO, in base all'inserimento della concentrazione cellulare fatto da parte dell'operatore.

20. Sulla schermata della procedura generale, premere il pulsante Avanti per passare alla schermata 4 di 8, la schermata del volume del prodotto finale (volume di retentato). Nota: le schermate 2 e 3 non avevano alcun campo di immissione da riempire da parte dell'operatore.

21. Viene visualizzata la schermata del volume del prodotto finale (volume di retentato).

22. Utilizzando il valore delle cellule nucleate totali (TNC) dalla tabella 15, determinare il volume del prodotto finale desiderato nella tabella sotto (tabella 16). Immettere il volume di prodotto finale (ml) associato a tale intervallo cellulare durante la messa a punto della procedura LOVO.

Tabella 15. Determinazione del volume del prodotto finale desiderato.

Intervallo cellulare	Volume del prodotto finale (retentato) da ottenere (ml)
$0 < \text{cellule totali (vitali + morte)} \leq 7,1E10$	150
$7,1E10 < \text{cellule totali (vitali + morte)} \leq 1,1E11$	200
$1,1E11 < \text{cellule totali (vitali + morte)} \leq 1,5E11$	250

Tabella 16. Volume del prodotto desiderato.

Cellule nucleate totali (TNC) x 10 <sup>6</sup>	Volume bersaglio del prodotto finale (retentato) (ml)
---	---

23. Per ottenere il volume specificato dalla tabella 16, toccare il campo di immissione del volume del prodotto finale (ml). Viene visualizzata una tastierina numerica. Immettere il volume del prodotto finale desiderato in unità di ml. Premere il pulsante per accettare l'immissione.

24. Premere sulla schermata del volume del prodotto finale (volume di retentato) per ritornare alla schermata di messa a punto della procedura.

Nota: Le schermate 5-8 non avevano alcun campo di immissione da riempire da parte dell'operatore.

25. Verificare che venga visualizzato un "controlla" nel pulsante di configurazione dei parametri. Se non viene visualizzato un "controlla", toccare ancora il pulsante delle informazioni sulla procedura ed assicurarsi che il volume della fonte e il PCV della fonte a pagina 1 siano stati immessi.

Assicurarsi inoltre che la casella di spunta del volume minimo del prodotto finale bersaglio è stata controllata OPPURE che il campo del volume del prodotto finale (ml) sia stato immesso a pagina 4.

26. Premere il pulsante di calcolo all'angolo in alto a destra della schermata.

27. Viene visualizzata la schermata del riassunto dei calcoli. Confermare che i valori siano sufficienti ed accurati per la fonte e il tampone di lavaggio PlasmaLyte.

28. Caricare il kit monouso: Seguire le istruzioni della schermata per il caricamento del kit selezionando il pulsante Aiuto "(?)".

29. Annotare i volumi mostrati per il filtrato e la soluzione 1 (leggere PlasmaLyte)

30. Annotare i volumi mostrati per il filtrato e la soluzione 1 (leggere PlasmaLyte).

31. Per istruzioni sul caricamento del kit monouso premere il pulsante Aiuto o seguire le istruzioni in manuale degli operatori per istruzioni dettagliate.

32. Quando il kit monouso LOVO standard è stato caricato, premere il pulsante Avanti. Viene visualizzata la schermata delle informazioni e della posizione del contenitore. Rimuovere la sacca del filtrato dalla bilancia #3.

33. Per questo protocollo, il contenitore del filtrato è nuovo e fuori scala.

34. Se il contenitore del filtrato viene già mostrato come nuovo e fuori scala, non si fa alcuna variazione.

35. Se il tipo del contenitore del filtrato viene mostrato come originale, premere il pulsante Originale per passare a Nuovo.

36. Se la posizione del filtrato viene mostrata come in scala, premere il pulsante In Scala per passare a fuori scala.

37. Se il volume di filtrato da generare è  $\leq 2.500$  ml, la posizione del contenitore del filtrato viene mostrata come in scala per consistenza tra le

corse, la posizione del contenitore del filtrato viene cambiata a fuori scala e il tipo di contenitore è “nuovo”.

38. Premere il pulsante In Scala per passare a fuori scala. Attaccare sistema di trasferimento. Usare una tecnica di saldatura sterile per sostituire il contenitore del filtrato del kit monouso LOVO con una sacca da 10 l. Aprire la saldatura.

39. Porre il contenitore del filtrato sul bancone. Non appendere la sacca del filtrato sulla bilancia #3. La bilancia #3 era vuota durante la procedura.

40. Aprire qualsiasi pinza di plastica sui tubi che conducono al contenitore del filtrato. NOTE: se i tubi sono stati rimossi dal morsetto a F durante la saldatura, sostituirli nel morsetto.

41. Premere il campo di immissione della capacità del contenitore del filtrato. Viene visualizzata una tastierina numerica. Immettere la nuova capacità del filtrato totale (10.000 ml). Premere il pulsante “controlla” per accettare l’immissione.

42. Utilizzare una tecnica di saldatura sterile per sostituire il contenitore del filtrato del kit monouso LOVO con una sacca da 10 l. Aprire la saldatura. Nota: se tubi sono stati rimossi dal morsetto a F durante la saldatura, sostituirli nel morsetto.

43. Porre il nuovo contenitore del filtrato sul bancone. Non appendere la sacca del filtrato sulla bilancia #3. La bilancia #3 era vuota durante la procedura.

44. Aprire qualsiasi pinza di plastica sui tubi che conducono al contenitore del filtrato.

45. Per il contenitore del retentato, la schermata mostra originale e in scala.

46. Non è stata fatta alcuna variazione al contenitore del retentato.

47. Quando sono state fatte tutte le variazioni al contenitore del filtrato e sono state immesse le informazioni appropriate, premere il pulsante Avanti.

48. Viene visualizzata la sovraimpressione dei controlli a vuoto del kit monouso. Controllare che il kit sia stato caricato propriamente, quindi premere il pulsante Sì.

49. Tutte le pinze meccaniche LOVO si chiudono automaticamente e viene visualizzata la schermata dell’installazione del controllo del kit monouso. Il LOVO attraversa una serie di passaggi di pressurizzazione per verificare il kit.

50. Dopo che il controllo del kit monouso è stato passato con successo, viene visualizzata la schermata della connessione delle soluzioni.

51. 3 l è il volume di lavaggio. Immettere questo valore nella schermata.

52. Utilizzare una tecnica di saldatura sterile per attaccare la sacca da 3 l di PlasmaLyte al tubo che passa attraverso il morsetto 1. Aprire la saldatura.

53. Appendere la sacca di PlasmaLyte su un palo per IV.
54. Aprire qualsiasi pinza di plastica sui tubi che conducono alla sacca di PlasmaLyte.
55. Verificare che l'immissione del volume della soluzione sia 3.000 ml. Questo è stato precedentemente inserito.
56. Premere il pulsante Avanti. Viene visualizzata la sovraimpressione della preparazione del kit monouso. Verificare che il PlasmaLyte sia stato attaccato e qualsiasi saldatura e pinza di plastica sui tubi che conducono al PlasmaLyte siano state aperte, quindi premere il pulsante Sì. NOTE: poiché solo un tipo di tampone di lavaggio (PlasmaLyte) è stato utilizzato durante la procedura LOVO, nessuna soluzione è stata attaccata al tubo che passa attraverso il morsetto 2. Il morsetto Roberts su questi tubi rimane chiuso durante la procedura.
57. La preparazione del kit monouso ha inizio e viene visualizzata la schermata della preparazione del kit monouso. Osservare visivamente che il PlasmaLyte si muova attraverso i tubi connessi alla sacca di PlasmaLyte. Se non si muove alcun fluido, premere il pulsante Pausa sulla schermata e determinare se un morsetto o una saldatura è ancora chiuso/a. Dopo che il problema è stato risolto, premere il pulsante Riprendi sulla schermata per riprendere la preparazione del kit monouso.
58. Quando la preparazione del kit monouso è finita con successo, viene visualizzata la schermata della connessione della fonte.
59. Per questo protocollo, il contenitore della fonte è nuovo e fuori scala.
60. Se il contenitore della fonte viene già mostrato come nuovo e fuori scala, non si fa alcuna variazione.
61. Se la posizione della fonte viene mostrata come in scala, premere il pulsante In Scala per passare a fuori scala.
62. Premere il campo di immissione della capacità della fonte (ml). Viene visualizzata una tastierina numerica. Inserire la capacità del contenitore che contiene il prodotto d'origine. Premere il pulsante di controllo per accettare l'immissione. Nota: l'inserimento della capacità della fonte ingresso è stato utilizzato per assicurarsi che la sacca d'origine sia in grado di mantenere la soluzione addizionale che viene aggiunta alla sacca durante la fase di preparazione della fonte.
63. Utilizzare una tecnica di saldatura sterile per attaccare il contenitore della fonte al tubo che passa attraverso il morsetto S. Aprire la saldatura. Rimuovere i tubi dal morsetto come richiesto.
64. Accertarsi di sostituire i tubi della fonte nel morsetto a S.
65. Premere il pulsante Avanti. Viene visualizzata la sovraimpressione della preparazione della fonte. Verificare che la fonte sia attaccata al kit monouso e qualsiasi saldatura e pinza di plastica sui tubi che conducono alla fonte siano state aperte, quindi premere il pulsante Sì.
66. La preparazione della fonte ha inizio e viene visualizzata la schermata della preparazione della fonte. Osservare visivamente che il PlasmaLyte

si stia muovendo attraverso i tubi attaccati alla sacca d'origine. Se non si muove alcun fluido, premere il pulsante Pausa sulla schermata e determinare se un morsetto o una saldatura è ancora chiuso/a. Dopo che il problema è stato risolto, premere il pulsante Riprendi sulla schermata per riprendere la preparazione della fonte.

67. Quando la preparazione della fonte è finita con successo, viene visualizzata la schermata di inizio della procedura.

68. Premere il pulsante di avvio. Compare la schermata di pausa "ciclo di prelavaggio 1", con le istruzioni per "rivestire l'IP, miscelare la fonte".

69. Prerivestire la sacca IP.

70. Prima di premere il pulsante di avvio, rimuovere la sacca IP dalla bilancia #2 (si potrebbero anche rimuovere tubi dalla guida dei tubi del portello superiore dell'IP) e invertirla manualmente per permettere al tampone di lavaggio aggiunto durante il passaggio di preparazione del kit monouso di ricoprire tutte le superfici interne della sacca.

71. Riappare la sacca IP sulla bilancia #2 (etichetta sulla sacca rivolta verso sinistra). Sostituire i tubi del portello superiore nella guida dei tubi, se sono stati rimossi.

72. Miscelare la sacca d'origine.

73. La prima di premere il pulsante di avvio, rimuovere la sacca d'origine dalla bilancia #1 ed invertirla diverse volte per creare una sospensione cellulare omogenea.

74. Riappare la sacca d'origine sulla bilancia #1 o sul palo per IV. Accertarsi la sacca non oscilli.

75. Premere il pulsante di avvio.

76. Il LOVO fa partire il fluido di lavorazione dalla sacca d'origine e viene visualizzata la schermata del ciclo di lavaggio 1.

Durante la procedura LOVO, il sistema si mette automaticamente in pausa per permettere all'operatore di interagire con diverse sacche.

Differenti schermate vengono mostrate durante differenti pause. Seguire le istruzioni corrispondenti per ciascuna schermata.

Pause di risciacquo della fonte

Dopo aver fatto defluire la sacca d'origine, il LOVO aggiunge il tampone di lavaggio alla sacca d'origine per risciacquare la sacca. Dopo che il volume di tampone di lavaggio configurato è stato aggiunto alla sacca d'origine, il LOVO si mette in pausa automaticamente e mostra la schermata della pausa di risciacquo della fonte.

Quando viene visualizzata la schermata della pausa di risciacquo della fonte, l'operatore:

1. Rimuove la sacca d'origine dalla bilancia #1.

1. Inverte la sacca d'origine diverse volte per permettere al tampone di lavaggio di toccare tutto l'interno della sacca.
2. Riappende la sacca d'origine sulla bilancia #1. Accertarsi che la sacca d'origine non stia oscillando sulla bilancia #1.
3. Premere il pulsante Riprendi.

Il LOVO processa il fluido di risciacquo dalla sacca d'origine, quindi continua con la procedura automatizzata.

#### Pausa di miscelazione della sacca IP

Per preparare le cellule per un altro passaggio attraverso il rotatore, la sacca IP viene diluita con tampone di lavaggio. Dopo aver aggiunto il tampone di lavaggio alla sacca IP, il LOVO si mette in pausa automaticamente e mostra la schermata di pausa "miscelazione della sacca IP".

Quando viene visualizzata la schermata della pausa di "miscelazione della sacca IP", l'operatore:

1. Rimuove la sacca IP dalla bilancia #2. Si potrebbero anche rimuovere i tubi dalla guida dei tubi del portello superiore dell'IP.
2. Inverte la sacca IP diverse volte per miscelare accuratamente la sospensione cellulare.
3. Riappende la sacca IP sulla bilancia #2. Inoltre, sostituisce i tubi del portello superiore dell'IP nella guida dei tubi, se sono stati rimossi.

Accertarsi che la sacca IP non stia oscillando sulla bilancia #2.

4. Preme il pulsante Riprendi. Il LOVO inizia a processare il fluido dalla sacca IP.

#### Pausa di massaggio degli angoli dell'IP

Durante il ciclo di lavaggio finale della procedura LOVO, le cellule sono state pompate dalla sacca IP, attraverso il rotatore, ed alla sacca del retentato (prodotto finale). Quando la sacca IP era vuota, 10 ml di tampone di lavaggio sono stati aggiunti al portello inferiore della sacca IP per risciacquare la sacca. Dopo aver aggiunto il fluido di risciacquo, il LOVO si mette in pausa automaticamente e mostra la schermata di pausa del "massaggio degli angoli dell'IP".

Quando viene visualizzata la schermata della pausa del "massaggio degli angoli dell'IP", l'operatore:

1. Non rimuove la sacca IP dalla bilancia #2.
2. Con la sacca IP ancora appesa sulla bilancia #2, massaggia gli angoli della sacca per portare qualsiasi cellula residua in sospensione.
3. Si accerta che la sacca IP non stia oscillando sulla bilancia #2.
4. Preme il pulsante Riprendi.
5. Il LOVO inizia a pompare fuori il fluido di risciacquo dalla sacca IP.

Alla fine della procedura LOVO, viene visualizzata la schermata della rimozione dei prodotti. Quando viene visualizzata questa schermata, tutte le

sacche sul kit LOVO potrebbero essere manipolate.

Nota: Non toccare alcuna sacca fino a che non viene visualizzata la schermata della rimozione dei prodotti.

Porre una pinza emostatica sui tubi molto vicino al portello sulla sacca del retentato per evitare che la sospensione cellulare sedimenti nei tubi e saldare tre volte a caldo sotto la pinza emostatica.

Rimuovere la sacca del retentato rompendo la saldatura intermedia e trasferire alla BSC.

Seguire le istruzioni sulla schermata di rimozione dei prodotti.

Premere il pulsante Avanti. Tutte le pinze meccaniche LOVO si aprono e viene visualizzata la schermata della rimozione del kit.

Seguire le istruzioni sulla schermata di rimozione del kit. Quando completato, procedere.

Premere il pulsante Avanti. Tutte le pinze meccaniche LOVO si chiudono e viene visualizzata la schermata del riassunto dei risultati. Registrare i dati dalla schermata del riassunto dei risultati nella tabella 17. Chiudere tutte le pompe e il supporto del filtro.

Tabella 17. Tabella di riassunto dei risultati del LOVO.

Tempo di lavorazione trascorso (# tra parentesi)	Tempo di lavorazione della fonte trascorso (# tra parentesi)	Tempo di pausa	Volume della fonte (ml)	Volume del retentato (ml)	Volume del filtrato (ml)	Volume della soluzione 1 (ml)
A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.

Premere il pulsante Avanti. Viene visualizzata la schermata di selezione del protocollo.

#### Procedura di arresto del LOVO

1. Assicurarsi che tutte le pinze siano state chiuse e che il supporto del filtro sia nella posizione eretta.
2. Premere il pulsante di arresto sulla parte frontale del LOVO.
3. Viene visualizzata la sovraimpressione della decisione del pulsante di arresto.
4. Viene visualizzata la sovraimpressione della conferma di arresto.
5. Premere il pulsante Sì. Viene visualizzata la schermata di chiusura.
6. Dopo alcuni secondi, viene visualizzata la schermata di spegnimento. Quando viene visualizzata questa schermata, spegnere il LOVO utilizzando il commutatore sulla parte posteriore sinistra dello strumento.

Registrare volume del prodotto formulato finale in una tabella.

Tabella del calcolo della quantità di IL-2 richiesta dal prodotto finale

**A.** Quantità calcolata di IL-2 richiesta per il prodotto finale. (300 UI/ml di IL-2 nel prodotto finale):

Volume del prodotto finale (ml) [Volume del prodotto cellulare formulato dalla tabella del volume del prodotto formulato finale] × 300 UI/ml = UI di IL-2 richieste

\_\_\_\_\_ ml × 300 UI = \_\_\_\_\_ UI di IL-2 richieste

**B.** UI di IL-2 richieste ÷ diluizione della soluzione di lavoro madre (concentrazione di  $6 \times 10^4$  UI/ml) preparata nel passaggio di preparazione dell'IL-2 = volume (ml) di IL-2 da aggiungere al prodotto finale.

\_\_\_\_\_ [UI di IL-2 richieste da sopra] ÷ 60.000 UI/ml = \_\_\_\_\_ ml di soluzione di lavoro madre di IL-2

Determinare il numero di criosacche e il volume del materiale da conservare.

Segnarlo sul volume bersaglio e sulla tabella del materiale da conservare sotto il numero di sacche di crioconservazione e il volume di campione conservato per prodotto.

Volume bersaglio/calcolo delle sacche: (volume formulato finale - regolazione del volume dovuta al non ottenimento del 100% del recupero = 10 ml)/# di sacche.

Cellule preparate con CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions) ed IL-2 1:1 (vol:vol).

1. Assemblare l'apparecchio di connessione

1.1 Saldare in modo sterile le criosacche CS750 all'apparecchio di connessione cellulare CC2 sostituendo una delle estremità distali del luer maschio per ciascuna sacca.

1.2 Conservare le pinze in posizione chiusa.

1.3 Etichettare le sacche 1-4.

2. Preparare le cellule con IL-2 e connettere l'apparecchio.

2.1 In BSC, inserire nella sacca del prodotto cellulare un sistema di trasferimento del plasma da 4" con connettore luer femmina. Assicurarsi che il morsetto sia stato chiuso sul sistema di trasferimento.

2.2 Con una siringa di dimensioni appropriate, prelevare il volume di diluizione di lavoro di IL-2 determinato dalla tabella del prodotto finale.

2.3 Distribuire nel prodotto LOVO.

2.4. Saldare in modo sterile sacca del prodotto LOVO alla linea del CC2 con deflussore singolo rimuovendo il deflussore.

2.5 Porre le cellule e l'apparecchio in una sacca da trasporto e porre a 2-8°C per  $\leq 15$  minuti.

3. Aggiungere il CS10,

3.1 In BSC, attaccare un rubinetto d'arresto a 3 vie al luer maschio sulla sacca di CS10 freddo.

3.2 Attaccare una siringa di dimensioni appropriate al luer femmina del rubinetto d'arresto.

3.3 Collegare la sacca e prelevare la quantità del CS10 determinata nella tabella del "volume del prodotto formulato finale".

3.4 Rimuovere la siringa e attapparla con il tappo rosso.

3.5 Ripetere se sono richieste siringhe multiple.

3.6 Rimuovere l'apparecchio cellulare/CC2 dal frigorifero da 2 a 8°C e porlo nella BSC.

3.7 Attaccare una prima siringa contenente CS10 al luer intermedio del rubinetto d'arresto. Girare il rubinetto d'arresto così che la linea alle sacche CS750 sia in posizione "spenta".

3.8 Lentamente e con miscelazione delicata, aggiungere CS10 (1:1, vol:vol) alle cellule.

3.9 Ripetere per ulteriori siringhe di CS10.

Aggiunta del prodotto cellulare formulato nelle criosacche

1. Sostituire la siringa con una siringa di dimensioni appropriate per il volume di cellule da porre in ciascuna criosacca.

2. Miscelare il prodotto cellulare.

3. Aprire il morsetto che conduce alla sacca del prodotto cellulare e prelevare il volume appropriato.

4. Girare il rubinetto d'arresto così che la sacca del prodotto cellulare sia in posizione "spenta" e distribuire il contenuto della siringa nella criosacca

#1. Pulire la linea con l'aria dalla siringa.

Registrazione del volume del prodotto finale

1. Utilizzando un portello senza ago ed una siringa di dimensioni appropriate, prelevare la quantità da conservare determinata precedentemente.

2. Conservare in una provetta conica da 50 ml etichettata "materiale da conservare".

3. Utilizzando la siringa attaccata all'impianto, rimuovere tutta l'aria dalla sacca prelevando le cellule a circa 1" dopo la sacca verso i tubi. Fissare e sigillare termicamente. Porre a 2-8°C.

4. Girare il rubinetto d'arresto così che le criosacche siano in posizione "spenta".
5. Miscelare le cellule nella sacca del prodotto cellulare e ripetere i passaggi 3-8 per le sacche CS750 rimanenti utilizzando una nuova siringa sul rubinetto d'arresto e una nuova siringa per ottenere il cellulare da conservare.
6. Il materiale da conservare dovrebbe essere messo da parte per la lavorazione una volta che il prodotto è stato nel CRF.

Procedura del congelatore a velocità controllata (CRF) (si veda anche l'esempio 9)

1. Accendere il CRF (congelatore a velocità controllata CryoMed, modello 7454) ed associare un computer portatile.
2. Accedere sul computer utilizzando account e parola chiave.
3. Aprire l'icona del congelatore a velocità controllata localizzata sul desktop.
4. Cliccare il pulsante Esegui sulla schermata principale.
5. Cliccare aperta profilo, Click aperta.
6. Immettere il nome del file della corsa seguito dalla data in questo formato: corsaGGMMAAAA.
7. Immettere l'etichetta della data come dati senza alcun trattino come GGMMAAAA.
8. Chiudere la porta del CRF.
9. Cliccare Inizio della corsa.
10. Selezionare COM 6 sul menu a tendina.
11. Cliccare Ok. Aspettare circa 30 secondi.
12. Quando appare "Scaricamento del profilo", cliccare OK. Cliccare Salva. (Si veda l'esempio 9 per i dettagli del profilo di congelamento a velocità controllata.)
13. Aspettare a premere il pulsante verde fino a che i campioni non sono nel CRF. Il congelatore è stato mantenuto a 4°C finché non fosse pronto per aggiungerli.
14. Aggiungere i campioni al CRF.
15. Aspettare fino a che il CRF ritorna a 4°C. Una volta che la temperatura è stata raggiunta, cliccare il pulsante verde Continua. Questo avvia il programma per passare al passaggio successivo nel programma.
16. Eseguire un'ispezione visiva delle criosacche per le seguenti (Nota: non ispezionare per iper o ipo-riempimento): integrità del contenitore, integrità del portello, integrità del saldatura, presenza di agglomerati cellulari, e presenza di particelle.

17. Porre le etichette approvate su un cartellino su ciascuna sacca.
18. Verificare che l'etichetta del prodotto finale comprenda: numero di lotto, nome del prodotto, data del produttore, volume del prodotto, altri additivi, temperatura di conservazione, e scadenza.
19. Porre ciascuna criosacca (con il cartellino) in un copri-sacca.
20. Saldare a caldo.
21. Porre in una cassetta fredda.
22. Ripetere per ciascuna sacca.
23. Porre le criosacche etichettate in cassette preconizionate e trasferirle al CRF.
24. Distribuire equamente le cassette nel supporto nel CRF.
25. Applicare una termocoppia a nastro alla cassetta centrale, o porre una sacca fittizia in posizione centrale.
26. Chiudere la porta del CRF.
27. Dopo che la temperatura della camera ha raggiunto  $4^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , premere Esegui sul programma di interfaccia del PC.
28. Registrare il tempo e la temperatura della camera a cui il prodotto viene trasferito al CRF.

Lavorazione del campione per il controllo di qualità

1. Trasferire asetticamente i materiali seguenti alla BSC, come richiesto, ed etichettarli secondo la tabella sotto.
2. Utilizzare una nuova pipetta per pipettare le seguenti:

Tabella del QC e della ritenzione

3. Mandare al QC: 1 provetta per la conta cellulare, 1 provetta per l'endotossina, 1 provetta per il Micoplasma, 1 provetta per colorazione di Gram, 1 provetta per la ristimolazione, e 1 provetta di flusso al QC per una prova immediata. Le provette duplicate rimanenti sono state poste nel congelatore a velocità controllata.
4. Contattare il supervisore del QC notificando la valutazione richiesta.
5. Si veda la tabella 18 per le istruzioni per la valutazione e l'immagazzinamento.

Tabella 18. Istruzioni per la valutazione e l'immagazzinamento.

Prova	Recipiente
-------	------------

Conta cellulare e vitalità	crioprovette
Micoplasma	crioprovetta conservata a 4°C fino al completamento della valutazione.
Sterilità	Inoculo di 0,5 ml in una bottiglia di coltura anaerobica e 0,5 ml in una aerobica.
Colorazione per Gram	crioprovetta conservata a 4°C fino al completamento della valutazione.
Endotossina	crioprovetta conservata a 4°C fino al completamento della valutazione.
Flusso	crioprovetta conservata a 4°C fino al completamento della valutazione.
Ritenzione post-formulazione	crioconservazione per analisi future: consiste di 5 flaconcini satellite, 1 provetta per la conta cellulare, 1 provetta per l'endotossina, 1 provetta per il Micoplasma, 1 provetta per colorazione di Gram, e 1 provetta di flusso al QC per una prova immediata.
Ristimolazione	Il campione viene spedito a temperatura ambiente e il saggio deve essere cominciato nel corso di 30 minuti dai risultati della conta cellulare.

#### Conta cellulare

Eseguire una singola conta cellulare su ciascun campione e registrare i dati e allegare dati grezzi della conta al registro del lotto. Documentare il programma di conta Cellometer. Verificare che sia stata inserita la diluizione corretta nel Cellometer.

Crioconservazione delle cellule per la ritenzione post-formulazione:

1. Porre il flaconcino in CRF.
2. Spostare alla posizione di immagazzinamento dopo il completamento del congelamento e registrare la data e il tempo di collocamento nel CRF.

Registrare data e tempo dello spostamento in LN<sub>2</sub>.

#### Analisi di microbiologia

1. Ordinare la valutazione per le piastre di deposito al laboratorio di microbiologia.
2. Registrare i numeri di accesso.
3. Ordinare la valutazione per la sterilità aerobica ed anaerobica.
4. Assicurare la spedizione di piastre e bottiglie al laboratorio di microbiologia.

Post-crioconservazione delle sacche di prodotto cellulare

1. Arrestare il congelatore dopo il completamento della corsa. La corsa può essere fermata cliccando sul pulsante di arresto o premere il tasto Indietro sulla tastierina del congelatore.
2. Rimuovere le criosacche dalle cassette.
3. Trasferire le cassette all'LN2 a fase di vapore.
4. Registrare la posizione di immagazzinamento.
5. Immettere qualsiasi ulteriore commento quando la finestra di immissione del testo si apre ancora. Questa finestra compare indipendentemente dal metodo di arresto della corsa.
6. Stampare il resoconto del profilo e allegarlo al registro del lotto marcato con il numero di lotto per la corsa.
7. Terminare la modalità a caldo e chiudere la schermata Esegui con pulsante Esci.

#### **ESEMPIO 9: PROCEDIMENTO DI CRIOCONSERVAZIONE**

Questo esempio descrive il metodo del procedimento di crioconservazione per i TIL preparati con la procedura chiusa abbreviata descritta sopra nell'esempio 8 utilizzando il congelatore a velocità controllata CryoMed, modello 7454 (Thermo Scientific).

L'attrezzatura utilizzata, oltre a quella descritta nell'esempio 9, è come segue:

scaffale di supporto delle cassette in alluminio (compatibile con sacche da congelatore CS750), cassette per la crioconservazione per sacche da 750 ml, serbatoio dell'azoto liquido a bassa pressione (22 psi), frigorifero, sensore a termocoppia (di tipo a nastro per sacche), e sacche da congelamento CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

Il procedimento di congelamento fornisce una velocità di  $0,5^{\circ}\text{C}$  dalla nucleazione a  $-20^{\circ}\text{C}$  e una velocità di raffreddamento di  $1^{\circ}\text{C}$  per minuto ad una temperatura finale di  $-80^{\circ}\text{C}$ . I parametri del programma sono i seguenti:

Passaggio 1 – aspettare fino a  $4^{\circ}\text{C}$ ; passaggio 2:  $1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (temperatura del campione) a  $-4^{\circ}\text{C}$ ; passaggio 3:  $20,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (temperatura della camera) a  $-45^{\circ}\text{C}$ ; passaggio 4:  $10,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (temperatura della camera) a  $-10,0^{\circ}\text{C}$ ; passaggio 5:  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (temperatura della camera) a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; e passaggio 6:  $1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (temperatura del campione) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Una rappresentazione della procedura di questo esempio in combinazione con il procedimento degli esempi da 1 a 8 viene mostrata nella figura 11.

#### **ESEMPIO 10: CARATTERIZZAZIONE DEI TIL DEL PROCEDIMENTO 2A**

Questo esempio descrive la caratterizzazione dei TIL preparati con la procedura chiusa abbreviata descritta sopra. In breve, la procedura chiusa abbreviata (procedimento 2A, descritto negli esempi da 1 a 9) aveva i vantaggi rispetto ai precedenti procedimenti di produzione dei TIL dati nella

tabella 19. I vantaggi per il pre-REP possono includere: frammenti tumorali per pallone aumentati, tempo di coltura accorciato, numero ridotto di passaggi, e/o l'essere favorevole ad un sistema chiuso. I vantaggi per la transizione da pre-REP a REP possono includere: procedimento da pre-REP a REP accorciato, numero ridotto di passaggi, selezione di fenotipizzazione eliminata, e/o favorevole ad un sistema chiuso. I vantaggi per il REP possono includere: numero ridotto di passaggi, durata del REP più breve, trasferimento a sistema chiuso dei TIL tra palloni, e/o scambi dei mezzi a sistema chiuso. I vantaggi per la raccolta possono includere: numero ridotto di passaggi, lavaggio delle cellule automatizzato, sistema chiuso, e perdita ridotta di prodotto durante il lavaggio. I vantaggi per la formulazione e/o il prodotto finale possono includere la flessibilità di spedizione.

Tabella 19. Confronto tra il procedimento esemplificativo 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A.

<b>Passaggio del procedimento</b>	<b>Procedimento 1C - forma di realizzazione</b>	<b>Procedimento 2A -forma di realizzazione</b>
<b>pre-REP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•4 frammenti per 10 palloni G-REX-10</li> <li>•durata di 11-21 giorni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•40 frammenti per 1 pallone G-REX-100M</li> <li>•durata di 11 giorni</li> </ul>
<b>Transizione da pre-REP a REP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•i TIL pre-REP sono congelati fino a che non vengono fenotipizzati per la selezione, quindi vengono scongelati per procedere al REP (giorno -30)</li> <li>•il REP richiede <math>&gt;40 \times 10^6</math> TIL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•i TIL pre-REP passano direttamente al REP al giorno 11</li> <li>•il REP richiede <math>25-200 \times 10^6</math> TIL</li> </ul>

<b>REP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•6 palloni G-REX-100M al giorno 0 del REP</li> <li>•<math>5 \times 10^6</math> TIL e <math>5 \times 10^8</math> cellule nutritive PBMC per pallone al giorno 0 del REP</li> <li>•separare in 18-36 palloni al giorno 7 del REP</li> <li>•durata di 14 giorni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•1 pallone G-REX-500M al giorno 11</li> <li>•<math>25-200 \times 10^6</math> TIL e <math>5 \times 10^9</math> cellule nutritive PBMC al giorno 11</li> <li>•separare in <math>\leq 6</math> palloni G-REX-500M al giorno 16</li> <li>•durata di 11 giorni</li> </ul>
<b>Raccolta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•raccolta dei TIL mediante centrifugazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•raccolta dei TIL mediante il sistema di lavaggio delle cellule automatizzato LOVO</li> </ul>
<b>Formulazione finale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•prodotto fresco in Hypothermosol</li> <li>•singola sacca per infusione</li> <li>•stabilità di spedizione limitata</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•prodotto crioconservato in PlasmaLyte-A + HSA all'1% e CS10 conservato in LN2</li> <li>•aliquote multiple</li> <li>•stabilità di spedizione più lunga</li> </ul>
<b>Tempo del procedimento complessivo stimato</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•43-55 giorni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•22 giorni</li> </ul>

Un totale di 9 esperimenti sono stati eseguiti utilizzando TIL derivati da 9 tumori descritti nella tabella 20. Tutti i dati mostrati qui sono stati

misurati dal prodotto dei TIL congelato e scongelato dal procedimento 1C e da una forma di realizzazione del procedimento 2A.

Tabella 20. Descrizione dei donatori di tumore, della data di lavorazione e dei luoghi di lavorazione.

ID del tumore	Tipo di tessuto	Fonte	Tessuto
M1061	Melanoma	MT group	primario - parte laterale del piede sinistro
M1062	Melanoma	Moffitt	N/A
M1063	Melanoma	MT group	metastatico C - inguine destro
M1064	Melanoma	MT group	metastatico C - caviglia sinistra
M1065	Melanoma	Bio Options	Metastatico - linfonodo ascellare
EP11001	ER+PR+	MT group	primario - carcinoma duttale della mammella sinistra invasivo
M1056*	Melanoma	Moffitt	N/A
M1058*	Melanoma	MT group	metastatico - stadio IIB, parte destra del cuoio capelluto
M1023*	Melanoma	Atlantic Health	primario - ascella destra

Le procedure descritte qui per il procedimento 2A sono state utilizzate per produrre i TIL per la caratterizzazione in questo esempio. In breve, per il REP, al giorno 11, è stato preparato un pallone G-REX-500M contenente 5 l di CM2 arricchito con 3.000 UI/ml di rhIL-2, 30 ng/ml di anti-CD3 (clone OKT3) e  $5 \times 10^9$  cellule nutritive PBMC allogene irradiate. I TIL raccolti dal pallone G-REX-100M pre-REP dopo la riduzione del volume sono stati contati e seminati nel pallone G-REX-500M a una densità che variava tra  $5 \times 10^6$  e  $200 \times 10^6$  cellule. Il pallone è stato quindi posto in un incubatore umidificato per colture di tessuti a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% per cinque giorni. Al giorno 16, il volume del pallone G-REX-500M è stato ridotto, i TIL sono stati contati e la loro vitalità è stata determinata. A questo punto, i TIL sono stati espansi in multipli palloni G-REX-500M (fino ad un massimo di sei palloni), ciascuno con una densità di semina di  $1 \times 10^9$  TIL/pallone. Tutti i palloni sono stati quindi posti in incubatori umidificati per coltura tissutale al 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% per altri sei giorni. Al giorno 22, il giorno di raccolta, ciascun pallone è stato ridotto del 90% nel volume, le cellule sono state raggruppate insieme e filtrate attraverso un filtro da 170 µm per il sangue, e quindi raccolte in una sacca Origin EV3000 da 3 l o equivalente in preparazione per il lavaggio automatizzato utilizzando il LOVO. I TIL sono stati lavati utilizzando il sistema automatizzato di lavorazione cellulare LOVO che ha sostituito il 99,99% di terreni di coltura cellulare con un tampone di lavaggio composto da PlasmaLyte-A arricchito con HSA all'1%. Il LOVO funziona utilizzando la tecnologia di una membrana di filtrazione rotante che recupera oltre il

92% dei TIL eliminando potenzialmente i componenti residui della coltura tissutale, compreso il siero, fattori di crescita, e citochine, così come altri detriti e materiali particellari. Dopo il completamento del lavaggio, è stata eseguita una conta cellulare per determinare l'espansione dei TIL e la loro vitalità a seguito della raccolta. CS10 è stato aggiunto ai TIL lavati ad un rapporto 1:1 volume:volume per raggiungere la formulazione finale del procedimento 2A. Il prodotto finale formulato è stato suddiviso in aliquote in sacche da crioconservazione, sigillato, e posto in cassette di alluminio preraffreddate. Le sacche da crioconservazione contenenti i TIL sono state quindi congelate utilizzando un congelatore a velocità controllata CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts) secondo le procedure descritte qui, compreso nell'esempio 9.

Le conte delle cellule e la percentuale di vitalità per le nove corse sono stati confrontati nelle figure 12 e 13.

I marcatori della superficie cellulare mostrati nei seguenti risultati sono stati analizzati utilizzando la citometria a flusso (citometro a flusso Canto II, Becton, Dickinson, e Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) utilizzando reagenti adatti disponibili in commercio. I risultati per i marcatori d'interesse vengono mostrati nelle figure dalla 14 alla 23.

Diversi metodi sono stati utilizzati per misurare la lunghezza dei telomeri nel DNA genomico e in preparazioni citologiche. L'analisi dei frammenti di restrizione terminali dei telomeri (TRF) è lo standard elettivo per misurare la lunghezza dei telomeri (de Lange et al., 1990). Tuttavia, la limitazione principale della TRF è il requisito di una quantità elevata di DNA (1,5 µg). Qui, due tecniche ampiamente utilizzate per la misurazione delle lunghezze dei telomeri sono state applicate, e precisamente l'ibridazione fluorescente in situ (FISH) e la PCR quantitativa.

La flow-FISH è stata eseguita utilizzando il kit Dako (K532711-8 RUO, codice K5327, kit per telomeri PNA/FITC per citometria a flusso, kit PNA FISH/FITC. Flow, 20 prove) e sono state seguite le istruzioni del produttore per misurare la lunghezza media della ripetizione telomerica. In breve, le superficie delle cellule è stata colorata con CD3 APC per 20 minuti a 4°C, cui segue GAM Alexa 546 per 20 minuti. Il complesso antigene-anticorpo è stato quindi reticolato con il reticolante chimico BS3 2mM (Fisher Scientific). Il legame della sonda telomerica PNA in una popolazione standard di linfociti T con telomeri lunghi, linea di cellule T di leucemia Jurkat 1301 (cellule 1301) è stata utilizzata come standard interno di riferimento in ciascun saggio. I singoli TIL sono stati contati in seguito all'incubazione con l'anticorpo e miscelati con cellule 1301 (ATCC) ad un rapporto cellulare 1:1.  $5 \times 10^5$  TIL sono stati miscelati con  $5 \times 10^5$  cellule 1301. L'ibridazione in situ è stata eseguita in una soluzione di ibridazione (formammide al 70%, BSA all'1%, Tris 20mM pH 7,0) in duplice copia e in presenza e in assenza di una sonda telomerica PNA coniugata con FITC (Panagene), FITC-00-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA, complementare alla sequenza di ripetizione telomerica a una concentrazione finale di 60nM. Dopo l'aggiunta della sonda telomerica PNA, le cellule sono state incubate per 10 minuti a 81°C in un bagno d'acqua in agitazione. Le cellule sono state quindi poste al buio a temperatura ambiente per una notte. Il mattino seguente, la sonda telomerica in

eccesso è stata rimossa mediante il lavaggio 2 volte con PBS preriscaldato a 40°C. In seguito ai lavaggi, DAPI (Invitrogen, Carlsbad, California) è stato aggiunto a una concentrazione finale di 75 ng/ml. La colorazione del DNA con DAPI è stata utilizzata per contrastare le cellule nella popolazione G0/G1. L'analisi del campione è stata eseguita utilizzando il nostro citometro a flusso (BD Canto II, Mountain View, California). La fluorescenza dei telomeri del campione in esame è stato espresso come percentuale della fluorescenza (fl) delle cellule 1301 mediante la formula seguente:

$$\text{Lunghezza relativa dei telomeri} = \frac{[(\text{media delle cellule in esame con fl FITC con sonda} - \text{media delle cellule in esame con fl FITC senza sonda}) \times \text{indice del DNA delle cellule 1301} \times 100]}{[(\text{media delle cellule 1301 con fl FITC con sonda} - \text{media delle cellule 1301 con fl FITC senza sonda}) \times \text{indice del DNA delle cellule in esame}]}$$

Anche la qPCR in tempo reale è stata utilizzata per misurare la lunghezza relativa dei telomeri (Nucleic Acids Res. 15 maggio 2002; 30(10): e47, 20, Leukemia, 2013, 27, 897-906). In breve, il rapporto (T/S) tra il numero di copie di ripetizioni telomeriche e il numero di copie di geni singoli è stato determinato utilizzando un ciclizzatore termico PCR BioRad (Hercules, California) in un formato da 96 pozzetti. Dieci ng di DNA genomico è stati utilizzati per la reazione di PCR dei telomeri o dell'emoglobina (hgb) e gli inneschi utilizzati erano i seguenti: innesco Tel-1b (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), innesco Tel-2b (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), innesco hgb1 (GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC), e innesco hgb2 (CACCAACTTCATCCACGTTACC). Tutti i campioni sono stati analizzati mediante entrambe le reazioni dei telomeri e dell'emoglobina, e l'analisi è stata eseguita in triplice copia sulla stessa piastra. Oltre ai campioni in esame, ciascuna piastra da 96 pozzetti conteneva una curva standard a cinque punti da 0,08 ng a 250 ng utilizzando DNA genomico isolato dalla linea cellulare 1301. Il rapporto T/S (-ddCt) per ciascun campione è stato calcolato sottraendo il valore di soglia del ciclo (Ct) mediano dell'emoglobina dal valore di Ct dei telomeri mediano. Il relativo rapporto T/S (-ddCt) è stato determinato sottraendo il rapporto T/S del punto a 10,0 ng della curva standard dal rapporto T/S di ciascun campione sconosciuto.

I risultati della flow-FISH vengono mostrati nelle figure 24 e 25, e nessuna differenza significativa è stata osservata tra il procedimento 1C e il procedimento 2A, suggerendo che le sorprendenti proprietà dei TI prodotti dal procedimento 2A non erano prevedibili solo dall'età dei TIL.

In conclusione, il procedimento 2A ha prodotto un potente prodotto dei TIL con un fenotipo "giovane" come definito da livelli elevati di molecole costimolatorie, livelli bassi di marcatori dell'esaurimento, e una capacità aumentata di secernere citochine a seguito della riattivazione. La piattaforma di espansione abbreviata di 22 giorni permette la rapida generazione di dosi dei TIL su scala clinica per pazienti con una necessità urgente di terapia. Il prodotto farmaceutico crioconservato introduce efficienze logistiche critiche che permettono una produzione rapida e

flessibilità nella distribuzione. Questo metodo di espansione supera le barriere tradizionali all'applicazione più ampia della terapia con i TIL.

#### **ESEMPIO 11: USO DEL COCKTAIL DI CITOCHINE IL-2, IL-15, ED IL-21**

Questo esempio descrive l'uso delle citochine IL-2, IL-15, ed IL-21, che servono come ulteriori fattori di crescita dei linfociti T, in combinazione con il procedimento dei TIL degli esempi da 1 a 10.

Utilizzando il procedimento degli esempi da 1 a 10, i TIL sono stati fatti crescere da tumori colorettali, melanomi, cervicali, tripli negativi della mammella, polmonari e renali in presenza di IL-2 in un braccio dell'esperimento e, al posto di IL-2, una combinazione di IL-2, IL-15, ed IL-21 in un altro braccio all'inizio di coltura. Al completamento del pre-REP, le colture sono state valutate per l'espansione, il fenotipo, la funzione (CD107a+ e IFN- $\gamma$ ) e il repertorio del TCR V $\beta$ . IL-15 ed IL-21 vengono descritte qui altrove e in Gruijl, et al., IL-21 promuove l'espansione dei linfociti infiltranti il tumore CD27+CD28+ con elevato potenziale citotossico e abbassa l'espansione collaterale dei linfociti T regolatori, Santegoets, S. J., J Transl Med., 2013, 11:37 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/>).

I risultati hanno mostrato che un'aumentata espansione dei TIL (>20%), in entrambe le cellule CD4+ e CD8+ nelle condizioni trattate con IL-2, IL-15, ed IL-21 è stata osservata in istologie multiple in relazione alle condizioni con solo IL-2. Vi era un'inclinazione verso una popolazione prevalentemente CD8+ con un repertorio del TCR V $\beta$  distorto nei TIL ottenuti dalle colture trattate con IL-2, IL-15, ed IL-21 in relazione alle colture con solo IL-2. IFN- $\gamma$  e CD107a erano elevati nei TIL trattati con IL-2, IL-15, ed IL-21, in confronto ai TIL trattati solo con IL-2.

#### **ESEMPIO 12: STUDIO DI FASE 2 A TRE COORTI MULTICENTRICO IN MELANOMA**

Questo studio di fase 2 a tre coorti multicentrico è progettato per verificare la sicurezza e l'efficacia di una terapia con dei TIL prodotta secondo il procedimento 1C (come descritto qui) in pazienti con melanoma metastatico. Le coorti uno e due arruoleranno fino a 30 pazienti ciascuna e la coorte tre è una coorte di ritrattamento per una seconda infusione dei TIL in fino a dieci pazienti. Le prime due coorti sono per valutare due differenti procedimenti di produzione: il procedimento 1C e una forma di realizzazione del procedimento 2A (descritto negli esempi da 1 a 10, rispettivamente). I pazienti nella coorte uno ricevono TIL freschi non crioconservati e i pazienti della coorte due ricevono il prodotto preparato attraverso il procedimento descritto negli esempi da 1 a 10, dando un prodotto crioconservato. Il modello dello studio viene mostrato nella figura 26. Lo studio è uno studio di fase 2 a tre coorti multicentrico per verificare la sicurezza e l'efficacia dei TIL autologhi per il trattamento di sottopopolazioni di pazienti con melanoma metastatico. I criteri di inclusione essenziali includono: melanoma metastatico misurabile e  $\geq 1$  lesione resecabile per la generazione dei TIL; almeno una linea precedente di terapia sistemica; età  $\geq 18$ ; e stato di prestazione ECOG di 0-1. Le coorti di trattamento includono il prodotto dei TIL non crioconservati (preparato utilizzando il procedimento 1C), il prodotto dei TIL crioconservati

(preparato utilizzando una forma di realizzazione del procedimento 2A), e il ritrattamento con il prodotto dei TIL per pazienti senza risposta o che progrediscono dopo una risposta iniziale. L'obiettivo primario è la sicurezza e l'obiettivo secondario è l'efficacia, definita come tasso di risposta oggettiva (ORR), velocità di remissione completa (CRR), sopravvivenza senza progressione (PFS), durata della risposta (DOR), e sopravvivenza complessiva (OS).

### **ESEMPIO 13: QUALIFICAZIONE DI SINGOLI LOTTI DI CELLULE MONONUCLEATE PERIFERICHE TRATTATE CON RADIAZIONI GAMMA**

Questo esempio descrive una nuova procedura abbreviata per la qualificazione di singoli lotti di cellule mononucleate periferiche trattate con radiazioni gamma (le PBMC, note anche come MNC) per l'uso come cellule nutritive allogeniche nei metodi esemplificativi descritti qui.

Ciascun lotto di cellule nutritive MNC irradiate è stato preparato da un singolo donatore. Ciascun lotto o donatore è stato sottoposto a valutazione singolarmente per la sua capacità di espandere i TIL nel REP in presenza di anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) purificato ed interleuchina 2 (IL-2).

Inoltre, ciascun lotto di cellule nutritive è stato testato senza l'aggiunta dei TIL per verificare che la dose di radiazioni gamma ricevuta fosse sufficiente a renderli incapaci di replicazione.

#### **Definizioni/Abbreviazioni**

BSC - cabina di sicurezza biologica

CD3 - cluster di differenziazione 3; marcatore proteico di superficie dei linfociti T

CF - centrifuga

CM2 - mezzo completo per TIL # 2

CMO - Organizzazione di Produzione a Contratto

CO<sub>2</sub> - biossido di carbonio

EtOH - alcol etilico

GMP - buone pratiche di fabbricazione

IL-2 - interleuchina 2

UI - unità internazionali

LN2 - azoto liquido

mini-REP - mini-protocollo di espansione rapida

ml - millilitro

MNC - cellule mononucleate

NA - non applicabile

OKT3 - anticorpo contro CD3 MACS GMP puro (clone OKT3)

PPE - attrezzatura protettiva personale

pre-REP - prima del protocollo di espansione rapida

QS - quanto basta; riempire a questa quantità

REP - protocollo di espansione rapida

TIL - linfociti infiltranti il tumore

T25 - pallone per coltura di tessuti da 25 cm<sup>2</sup>

µg - microgrammi

µl - microlitro

PROCEDURA

Sfondo

7.1.1 Cellule nutritive MNC trattate con radiazioni gamma con crescita arrestata sono state necessarie per il REP dei TIL. I recettori di membrana sulle cellule nutritive MNC si legano all'anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e si reticolano ai TIL nel pallone del REP, stimolando i TIL ad espandersi. I lotti di cellule nutritive sono stati preparati mediante leucaferesi di sangue intero preso da singoli donatori. Il prodotto della leucaferesi è stato sottoposto a centrifugazione su Ficoll-Hypaque, lavato, irradiato, e crioconservato secondo le condizioni di GMP.

7.1.2 È importante che ai pazienti che hanno ricevuto una terapia con TIL non vengano infuse le cellule nutritive vitali, dal momento che ciò può portare a malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD). Le cellule nutritive vengono quindi arrestate nella crescita mediante il dosaggio delle cellule con irradiazione con radiazioni gamma, che risulta in rotture del DNA a doppio filamento e nella perdita della vitalità cellulare delle cellule MNC a seguito di nuova coltura.

Criteri di valutazione e allestimento sperimentale

I lotti di cellule nutritive sono stati valutati secondo due criteri: 1) la loro capacità di espandere i TIL in co-coltura >100 volte e 2) la loro incompetenza di replicazione.

7.2.2 I lotti di cellule nutritive sono stati testati in formato mini-REP utilizzando due linee primarie di TIL pre-REP cresciuti in palloni verticali per colture tissutali T25.

7.2.3 I lotti di cellule nutritive sono stati testati in relazione a due linee di TIL distinte, dal momento che ciascuna linea di TIL è unica nella sua capacità di proliferare in risposta all'attivazione in un REP.

7.2.4 Come controllo, un lotto di cellule nutritive MNC irradiate che è storicamente stato mostrato soddisfare i criteri di 7.2.1 è stato portato avanti insieme ai lotti di prova.

7.2.5 Per garantire che tutti i lotti testati in un singolo esperimento ricevano una valutazione equivalente, erano disponibili scorte sufficienti delle stesse linee di TIL pre-REP per testare tutte le condizioni e tutti i lotti di cellule nutritive.

7.2.6 Per ciascun lotto di cellule nutritive testato, vi era un totale di sei palloni T25:

7.2.6.1 Linea di TIL pre-REP #1 (2 palloni)

7.2.6.2 Linea di TIL pre-REP #2 (2 palloni)

7.2.6.3 Cellule nutritive di controllo (2 palloni)

NOTE: I palloni contenenti le linee di TIL #1 e #2 valutavano la capacità del lotto di cellule nutritive di espandere i TIL. I palloni delle cellule nutritive di controllo valutavano l'incompetenza nella replicazione del lotto di cellule nutritive.

#### Protocollo sperimentale

7.3.1 Giorno -2/3, scongelamento delle linee di TIL

7.3.1.1 Preparare il mezzo CM2.

7.3.1.2 Scaldare il CM2 in bagno d'acqua a 37°C.

7.3.1.3 Preparare 40 ml di CM2 arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2. Mantenere al caldo fino al momento dell'uso.

7.3.1.4 Porre 20 ml di CM2 preriscaldato senza IL-2 in ciascuna delle due provette coniche da 50 ml etichettate con i nomi delle linee di TIL utilizzate.

7.3.1.5 Rimuovere le due linee di TIL pre-REP indicate dall'immagazzinamento in LN2 e trasferire i flaconcini all'ambiente della coltura tissutale.

7.3.1.6 Registrare l'identificazione delle linee di TIL.

7.3.1.7 Scongellare i flaconcini ponendoli dentro una sacca di immagazzinamento sigillata con cerniera lampo in un bagno d'acqua a 37°C finché non rimane una piccola quantità di ghiaccio.

- 7.3.1.8 Spruzzare o pulire i flaconcini scongelati con etanolo al 70% e trasferire i flaconcini alla BSC.
- 7.3.1.9 Utilizzando una pipetta di trasferimento sterile, trasferire immediatamente il contenuto del flaconcino nei 20 ml di CM2 nella provetta conica da 50 ml marcata preparata.
- 7.3.1.10 QS a 40 ml utilizzando CM2 senza IL-2 per lavare le cellule.
- 7.3.1.11 Centrifugare a  $400 \times CF$  per 5 minuti.
- 7.3.1.12 Aspirare il surnatante e risospendere in 5 ml di CM2 caldo arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2.
- 7.3.1.13 Rimuovere una piccola aliquota (20  $\mu$ l) in duplice copia per la conta cellulare utilizzando un contatore di cellule automatizzato. Registrare le conte.
- 7.3.1.14 Mentre si effettua la conta, porre la provetta conica da 50 ml con le cellule TIL in un incubatore umidificato a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%, con il tappo allentato per permettere lo scambio di gas.
- 7.3.1.15 Determinare la concentrazione cellulare e diluire i TIL a  $1 \times 10^6$  cellule/ml in CM2 arricchito con IL-2 a 3.000 UI/ml.
- 7.3.1.16 Coltivare in 2 ml/pozzetto di una piastra di coltura tissutale da 24 pozzetti in tanti pozzetti quanti richiesti in un incubatore umidificato a 37°C fino al giorno 0 del mini-REP.
- 7.3.1.17 Coltivare le differenti linee di TIL in piastre per la coltura di tessuti da 24 pozzetti separate per evitare confusione e una potenziale contaminazione crociata.
- 7.3.2 Giorno 0, inizio del mini-REP
- 7.3.2.1 Preparare abbastanza mezzo CM2 per il numero di lotti di cellule nutritive da testare, (per esempio, per la valutazione di 4 lotti di cellule nutritive in una volta, preparare 800 ml di mezzo CM2).
- 7.3.2.2 Suddividere in aliquote una porzione del CM2 preparato in 7.3.2.1 e supplementarlo con 3.000 UI/ml di IL-2 per la coltura delle cellule. (Per esempio, per la valutazione di 4 lotti di cellule nutritive in una volta, preparare 500 ml di mezzo CM2 con 3.000 UI/ml di IL-2).
- 7.3.2.3 Il resto del CM2 senza IL-2 sarà utilizzato per il lavaggio delle cellule come descritto sotto.
- 7.3.2.4 Lavorando con ciascuna linea di TIL separatamente per prevenire la contaminazione crociata, rimuovere la piastra da 24 pozzetti con la coltura dei TIL dall'incubatore e trasferirla alla BSC.
- 7.3.2.5 Utilizzando una pipetta di trasferimento sterile o un pipettatore da 100-1.000  $\mu$ l e un puntale, rimuovere circa 1 ml di mezzo da ciascun pozzetto dei TIL da utilizzare e porre in un pozzetto non utilizzato della piastra di coltura tissutale da 24 pozzetti. Questo è stato utilizzato per

lavare i pozzetti.

7.3.2.6 Utilizzando una pipetta di trasferimento sterile nuova o un pipettatore da 100-1.000 µl e un puntale, miscelare il mezzo rimanente con i TIL nei pozzetti per risospendere le cellule e quindi trasferire la sospensione cellulare a una provetta conica da 50 ml marcata con il nome dei TIL e registrare il volume.

7.3.2.7 Lavare i pozzetti con il mezzo conservato e trasferire tale volume alla stessa provetta conica da 50 ml.

7.3.2.8 Centrifugare le cellule a  $400 \times CF$  per raccogliere il precipitato cellulare.

7.3.2.9 Eliminare per aspirazione il surnatante del mezzo e risospendere il precipitato cellulare in 2-5 ml di mezzo CM2 contenente 3.000 UI/ml di IL-2, volume da utilizzare in base al numero di pozzetti raccolti e alla dimensione del pellet – il volume dovrebbe essere sufficiente per garantire una concentrazione di  $>1,3 \times 10^6$  cellule/ml.

7.3.2.10 Utilizzando una pipetta sierologica, miscelare la sospensione cellulare accuratamente e registrare il volume.

7.3.2.11 Rimuovere 200 µl per una conta cellulare utilizzando un contatore di cellule automatizzato.

7.3.2.12 Mentre si effettua la conta, porre la provetta conica da 50 ml con le cellule TIL in un incubatore umidificato a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%, con il tappo allentato per permettere lo scambio di gas.

7.3.2.13 Registrare le conte.

7.3.2.14 Rimuovere la provetta conica da 50 ml contenente le cellule TIL dall'incubatore e risospendere tali cellule a una concentrazione di  $1,3 \times 10^6$  cellule/ml in CM2 caldo arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2. Riportare la provetta conica da 50 ml all'incubatore con un tappo allentato.

7.3.2.15 Se desiderato, conservare la piastra da 24 pozzetti originale per sottoporre nuovamente a coltura qualsiasi residuo dei TIL.

7.3.2.16 Ripetere i passaggi 7.3.2.4 – 7.3.2.15 per la seconda linea di TIL.

7.3.2.17 Appena prima di porre in piastre i TIL nei palloni T25 per l'esperimento, i TIL sono stati diluiti 1:10 per una concentrazione finale di  $1,3 \times 10^5$  cellule/ml come dal passaggio 7.3.2.35 sotto.

Preparazione della soluzione di lavoro di CD3 MACS GMP puro (OKT3)

7.3.2.18 Tirare fuori la soluzione madre di OKT3 (1 mg/ml) dal frigorifero a 4°C e porla nella BSC.

7.3.2.19 Una concentrazione finale di 30ng/ml di OKT3 è stata utilizzata nei mezzi del mini-REP.

7.3.2.20 600ng di OKT3 sono stati richiesti per 20 ml in ciascun pallone T25 dell'esperimento; questo era l'equivalente di 60 µl di una soluzione 10 µg/ml ogni 20 ml, o 360 µl per tutti i 6 palloni testati per ciascun lotto di cellule nutritive.

7.3.2.21 Per ciascun lotto di cellule nutritive testato, fare 400 µl di una diluizione 1:100 di OKT3 1 mg/ml per una concentrazione di lavoro di 10 µg/ml (per esempio, per la valutazione di 4 lotti di cellule nutritive in una volta, fare 1.600 µl di una diluizione 1:100 di OKT3 1 mg/ml: 16 µl di OKT3 1 mg/ml + 1,584 ml di mezzo CM2 con 3.000 UI/ml di IL-2.)

Preparare i palloni T25

7.3.2.22 Marcare ciascun pallone con il nome della linea di TIL testata, il numero di repliche del pallone, il numero di lotto delle cellule nutritive, la data, e le iniziali dell'analista.

7.3.2.23 Riempire il pallone con il mezzo CM2 prima di preparare le cellule nutritive.

7.3.2.24 Porre i palloni in un incubatore umidificato a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% per mantenere il mezzo caldo mentre si aspetta ad aggiungere i componenti rimanenti.

7.3.2.25 Una volta che le cellule nutritive sono state preparate, i componenti saranno aggiunti al CM2 in ciascun pallone.

Preparazione della soluzione di lavoro di CD3 MACS GMP puro (OKT3).

Tabella 21: Soluzioni

Componente	Volume nei palloni di co-coltura	Volume nei palloni di controllo (solo cellule nutritive)
CM2 + 3.000 UI/ml di IL-2:	18 ml	19 ml
MNC: $1,3 \times 10^7$ /ml in CM2 + 3.000 UI di IL-2 (concentrazione finale $1,3 \times 10^7$ /pallone)	1 ml	1 ml
OKT3: 10 µg/ml in CM2 + 3.000 UI di IL-2	60 µl	60 µl
TIL: $1,3 \times 10^5$ /ml in CM2 con 3.000 UI di IL-2 (concentrazione finale $1,3 \times 10^5$ /pallone)	1 ml	0

Preparazione delle cellule nutritive

7.3.2.26 Un minimo di  $78 \times 10^6$  cellule nutritive per lotto testato sono state richieste per questo protocollo. Ciascun flaconcino da 1 ml congelato mediante SDBB aveva  $100 \times 10^6$  cellule vitali a seguito del congelamento. Assumendo un recupero del 50% a seguito dello scongelamento dall'immagazzinamento in LN<sub>2</sub>, è stato raccomandato di scongelare almeno due flaconcini da 1 ml di cellule nutritive per lotto dando una stima di

100 × 10<sup>6</sup> cellule vitali per ciascun REP. In alternativa, se fornite in flaconcini da 1,8 ml, un solo flaconcino forniva abbastanza cellule nutritive.

7.3.2.27 Prima di scongelare le cellule nutritive, preriscaldare approssimativamente 50 ml di CM2 senza IL-2 per ciascun lotto di cellule nutritive da testare.

7.3.2.28 Rimuovere i flaconcini del lotto di cellule nutritive indicato dall'immagazzinamento in LN2, porre in una sacca da immagazzinamento con cerniera lampo, e porre su ghiaccio. Trasferire i flaconcini all'ambiente della coltura tissutale.

7.3.2.29 Scongelare i flaconcini dentro la sacca di immagazzinamento con cerniera lampo chiusa per immersione in un bagno d'acqua a 37°C.

7.3.2.30 Rimuovere i flaconcini dalla sacca con cerniera lampo, spruzzare o pulire con una salvietta con EtOH al 70% e trasferire i flaconcini alla BSC.

7.3.2.31 Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire immediatamente il contenuto dei flaconcini di cellule nutritive in 30 ml di CM2 caldo in una provetta conica da 50 ml. Lavare il flaconcino con un piccolo volume di CM2 per rimuovere qualsiasi cellula residua nel flaconcino.

7.3.2.32 Centrifugare a 400 × CF per 5 minuti.

7.3.2.33 Aspirare il surnatante e risospenderlo in 4 ml di CM2 caldo più 3.000 UI/ml di IL-2.

7.3.2.34 Rimuovere 200 µl per la conta cellulare utilizzando il contatore di cellule automatizzato. Registrare le conte.

7.3.2.34 Risospendere le cellule a 1,3 × 10<sup>7</sup> cellule/ml in CM2 caldo più 3.000 UI/ml di IL-2.

7.3.2.34 Diluire le cellule TIL da 1,3 × 10<sup>6</sup> cellule/ml a 1,3 × 10<sup>5</sup> cellule/ml. Lavorare con ciascuna linea di TIL indipendentemente per prevenire la contaminazione crociata.

Messa a punto della co-coltura

7.3.2.36 Diluire le cellule TIL da 1,3 × 10<sup>6</sup> cellule/ml a 1,3 × 10<sup>5</sup> cellule/ml. Lavorare con ciascuna linea di TIL indipendentemente per prevenire la contaminazione crociata.

7.3.2.36.1 aggiunto 4,5 ml di mezzo CM2 a una provetta conica da 15 ml.

7.3.2.36.2 Rimuovere le cellule TIL dall'incubatore e risospenderle bene utilizzando una pipetta sierologica da 10 ml.

7.3.2.36.3 Rimuovere 0,5 ml di cellule dalla sospensione di TIL 1,3 × 10<sup>6</sup> cellule/ml e aggiungerli ai 4,5 ml di mezzo nella provetta conica da 15 ml. Riportare il flaconcino dei TIL di scorta all'incubatore.

7.3.2.36.4 Miscelare bene.

7.3.2.36.5 Ripetere i passaggi 7.3.2.36.1 – 7.3.2.36.4 per la seconda linea di TIL.

7.3.2.36.6 Se si testa più di un lotto di cellule nutritive in una volta, diluire i TIL alla concentrazione inferiore per ciascun lotto di cellule nutritive appena prima di porre in piastre i TIL.

7.3.2.37 Trasferire i palloni con il mezzo preriscaldato per un singolo lotto di cellule nutritive dall'incubatore alla BSC.

7.3.2.38 Miscelare le cellule nutritive per deposizione con una pipetta verso l'alto e verso il basso diverse volte con un puntale di una pipetta da 1 ml e trasferire 1 ml ( $1,3 \times 10^7$  cellule) a ciascun pallone per tale lotto di cellule nutritive.

7.3.2.39 Aggiungere 60  $\mu$ l di soluzione madre di lavoro di OKT3 (10  $\mu$ g/ml) a ciascun pallone.

7.3.2.40 Riportare i due palloni di controllo all'incubatore.

7.3.2.41 Trasferire 1 ml ( $1,3 \times 10^5$ ) di ciascun lotto di TIL nel pallone T25 marcato in modo corrispondente.

7.3.2.42 Riportare i palloni all'incubatore e incubare in posizione verticale. Non disturbare fino al giorno 5.

7.3.2.43 Ripetere 7.3.2.36 – 7.3.2.42 per tutti i lotti di cellule nutritive testati.

Giorno 5, cambiamento del mezzo

7.3.3.1 Preparare il CM2 con 3.000 UI/ml di IL-2. Sono richiesti 10 ml per ciascun pallone.

7.3.3.2 Per impedire la contaminazione crociata, manipolare i palloni per un singolo lotto di cellule nutritive alla volta. Rimuovere i palloni dall'incubatore e trasferirli alla BSC, fare attenzione a non disturbare lo strato di cellule sulla parte inferiore del pallone.

7.3.3.3 Ripetere per tutti i palloni compreso il pallone di controllo.

7.3.3.4 Con una pipetta da 10 ml, trasferire 10 ml di CM2 caldo con 3.000 UI/ml di IL-2 a ciascun pallone.

7.3.3.5 Riportare i palloni all'incubatore e incubarli in posizione verticale fino al giorno 7. Ripetere 7.3.3.1 – 7.3.3.6 per tutti i lotti di cellule nutritive testati.

Giorno 7, raccolta

7.3.4.1 Per impedire la contaminazione crociata, manipolare i palloni per un singolo lotto di cellule nutritive alla volta.

7.3.4.2 Rimuovere i palloni dall'incubatore e trasferirli alla BSC, aver cura di non disturbare lo strato di cellule sulla parte inferiore del pallone.

7.3.4.3 Senza disturbare le cellule che crescono sulla parte inferiore dei palloni, rimuovere 10 ml di mezzo da ciascun pallone di prova e 15 ml di mezzo da ciascuno dei palloni di controllo.

7.3.4.4 Utilizzando una pipetta sierologica da 10 ml, risospendere le cellule nel mezzo rimanente e miscelare bene per disgregare qualsiasi agglomerato di cellule.

7.3.4.5 Registrare i volumi per ciascun pallone.

7.3.4.6 Dopo aver accuratamente miscelato la sospensione cellulare per deposizione con una pipetta, rimuovere 200 µl per la conta cellulare.

7.3.4.7 Contare i TIL utilizzando la procedura operativa standard appropriata in combinazione con l'attrezzatura del contatore cellulare automatizzato.

7.3.4.8 Registrare le conte al giorno 7.

7.3.4.9 Ripetere 7.3.4.1 – 7.3.4.8 per tutti i lotti di cellule nutritive testati.

7.3.4.10 I palloni delle cellule nutritive di controllo sono stati valutati per l'incompetenza nella replicazione e i palloni contenenti i TIL sono stati valutati per l'espansione in termini di numero di volte dal giorno 0 secondo i criteri elencati nella tabella 21 (sotto).

Giorno 7, mantenimento dei palloni delle cellule nutritive di controllo fino al giorno 14

7.3.5.1 Dopo aver completato al giorno 7 le conte dei palloni delle cellule nutritive di controllo, aggiungere 15 ml di mezzo CM2 fresco contenente 3.000 UI/ml di IL-2 a ciascuno dei palloni di controllo.

7.3.5.2 Riportare i palloni di controllo all'incubatore e incubarli in posizione verticale fino al giorno 14.

Giorno 14, non proliferazione estesa dei palloni delle cellule nutritive di controllo

7.3.6.1 Per impedire la contaminazione crociata, manipolare i palloni per un singolo lotto di cellule nutritive alla volta.

7.3.6.2 Rimuovere i palloni dall'incubatore e trasferirli alla BSC, fare attenzione a non disturbare lo strato di cellule sulla parte inferiore del pallone.

7.3.6.3 Senza disturbare le cellule che crescono sulla parte inferiore dei palloni, rimuovere approssimativamente 17 ml di mezzo da ciascun pallone di controllo.

7.3.6.4 Utilizzando una pipetta sierologica da 5 ml, risospendere le cellule nel mezzo rimanente e miscelare bene per disgregare qualsiasi agglomerato di cellule.

7.3.6.5 Registrare i volumi per ciascun pallone.

7.3.6.6 Dopo aver accuratamente miscelato la sospensione cellulare per deposizione con una pipetta, rimuovere 200 µl per la conta cellulare.

7.3.6.7 Contare i TIL utilizzando la procedura operativa standard appropriata in combinazione con l'attrezzatura del contatore cellulare automatizzato.

7.3.6.8 Registrare le conte.

7.3.6.9 Ripetere 7.3.4.1 – 7.3.4.8 per tutti i lotti di cellule nutritive testati.

## RISULTATI E CRITERI DI ACCETTABILITA'

### Risultati

10.1.1 La dose di irradiazione con radiazioni gamma è stata sufficiente a rendere le cellule nutritive incapaci di replicazione. Ci si aspettava che tutti i lotti soddisfacessero i criteri di valutazione ed essi hanno dimostrato anche una riduzione nel numero di cellule nutritive vitali totali rimanenti al giorno 7 della coltura REP in confronto al giorno 0.

10.1.2 Ci si aspettava che tutti i lotti di cellule nutritive soddisfacessero i criteri di valutazione di espansione di 100 volte della crescita dei TIL dal giorno 7 della coltura REP.

10.1.3 Ci si aspettava che le conte del giorno 14 dei palloni delle cellule nutritive di controllo continuassero la tendenza non proliferativa vista al giorno 7.

### Criteri di accettabilità

10.2.1 I seguenti criteri di accettabilità sono stati soddisfatti per ciascuna linea di TIL replicata testata per ciascun lotto di cellule nutritive.

10.2.2 L'accettabilità era raddoppiata, come segue (delineato nella tabella sotto).

Tabella 22: Criteri di accettabilità

Prova	Criteri di accettabilità
irradiazione delle MNC/incompetenza nella replicazione	nessuna crescita osservata ai giorni 7 e 14
espansione dei TIL	espansione di almeno 100 volte di ciascun TIL (un minimo di $1,3 \times 10^7$ cellule vitali)

10.2.2.1 Valutare se la dose di radiazioni è stata sufficiente a rendere le cellule nutritive MNC incapaci di replicazione quando messe in coltura in presenza di 30 ng/ml di anticorpo OKT3 e 3.000 UI/ml di IL-2.

10.2.2.1.1 L'incompetenza nella replicazione è stata valutata mediante la conta delle cellule vitali totali (TVC) come determinato mediante la conta cellulare automatizzata al giorno 7 e al giorno 14 del REP.

10.2.2.1.2 I criteri di accettabilità erano "nessuna crescita", che significa che il numero di cellule vitali totali non era aumentato al giorno 7 e al giorno 14 dal numero iniziale di cellule vitali messe in coltura al giorno 0 del REP.

10.2.2.2 Valutare la capacità delle cellule nutritive di supportare l'espansione dei TIL.

10.2.2.2.1 La crescita dei TIL è stata misurata in termini di espansione in termini di numero di volte delle cellule vitali dall'inizio della coltura nel

giorno 0 del REP al giorno 7 del REP.

10.2.2.2.1 Al giorno 7, le colture dei TIL hanno ottenuto un minimo di espansione di 100 volte, (cioè più di 100 volte il numero delle cellule TIL vitali totali messe in coltura al giorno 0 del REP), come valutato mediante la conta cellulare automatizzata.

10.2.2.3 Se un lotto non è riuscito a soddisfare i due criteri sopra, il lotto è stato ritestato secondo il piano di contingenza delineato nella sezione 10.3 sotto.

10.2.2.4 In seguito alla rivalutazione di un lotto non riuscito, qualsiasi lotto di cellule nutritive MNC che non soddisfaceva i due criteri di accettabilità in entrambe la valutazione originale e la valutazione di contingenza è stato escluso.

10.2.2.5 Qualsiasi lotto di cellule nutritive MNC che soddisfa i criteri di accettabilità ma è stato giudicato avere una scarsa prestazione in relazione alla capacità di espandere i TIL rispetto ad altri lotti precedenti di cellule nutritive testati in parallelo con le stesse linee di TIL pre-REP è stato escluso.

Valutazione di contingenza dei lotti di cellule nutritive MNC che non soddisfano i criteri di accettabilità

10.3.1 Nel caso in cui un lotto di cellule nutritive MNC non abbia soddisfatto nessuno dei criteri di accettabilità delineati nella sezione 10.2 sopra, i seguenti passaggi saranno effettuati per ritestare il lotto per escludere un semplice errore dello sperimentatore come sua causa.

10.3.2 Se vi erano due o più flaconcini satellite di valutazione del lotto rimanenti, allora il lotto è stato ritestato. Se vi erano uno o nessun flaconcino satellite di valutazione del lotto rimanente, allora il lotto non è riuscito secondo i criteri di accettabilità elencati nella sezione 10.2 sopra.

10.3.3 Due membri del personale addestrati, inclusa la persona originale che ha valutato il lotto in questione, testano entrambi il lotto allo stesso tempo.

10.3.4 La ripetizione della sezione 7.2-7.3 è stata fatta per rivalutare il lotto in questione.

10.3.5 Ciascuna persona ha testato il lotto in questione così come il lotto di controllo (come definito nella sezione 7,2,4 sopra).

10.3.6 Allo scopo di essere qualificati, il lotto in questione e il lotto di controllo dovevano raggiungere i criteri di accettabilità della sezione 10,2 per entrambi i membri del personale che eseguivano la valutazione di contingenza.

10.3.7 A seguito del raggiungimento di questi criteri, il lotto è stato quindi rilasciato per l'uso da parte della CMO come descritto nella sezione 10.2 sopra.

#### **ESEMPIO 14: QUALIFICAZIONE DEI SINGOLI LOTTI DI CELLULE MONONUCLEATE DEL SANGUE PERIFERICO**

#### **TRATTATE CON RADIAZIONI GAMMA**

Questo esempio descrive una nuova procedura abbreviata per la qualificazione di singoli lotti di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) trattate con radiazioni gamma per uso come cellule nutritive allogeniche nei metodi esemplificativi descritti qui. Questo esempio fornisce un protocollo per la valutazione di lotti di cellule PBMC irradiate per l'uso nella produzione di lotti clinici dei TIL. Ciascun lotto di PBMC irradiate è stato preparato da un singolo donatore. Nel corso di più di 100 protocolli di qualificazione, è stato mostrato che, in tutti i casi, i lotti di PBMC irradiate da SDBB (Banca del sangue di San Diego) espandono i TIL >100 volte al giorno 7 di un REP. Questo protocollo di qualificazione modificato era inteso essere applicato ai lotti di PBMC irradiate da un donatore da SDBB che sono stati quindi ulteriormente testati per verificare che la dose di radiazioni gamma ricevuta fosse sufficiente a renderle incapaci di replicazione. Una volta dimostrato che esse mantenevano l'incompetenza nella replicazione nel corso di 14 giorni, i lotti di PBMC da un donatore sono stati considerati "qualificati" per uso nella produzione di lotti clinici di TIL.

#### **Termini chiave e definizioni**

µg - microgrammo

µl - microlitro

AIM-V - terreno di coltura cellulare disponibile in commercio

BSC - cabina di sicurezza biologica

CD - gruppo di differenziazione

CM2- mezzo completo per TIL #2

CM2IL2- CM2 arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2

CMO - Organizzazione di Produzione a Contratto

CO<sub>2</sub> - biossido di carbonio

EtOH - etanolo

GMP - pratiche di buona fabbricazione

Gy - Gray

IL - interleuchina

UI - unità internazionali

LN2- azoto liquido

ml - millilitro

NA - non applicabile

OKT3 - designazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD3

P20 - pipettatore da 2-20  $\mu$ l

P200 - pipettatore da 20-200  $\mu$ l

PBMC - cellule mononucleate del sangue periferico

P1000 - pipettatore da 100-1.000  $\mu$ l

PPE - attrezzatura protettiva personale

REP - protocollo di espansione rapida

SDBB - banca del sangue di San Diego

TIL - linfociti infiltranti il tumore

T25 - pallone per coltura di tessuti da 25 cm<sup>2</sup>

$\times g$  - "gravità in termini di numero di volte" - misura della forza centrifuga relativa

I campioni includono PBMC irradiate da un donatore (SDBB).

Procedura

Sfondo

7.1.1 Le PBMC con crescita arrestata trattate con radiazioni gamma erano richieste per il REP standard corrente dei TIL. I recettori di membrana sulle PBMC si legano all'anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e si reticolano ai TIL in coltura, stimolando i TIL ad espandersi. I lotti di PBMC sono stati preparati mediante leucaferesi di sangue intero preso da singoli donatori. Il prodotto della leucaferesi è stato sottoposto a centrifugazione su Ficoll-Hypaque, lavato, irradiato, e crioconservato secondo le condizioni di GMP.

È importante che ai pazienti che hanno ricevuto una terapia con TIL non vengano infuse PBMC vitali in quanto queste potrebbero portare a malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD). Le PBMC da un donatore vengono quindi arrestate nella crescita mediante il dosaggio delle cellule con irradiazione con radiazioni gamma, che risulta in rotture del DNA a doppio filamento e nella perdita della vitalità cellulare delle PBMC a seguito di nuova coltura.

Criteri di valutazione

7.2.1 Il criterio di valutazione per i lotti di PBMC irradiate era la loro incompetenza di replicazione.

#### Allestimento sperimentale

7.3.1 I lotti di cellule nutritive sono stati testati in formato mini-REP come se esse dovessero essere sottoposte a coltura insieme ai TIL, utilizzando palloni verticali per colture tissutali T25.

7.3.1.1 Lotto di controllo: un lotto delle PBMC irradiate, che è stato storicamente mostrato soddisfare il criterio di 7.2.1, è stato portato avanti accanto ai lotti sperimentali come controllo.

7.3.2 Per ciascun lotto di PBMC irradiate da un donatore testato, sono stati portati avanti palloni in duplice copia.

#### Protocollo sperimentale

Tutto il lavoro di coltura tissutale in questo protocollo è stato fatto utilizzando una tecnica sterile in una BSC.

#### Giorno 0

7.4.1 Preparare ~90 ml di mezzo CM2 per ciascun lotto di PBMC da un donatore da testare. Mantenere il CM2 al caldo in bagno d'acqua a 37°C.

7.4.2 Scongellare un'aliquota di  $6 \times 10^6$  UI/ml di IL-2.

7.4.3 Riportare il mezzo CM2 alla BSC, pulendolo con una salvietta con EtOH al 70% prima di porlo in cappa. Per ciascun lotto di PBMC testato, rimuovere circa 60 ml di CM2 in una bottiglia sterile separata. Aggiungere IL-2 dalla soluzione madre  $6 \times 10^6$  UI/ml scongelata a questo mezzo per una concentrazione finale di 3.000 UI/ml. etichettare questa bottiglia come "CM2/IL2" (o simili) per distinguerla dal CM2 non supplementato.

7.4.4 Marcare due palloni T25 per ciascun lotto di PBMC da testare. L'etichetta minima includeva:

7.4.4.1 Numero di lotto

7.4.4.2 Numero di palloni (1 o 2)

7.4.4.3 Data di inizio di coltura (giorno 0)

#### Preparazione dell'OKT3

7.4.5 Tirare fuori la soluzione madre di anti-CD3 (OKT3) dal frigorifero a 4°C e porla nella BSC.

7.4.6 Una concentrazione finale di 30ng/ml di OKT3 è stata utilizzata nei mezzi del mini-REP.

7.4.7 Preparare una soluzione di lavoro 10 µg/ml di anti-CD3 (OKT3) dalla soluzione madre 1 mg/ml. Porre in frigorifero fino a quando richiesto.

7.4.7.1 Per ciascun lotto di PBMC testato, preparare 150 µl di una diluizione 1:100 della scorta di anti-CD3 (OKT3).

Per esempio, per la valutazione di 4 lotti di PBMC alla volta, preparare 600 µl di anti-CD3 (OKT3) 10 µg/ml aggiungendo 6 µl della soluzione

madre 1 mg/ml a 594 µl di CM2 arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2.

#### Preparazione dei palloni

7.4.8 Aggiungere 19 ml per pallone di CM2/IL-2 ai palloni T25 marcati e porre i palloni in un incubatore umidificato a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% mentre si preparano le cellule.

#### Preparare le PBMC irradiate

7.4.9 Lavorare con ciascun lotto di PBMC da un donatore singolarmente per evitare la potenziale contaminazione crociata dei lotti.

7.4.10 Recuperare i flaconcini dei lotti di PBMC da testare dall'immagazzinamento in LN<sub>2</sub>. Questi sono stati posti a -80°C o mantenuti in ghiaccio secco prima dello scongelamento.

7.4.11 Porre 30 ml di CM2 (senza supplemento di IL-2) in provette coniche da 50 ml per ciascun lotto da scongelare. etichettare ciascuna provetta con i differenti numeri di lotto di PBMC da scongelare. Attappare le provette saldamente e porre in bagno d'acqua a 37°C prima dell'uso. Come richiesto, riportare le provette coniche da 50 ml alla BSC, pulendo con una salvietta con EtOH al 70% prima di porre nella cappa.

7.4.12 Rimuovere un flaconcino di PBMC dalla conservazione a freddo e porlo in un supporto fluttuante per provette in un bagno d'acqua a 37°C per scongelarlo. Lasciar procedere lo scongelamento finché non rimane una piccola quantità di ghiaccio nel flaconcino.

7.4.13 Spruzzare o pulire il flaconcino scongelato con EtOH al 70% e trasferirlo alla BSC.

7.4.14 Utilizzando una pipetta di trasferimento sterile, trasferire immediatamente il contenuto del flaconcino nei 30 ml di CM2 nella provetta conica da 50 ml. Rimuovere circa 1 ml di mezzo dalla provetta per risciacquare il flaconcino; riportare il risciacquo alla provetta conica da 50 ml. Attappare saldamente e agitare delicatamente per lavare le cellule.

7.4.15 Centrifugare a 400 × g per 5 minuti a temperatura ambiente.

7.4.16 Aspirare il surnatante e risospendere il precipitato cellulare in 1 ml di CM2 caldo/IL-2 utilizzando un puntale di una pipetta da 1.000 µl. In alternativa, prima di aggiungere il mezzo, risospendere il precipitato cellulare trascinando la provetta attappata lungo un supporto vuoto per provette. Dopo aver risospeso il precipitato cellulare, portare il volume a 4 ml utilizzando il mezzo CM2/IL-2. Registrare il volume.

7.4.17 Rimuovere una piccola aliquota (per esempio 100 µl) per la conta cellulare utilizzando un contatore di cellule automatizzato.

7.4.17.1 Eseguire le conte in duplice copia secondo la particolare SOP del contatore di cellule automatizzato. Molto probabilmente è necessario eseguire una diluizione delle PBMC prima di eseguire le conte cellulari. Una diluizione di partenza raccomandata era 1:10, ma questa variava in relazione al tipo di contatore cellulare utilizzato.

7.4.17,2 Registrare le conte.

7.4.18 Regolare la concentrazione di PBMC a  $1,3 \times 10^7$  cellule/ml come dal foglio di lavoro nel passaggio 7.4.15.2 utilizzando il mezzo CM2/IL-2.

Miscelare bene mediante una delicata rotazione o aspirando delicatamente su e giù utilizzando una pipetta sierologica.

Allestimento dei palloni di coltura

7.4.19 Riportare due palloni T25 marcati alla BSC dall'incubatore per colture di tessuti.

7.4.20 Riportare il flaconcino da 10 µg/ml di anti-CD3/OKT3 alla BSC.

7.4.21 Aggiungere 1 ml della sospensione cellulare di PBMC  $1,3 \times 10^7$  a ciascun pallone.

7.4.22 Aggiungere 60 µl del anti-CD3/OKT3 10 µg/ml a ciascun pallone.

7.4.23 Riportare i palloni attappati agli incubatori per coltura tissutale per 14 giorni di crescita senza disturbo.

7.4.24 Riporre il flaconcino di anti-CD3/OKT3 nel frigorifero fino a quando richiesto per il lotto successivo.

7.4.25 Ripetere i passaggi 7.4.9 – 7.4.24 per ciascun lotto di PBMC da valutare.

Giorno 14, misurazione della non proliferazione delle PBMC

7.4.26 Lavorare con ciascun lotto indipendentemente, riportare con attenzione i palloni T25 duplicati alla BSC.

7.4.27 Per ciascun pallone, utilizzando una pipetta sierologica da 10 ml nuova, rimuovere ~17 ml da ciascuno dei palloni, quindi prelevare con attenzione il mezzo rimanente per misurare il volume rimanente nei palloni. Registrare il volume.

7.4.28 Miscelare bene il campione per deposizione con una pipetta verso l'alto e verso il basso utilizzando la stessa pipetta sierologica.

7.4.29 Rimuovere un campione da 200 µl da ciascun pallone per la conta.

7.4.30 Contare le cellule utilizzando un contatore di cellule automatizzato.

7.4.31 Ripetere i passaggi 7.4.26 – 7.4.31 per ciascun lotto di PBMC da valutare.

## **RISULTATI E CRITERIO DI ACCETTABILITÀ**

Risultati

10.1.1 La dose di irradiazione con radiazioni gamma era attesa essere sufficiente a rendere le cellule nutritive incapaci di replicazione. Ci si aspettava che tutti i lotti soddisfacessero il criterio di valutazione, dimostrando una riduzione nel numero di cellule nutritive vitali totali rimanenti al giorno 14 della coltura REP in confronto al giorno 0.

Criterio di accettabilità

10.2.1 Il seguente criterio di accettabilità è stato soddisfatto per ciascun lotto di PBMC irradiate da un donatore testato:

10.2.2 “Nessuna crescita” - significava che il numero totale di cellule vitali al giorno 14 era inferiore al numero iniziale di cellule vitali messe in coltura al giorno 0 del REP.

10.2.3 Se un lotto non è riuscito a soddisfare il criterio sopra, il lotto è stato ritestato per la procedura di valutazione di contingenza delineata nella sezione 10.4.

10.2.4 In seguito alla rivalutazione di un lotto non riuscito, qualsiasi lotto di cellule nutritive MNC che non soddisfaceva il criterio di accettabilità in entrambe la valutazione originale e la valutazione di contingenza è stato escluso.

Valutazione di contingenza dei lotti di PBMC che non soddisfano il criterio di accettabilità.

10.4.1 Nell’eventualità che un lotto di PBMC irradiate da un donatore non abbia soddisfatto il criterio di accettabilità sopra, i seguenti passaggi sono stati presi per ritestare il lotto per escludere un semplice errore dello sperimentatore come causa del suo insuccesso.

10.4.2 Se vi erano due o più flaconcini satellite rimanenti del lotto, allora il lotto è stato ritestato. Se vi sono uno o nessun flaconcino satellite rimanente del lotto, allora il lotto non è riuscito secondo il criterio di accettabilità della sezione 10,2 sopra.

10.4.3 Tutte le volte che era possibile, due membri del personale addestrati (compresa preferibilmente la persona originale che ha valutato il lotto in questione) hanno fatto la valutazione dei due flaconcini separati indipendentemente. Questo è stato il metodo preferito di valutazione di contingenza. Oltre ai flaconcini di PBMC separati, gli stessi reagenti potrebbero essere utilizzati da entrambi i membri del personale.

10.4.3.1. Se due membri del personale non erano disponibili, una persona ha fatto la valutazione dei due flaconcini di PBMC per il lotto non riuscito, lavorando con ciascun flaconcino indipendentemente.

10.4.4 La ripetizione del “protocollo sperimentale” della sezione 7.4 è stata fatta per rivalutare il lotto in questione.

10.4.5 Oltre al lotto in questione, un lotto di controllo è stato testato da ciascuna persona che eseguiva la valutazione di contingenza.

10.4.5.1 Se due membri del personale svolgono la valutazione di contingenza, entrambi i membri del personale testano il lotto di controllo indipendentemente.

10.4.5.2 Se è disponibile solo una persona per eseguire la valutazione di contingenza, non era necessario che il lotto di controllo fosse eseguito in duplice copia.

10.4.5.3 Per essere qualificato, un lotto di PBMC che viene sottoposto alla valutazione di contingenza deve avere entrambi il lotto di controllo ed entrambe le repliche del lotto in questione che raggiungono il criterio di accettabilità della sezione 10,2 per passare.

10.4.5.4 A seguito del raggiungimento di questo criterio, il lotto è stato quindi rilasciato per l'uso da parte della CMO come descritto nella sezione 10.2.

#### **ESEMPIO 15: CONTATORE CELLULARE AUTOMATIZZATO CON CITOMETRO PER IMMAGINI CELLOMETER IC2**

Questo esempio descrive la procedura per il funzionamento del contatore cellulare automatizzato con citometro per immagini Cellometer K2.

##### **1. Definizioni**

µl	microlitro
AOPI	arancio d'acridina ioduro di propidio
BSC	cabina di sicurezza biologica
DPBS	soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco
ml	millilitro
MNC	cellule mononucleate del sangue
NA	non applicabile
PBMC	cellule mononucleate del sangue periferico
PPE	attrezzatura protettiva personale
pre-REP	coltura iniziale dei TIL prima del protocollo di espansione rapida della coltura
REP	protocollo di espansione rapida
TIL	linfociti infiltranti il tumore

##### **7. Procedura**

###### **7.1 Preparazione della sospensione cellulare**

###### **7.1.1 Preparazione del tripan blu**

La concentrazione finale del tripan blu era lo 0,1%. Il produttore ha raccomandato la preparazione una soluzione madre dello 0,2%.

7.1.1.1 Quando si utilizza tripan blu sul Cellometer K2, diluire la soluzione madre (0,4%) con PBS allo 0,2%.

7.1.1.2 Filtrare il tripan blu con un microfiltro da 0,2-0,4 ed aliquotare in volumi piccoli in provette etichettate ed attappate.

7.1.1.3 Miscelare la sospensione cellulare a 1:1 con tripan blu allo 0,2%.

## 7.1.2 Preparazione dell'AOPI

7.1.2.1 Quando si utilizza AOPI sul Cellometer K2, ottenere la soluzione di AOPI.

7.1.2.2 Colorare il campione cellulare a 1:1 con la soluzione di AOPI.

NOTE: quando si contano colture a concentrazione elevata, diluire i campioni cellulari nel terreno di coltura cellulare prima della diluizione finale 1:1 con tripan blu o AOPI. Utilizzare l'intervallo di conta suggerito dal produttore per determinare la migliore diluizione da utilizzare.

## 7.2 Messa a punto del Cellometer K2

7.2.1 Accendere l'attrezzatura del Cellometer K2.

7.2.2 Scegliere l'icona del citometro per immagini Cellometer sul monitor del computer associato.

7.2.3 Sulla schermata principale del programma, scegliere uno dei saggi elencati nel riquadro a tendina.

7.2.3.1 Quando si seleziona il saggio appropriato, il tipo cellulare e la modalità di immagine vengono compilati automaticamente.

7.2.3.2 Sotto la sezione "campione", cliccare su Imposta identificativo dell'utilizzatore/campione per aprire un'altra schermata per inserire le informazioni dell'operatore per il campione.

7.2.3.2.1 Immettere l'"ID dell'utilizzatore". Questo consisterà delle iniziali a tre lettere dell'utilizzatore.

7.2.3.2.2 Immettere l'"identificativo del campione". L'identificativo del campione è derivato dalle informazioni del campione in entrata.

7.2.3.3 Impostare i parametri di diluizione.

7.2.3.3.1 Se nessun'altra diluizione è stata fatta oltre alla miscela 1:1, il fattore di diluizione è 2.

7.2.3.3.2 Se è stata fatta una diluizione prima della miscela finale 1:1, il fattore di diluizione è 2 volte quello della diluizione precedente.

7.2.3.3.3 Aggiornare il fattore di diluizione secondo la miscela utilizzata nella sezione della diluizione della schermata. Cliccare sull'icona della matita per far apparire le schermate di dialogo.

7.2.3.3.4 Verificare che le sezioni dell'immagine F1 e dell'immagine F2 siano identiche l'una all'altra.

7.2.3.3.5 Cliccare sul pulsante "Salva" dopo che l'impostazione è stata completata.

## 7.3 Conta cellulare

7.3.1 Rimuovere il supporto di plastica da entrambi i lati di un vetrino per la camera di conteggio del Cellometer (SD100) e porlo sopra ad una salvietta pulita, priva di pelucchi.

7.3.2 Dopo aver preparato la sospensione cellulare, rimuovere una piccola aliquota del campione e trasferirla in un pozzetto di una piastra

multipozzetto per la coltura cellulare o in una provetta.

7.3.3 Se si diluisce il campione, eseguire la diluizione utilizzando il terreno di coltura cellulare.

7.3.4 Aggiungere 20  $\mu$ l di sospensione cellulare in un pozzetto della piastra multipozzetto per la coltura cellulare o una provetta.

7.3.5 Aggiungere 20  $\mu$ l del tripan blu allo 0,2% o della soluzione di AOPI ai 20  $\mu$ l di sospensione cellulare e miscelare il campione accuratamente.

7.3.6 Misurare 20  $\mu$ l della soluzione 1:1 e trasferirli in un lato della camera di conteggio.

NOTE: evitare di toccare l'area pulita del vetrino.

7.3.7 Se necessario, ripetere il campione sull'altro lato del vetrino.

7.3.8 Inserire la camera nella fenditura sulla parte frontale del Cellometer.

7.3.8 Per la conta cellulare con AOPI, cliccare su "Anteprima F1" sulla schermata principale to preview il immagine fluorescente verde (cellula viva). Per la conta con il tripan blu, cliccare su "Anteprima del campo luminoso".

7.3.9 Utilizzando la rotella di focalizzazione, portare l'immagine al fuoco ottimale. Le cellule avevano un centro luminoso e un bordo chiaramente definito.

7.3.10 Cliccare "Conta" per cominciare il procedimento di conta.

7.3.11 I risultati sono stati mostrati in una finestra a comparsa dei risultati della conta sullo schermo di un computer che mostra i risultati del procedimento di conta.

### **ESEMPIO 16: PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE MADRE DI IL-2 (CELLGENIX)**

Questo esempio descrive il procedimento per lo scioglimento dell'interleuchina 2 ricombinante umana purificata liofilizzata in campioni di scorta adatti per l'uso in ulteriori protocolli di coltura tissutale, compresi tutti quelli descritti nella presente domanda e negli esempi, compresi quelli che implicano l'uso di rhIL-2.

### **3. Definizioni/Abbreviazioni**

$\mu$ l: microlitro

BSC: cabina di sicurezza biologica

BSL2: livello di biosicurezza 2

D-PBS: soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco

G: gauge

GMP: pratiche di buona produzione

HAc: acido acetico

HSA: albumina sierica umana

ml: millilitro

NA: non applicabile

PPE: attrezzatura protettiva personale

rhIL-2; IL-2: interleuchina 2 ricombinante umana

COA: certificato di analisi

## 6. Procedura

6.1 Preparare una soluzione di acido acetico allo 0,2% (HAc).

6.1.1 Trasferire 29 ml d'acqua sterile a una provetta conica da 50 ml.

6.1.2 Aggiungere 1 ml di acido acetico 1N alla provetta conica da 50 ml.

6.1.3 Miscelare bene rovesciando la provetta 2-3 volte.

6.1.4 Sterilizzare la soluzione di HAc mediante filtrazione utilizzando un filtro Steriflip.

6.1.5 Attappare, datare ed etichettare la soluzione "soluzione sterile di acido acetico allo 0,2%".

6.1.6 La soluzione scade dopo 2 mesi. Conservare a temperatura ambiente.

6.2 Preparare HSA all'1% in PBS.

6.2.1 Aggiungere 4 ml della soluzione madre di HSA al 25% ai 96 ml di PBS in un'unità filtro sterile da 150 ml.

6.2.2 Filtrare la soluzione.

6.2.3 Attappare, datare ed etichettare la soluzione "HSA all'1% in PBS".

6.2.4 La soluzione scade dopo 2 mesi. Conservare a 4°C.

6.3 Per ciascun flaconcino di rhIL-2 preparato, compilare i documenti.

6.4 Preparare la soluzione madre di rhIL-2 (concentrazione finale  $6 \times 10^6$  UI/ml).

6.4.1 Ciascun lotto di rhIL-2 era differente e richiedeva informazioni trovate nel certificato di analisi (COA) del produttore, come:

6.4.1.1 Massa di rhIL-2 per flaconcino (mg)

6.4.1.2 Attività specifica di rhIL-2 (UI/mg)

6.4.1.3 Volume di ricostituzione di HAc allo 0,2% raccomandato (ml)

6.4.2 Calcolare il volume di HSA all'1% richiesto per il lotto di rhIL-2 utilizzando l'equazione sotto:

$$\left( \frac{\text{Massa del flaconcino (mg)} \times \text{attività biologica} \left( \frac{\text{UI}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{UI}}{\text{ml}}} \right) - \text{volume di HAc (ml)} = \text{volume di HSA all'1\% (ml)}$$

6.4.2.1 Per esempio, secondo il lotto di rhIL-2 10200121 COA di CellGenix, l'attività specifica per il flaconcino da 1 mg è  $25 \times 10^6$  UI/mg. Esso raccomanda di ricostituire la rhIL-2 in 2 ml di HAc allo 0,2%.

$$\left( \frac{1 \text{ mg} \times 25 \times 10^6 \left( \frac{\text{UI}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{UI}}{\text{ml}}} \right) - 2 \text{ ml} = 2,167 \text{ ml di HSA}$$

6.4.3 Pulire il tappo di gomma del flaconcino di IL-2 con una salvietta con alcol.

6.4.4 Utilizzando un ago da 16G attaccato ad una siringa da 3 ml, iniettare il volume raccomandato di HAc allo 0,2% in un flaconcino. Fare attenzione a non staccare il tappo quando si ritira l'ago.

6.4.5 Invertire il flaconcino 3 volte e far girare vorticosamente fino a che tutta la polvere non viene disciolta.

6.4.6 Rimuovere con attenzione il tappo e mettere da parte su una salvietta imbevuta d'alcol.

6.4.7 Aggiungere il volume calcolato di HSA all'1% al flaconcino.

6.4.8 Attappare il flaconcino con il tappo di gomma.

6.5 Immagazzinamento della soluzione di rhIL-2

6.5.1 Per la conservazione a breve termine (<72 ore), conservare il flaconcino a 4°C.

6.5.2 Per la conservazione a lungo termine (>72 ore), suddividere in aliquote il flaconcino in volumi più piccoli e conservare in crioprovette a -20°C fino a che non sono pronte per l'uso. Evitare cicli di congelamento/scongelo. Scade 6 mesi dopo la data di preparazione.

6.5.3 Le etichette di rh-IL-2 includevano fornitore e numero di catalogo, numero di lotto, data di scadenza, iniziali dell'operatore, concentrazione e volume dell'aliquota.

#### **ESEMPIO 17: PREPARAZIONE DEI MEZZI PER I PROCEDIMENTI PRE-REP E REP**

Questo esempio descrive la procedura per la preparazione di terreni di coltura per tessuti per uso nei protocolli riguardanti la coltura di linfociti

infiltranti il tumore (TIL) derivati da vari tipi di tumore compresi, ma senza limitazione, melanoma metastatico, carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC), carcinoma ovarico, carcinoma della mammella triplo negativo, e adenocarcinoma polmonare. Questo mezzi possono essere utilizzati per la preparazione di qualsiasi dei TIL descritti nella presente domanda e negli esempi.

### 3. Definizioni

µg	microgrammo
µm	micrometro
µM	micromolare
AIM-V®	terreno di coltura di tessuti privo di siero (Thermo Fisher Scientific)
BSC	cabina di sicurezza biologica
CM1	mezzo completo #1
CM2	mezzo completo #2
CM3	mezzo completo #3
CM4	mezzo completo #4
UI o U	unità internazionali
ml	millilitro
mM	millimolare
NA	non applicabile
PPE	attrezzatura protettiva personale
pre-REP	prima del procedimento di espansione rapida
REP	procedimento di espansione rapida
rhIL-2, IL-2	interleuchina 2 ricombinante umana
RPMI 1640	mezzo di Roswell Park Memorial Institute, formulazione 1640
SOP	procedura operativa standardizzata
TIL	linfociti infiltranti il tumore

## 7. Procedura

7.1 Tutte le procedure sono fatte utilizzando una tecnica sterile in una BSC (classe II, tipo A2).

7.1.1 Spruzzare la superficie della cappa con etanolo al 70% prima del suo uso.

7.1.2 Spruzzare tutti gli articoli e i reagenti con etanolo al 70% prima di porli nella cappa per la coltura di tessuti.

### 7.2 Aliquotare la L-glutammina 200mM

7.2.1 La L-glutammina è stata fornita in volumi più grandi rispetto a quanto richiesto per la preparazione del siero (per esempio volumi di 100 ml o 500 ml).

7.2.2 Scongela la bottiglia di L-glutammina in bagno d'acqua a 37°C.

7.2.3 Miscelare la L-glutammina bene dopo lo scongelamento, dal momento che essa precipita dopo lo scongelamento. Assicurarsi che tutti i precipitati siano ritornati in soluzione prima di aliquotare.

7.2.4 Porre le aliquote da 5-10 ml di L-glutammina in provette coniche sterili da 15 ml.

7.2.5 Etichettare le provette con la concentrazione, il fornitore, il numero di lotto, la data della suddivisione in aliquote, e la data di scadenza.

7.2.6 Le provette sono state quindi conservate a -20°C e tirate fuori come richiesto per la preparazione dei mezzi.

### 7.3 Preparazione del CM1

7.3.1 Rimuovere i seguenti reagenti dalla conservazione a freddo e scaldarli in un bagno d'acqua a 37°C:

7.3.1.1 RPMI 1640

7.3.1.2 Siero AB umano

7.3.1.3 L-glutammina 200mM

7.3.2 Rimuovere il BME dall'immagazzinamento a 4°C e porre in cappa per la coltura di tessuti.

7.3.3 Porre la soluzione madre di gentamicina dall'immagazzinamento a temperatura ambiente alla cappa per la coltura di tessuti.

7.3.4 Preparare il mezzo CM1 secondo la tabella 23 sotto aggiungendo ciascuno dei componenti nella sezione superiore di un'unità del filtro da 0,2 µm appropriata al volume da filtrare.

**Tabella 23. Preparazione del CM1**

Ingrediente	Concentrazione finale	Volume finale 500 ml	Volume finale 1 l
-------------	-----------------------	----------------------	-------------------

RPMI 1640	NA	450 ml	900 ml
Siero AB umano, inattivato al calore al 10%	50 ml	100 ml	
L-glutammina 200mM	2mM	5 ml	10 ml
BME 55mM	55µM	0,5 ml	1 ml
gentamicina solfato 50 mg/ml	50 µg/ml	0,5 ml	1 ml

7.3.5 Etichettare la bottiglia del mezzo CM1 con il suo nome, le iniziali del preparatore, la data in cui è stata filtrata/preparata, la data di scadenza a due settimane e conservare a 4°C fino a quando richiesto per la coltura di tessuto. Il mezzo può essere suddiviso in aliquote in bottiglie di volume più piccolo come richiesto.

7.3.6 Qualsiasi rimanenza di RPMI 1640, siero AB umano, o L-glutammina è stata conservata a 4°C fino alla successiva preparazione dei mezzi.

7.3.7 La bottiglia di soluzione madre di BME è stata riportata all'immagazzinamento a 4°C.

7.3.8 La bottiglia di soluzione madre di gentamicina è stata riportata alla sua posizione di immagazzinamento a temperatura ambiente opportuna.

7.3.9 A causa della limitata capacità tamponante del mezzo, il CM1 è stato eliminato non più di due settimane dopo la preparazione, o quando l'indicatore di pH rosso fenolo ha mostrato uno spostamento del pH estremo (colorazione da rosso brillante a rosa).

7.3.10 Al giorno dell'uso, preriscaldare la quantità richiesta di CM1 in bagno d'acqua a 37°C ed aggiungere 6.000 UI/ml di IL-2.

7.3.11 integrazione addizionale - come richiesto

7.3.11.1 CM1 arricchito con GlutaMAX®

7.3.11.1.1 Il CM1 potrebbe essere preparato sostituendo il GlutaMAX™ 2mM alla glutammina 2mM (concentrazione finale, si veda la tabella 2).

Se ciò è stato fatto, etichettare la bottiglia del mezzo come nel passaggio 7.3.5 sopra aggiungendo "GlutaMAX 2mM" per prevenire la confusione con la formulazione standard di CM1.

7.3.11.2 CM1 arricchito con antibiotico/antimicotico extra

7.3.11.2.1 Alcune formulazioni di CM1 richiedono un ulteriore antibiotico o antimicotico per prevenire la contaminazione dei TIL pre-REP cresciuti da certi tipi di tumore.

7.3.11.2.2 Aggiungere l'antibiotico/antimicotico alle concentrazioni finali mostrate nella tabella 24 sotto.

7.3.11.2.3 Se ciò è stato fatto, etichettare la bottiglia del mezzo come nel passaggio 7.3.1 sopra aggiungendo il/i nome/i dell'ulteriore

antibiotico/antimicotico per prevenire la confusione con la formulazione standard di CM1.

**Tabella 24. Ulteriore integrazione del CM1, come richiesto.**

Supplemento	Concentrazione madre	Diluizione	Concentrazione finale
GlutaMAX™	200mM	1:100	2mM
penicillina/streptomicina	10.000 U/ml di penicillina	1:100	penicillina 100 U/ml
	10.000 µg/ml di streptomicina		streptomicina 100 µg/ml
Amfotericina B	250 µg/ml	1:100	2,5 µg/ml

#### 7.4 Preparazione del CM2

7.4.1 Rimuovere il CM1 preparato dal frigorifero o preparare CM1 fresco come dalla sezione 7.3 sopra.

7.4.2 Rimuovere l'AIM-V® dal frigorifero.

7.4.3 Preparare la quantità di CM2 richiesta miscelando il CM1 preparato con un volume uguale di AIM-V® in una bottiglia del mezzo sterile.

7.4.4 Aggiungere 3.000 UI/ml di IL-2 al mezzo CM2 al giorno dell'uso.

7.4.5 Fare una quantità sufficiente di CM2 con 3.000 UI/ml di IL-2 al giorno dell'uso.

7.4.6 Etichettare la bottiglia del mezzo CM2 con il suo nome, le iniziali del preparatore, la data in cui è stata filtrata/preparata, la data di scadenza a due settimane e conservare a 4°C fino a quando richiesto per la coltura di tessuto. Il mezzo è stato suddiviso in aliquote in bottiglie di volume più piccolo come richiesto.

7.4.7 Riportare qualsiasi CM2 senza IL-2 al frigorifero dove esso può essere conservato per fino a due settimane, o fino a che l'indicatore di pH rosso fenolo mostra uno spostamento del pH estremo (colorazione da rosso brillante a rosa).

#### 7.5 Preparazione del CM3

7.5.1 Preparare CM3 al giorno è stato richiesto d'uso.

7.5.2 Il CM3 era lo stesso del mezzo AIM-V®, arricchito con 3.000 UI/ml di IL-2 al giorno dell'uso.

7.5.3 Preparare una quantità di CM3 sufficiente alle necessità sperimentali aggiungendo la soluzione madre di IL-2 direttamente alla bottiglia o alla sacca di AIM-V. Miscelare bene mediante agitazione delicata. etichettare la bottiglia con "IL-2 3.000 UI/ml" immediatamente dopo l'aggiunta all'AIM-V. Se vi è un eccesso di CM3, conservarlo in bottiglie a 4°C etichettate con il nome del mezzo, le iniziali del preparatore, la data in cui il

mezzo è stato preparato, e la sua data di scadenza (7 giorni dopo la preparazione).

7.5.4 Eliminare i mezzi arricchiti con IL-2 dopo la conservazione di 7 giorni a 4°C.

7.6 Preparazione del CM4

7.6.1 Il CM4 era lo stesso del CM3, con l'ulteriore supplemento di GlutaMAX™ 2mM (concentrazione finale).

7.6.1.1 Per ogni 1 l di CM3, aggiungere 10 ml di GlutaMAX™ 200mM.

7.6.2 Preparare una quantità di CM4 sufficiente alle necessità sperimentali aggiungendo la soluzione madre di IL-2 e la soluzione madre di GlutaMAX™ direttamente alla bottiglia o alla sacca di AIM-V. Miscelare bene mediante agitazione delicata.

7.6.3 Etichettare la bottiglia con "IL 3.000/no IL-2 e GlutaMAX" immediatamente dopo l'aggiunta all'AIM-V.

7.6.4 Se vi è CM4 in eccesso, conservarlo in bottiglie a 4°C etichettate con il nome del mezzo, "GlutaMAX", le iniziali del preparatore, la data in cui il mezzo è stato preparato, e la sua data di scadenza (7 giorni dopo la preparazione).

7.6.5 Eliminare i mezzi arricchiti con IL-2 dopo la conservazione di 7 giorni a 4°C.

#### **ESEMPIO 18: COLORAZIONE DI ANTIGENI DI SUPERFICIE DEI TIL POST-REP**

##### 1. SCOPO

L'esempio descrive la procedura per la colorazione della superficie cellulare dei TIL post-REP mediante la citometria a flusso. Questa procedura può essere applicata a qualsiasi dei TIL descritti nella domanda e negli esempi.

##### **TERMINI CHIAVE E DEFINIZIONI**

$\alpha$ :	alfa
$\beta$ :	beta
$\mu$ l:	microlitro
APC:	allofocianina
Ax647:	Alex Fluor 647
BD:	Becton Dickinson Company
BSA:	albumina sierica bovina
BSC:	cabina di sicurezza biologica

BV421:	violetto brillante 421
CD:	gruppo di differenziazione
CST:	messa a punto e tracciamento del citometro
Cy:	cianina
DPBS:	soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco
FACS:	separatore cellulare attivato dalla fluorescenza
FBS:	siero fetale bovino
FITC:	isotiocianato di fluoresceina
FMO:	fluorescenza meno uno
G:	grammo
H7:	analogo di Cy7
ml:	millilitro
PE:	ficoeritrina
PerCP-Cy5.5:	proteine peridrina-clorofilla
PPE:	attrezzatura protettiva personale
REP:	protocollo di espansione rapida
SIT:	provetta di iniezione del campione
TCR:	recettore dei linfociti T
p/v:	peso rispetto al volume

Anticorpi e coloranti per la citometria a flusso

**Tabella 25:** colorante Aqua LIVE/DEAD ThermoFisher, # di catalogo L34966.

Bersaglio	Formato	Clone	Fornitore	Numero di catalogo
TCRab (cioè TCR $\alpha/\beta$ )	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622

CD28	PE	CD28.2	BioLegend	302908
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42
CD27	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U
CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033
CD45R A	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032
CCR-7	PE	150503	BD Biosciences	560765
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318
CD38	APC	HB-7	BioLegend	356606
HLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633
CD69	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745
TIGIT	PE	MBSA43	eBioscience	12-9500-42
KLRG1	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704
CD154	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886
CD137	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818
Lag3	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42
PD1	APC	EH12,2H 7	BioLegend	329908
Tim-3	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008

## 7. PROCEDURA

### 7.1 Preparazione dei reagenti

#### 7.1.1 Tampone di lavaggio FACS

7.1.1.1 Aggiungere FBS inattivato al calore al 2% (p/v) a DPBS (aggiungere 10 ml di FBS a 490 ml di dPBS 1X).

7.1.1.2 Aggiungere NaN<sub>3</sub> allo 0,1% (p/v) (76,9 µl ad una bottiglia da 500 ml.)

7.1.1.3 La soluzione è stata conservata a 40°C. Eliminare dopo 30 giorni.

7.1.2 Colorante Aqua

7.1.2.1 Aggiungere 50 µl di DMSO al flaconcino di colorante reattivo.

7.1.2.2 Miscelare bene e confermare visivamente che tutto il colorante sia disciolto.

7.1.2.3 Il colorante che non è stato utilizzato per la procedura è stato suddiviso in aliquote e congelato a 20°C fino all'uso successivo. Non congelare/scongela una seconda volta.

7.1.3 Preparazione del cocktail di anticorpi.

7.1.3.1 Le combinazioni sono state costituite in provette di polipropilene quale una provetta Eppendorf.

7.1.3.2 Le combinazioni sono state conservate per fino a 6 mesi.

Tavola 26. Pannello di differenziazione 1 (DF1)

Target	Format	Clone	Supplier	Catalog Number	Titre
TCRab (i.e., TCRα/β)	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720	3
CD57*	PerCP- Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622	2
CD28*	PE	CD28.2	BioLegend	302908	2
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42	2
CD27*	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222	3
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U	3
CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033	2
FACS Buffer					33

[“Target” = bersaglio;

“Format” = formato;

“Supplier” = fornitore;

“Catalog number” = numero di catalogo;

“Titre” = titolo;

“FACS buffer” = tampone per la FACS]

Tavola 27. Pannello di differenziazione 2 (DF2)

Target	Format	Clone	Supplier	Catalog Number	Titre
CD45RA*	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675	1
CCD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
CCCR7*	PE	150503	BD Biosciences	560765	5
CCD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CCD4	APC/Cy7	OKT4	BioLegend	317418	2
CCD38*	APC	HB-7	BioLegend	356606	1
HHLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633	2
FACS Buffer					35

["Target" = bersaglio;

"Format" = formato;

"Supplier" = fornitore;

"Catalog number" = numero di catalogo;

"Titre" = titolo;

"FACS buffer" = tampone per la FACS]

Tavola 28. Pannello di attivazione dei linfociti T (Tact1)

Target	Format	Clone	Supplier	Catalog Number	Titre
CD137*	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818	2
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
Lag3*	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42	5
CD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	BioLegend	317418	2
PD1*	APC	EH12.2H7	BioLegend	329908	2
Tim-3*	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008	2
Buffer	FACS				33

[“Target” = bersaglio;

“Format” = formato;

“Supplier” = fornitore;

“Catalog number” = numero di catalogo;

“Titre” = titolo;

“FACS buffer” = tampone per la FACS]

Tavola 29. Pannello di attivazione dei linfociti T 2 (Tact2)

Target	Format	Clone	Supplier	Catalog Number	Titre
CD69*	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745	3
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
TIGIT*	PE	MBSA43	eBioscience	12-9500-42	3
CD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	BioLegend	317418	2
KLRG1*	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704	1
CD154*	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886	3
FACS Buffer					34

[“Target” = bersaglio;

“Format” = formato;

“Supplier” = fornitore;

“Catalog number” = numero di catalogo;

“Titre” = titolo;

“FACS buffer” = tampone per la FACS]

## 7.2 Requisiti del saggio di citometria a flusso

### 7.2.1 Calibrazione del citometro a flusso

7.2.1.1 Il citometro a flusso è stato calibrato al giorno del saggio utilizzando sfere CST seguendo le istruzioni del produttore.

7.2.1.2 L’operatore si assicura che il citometro a flusso abbia passato la calibrazione, dove i controlli della prestazione e della linea di base sono valido.

### 7.2.2 Compensazione/controlli FMO

7.2.2.1 Singoli campioni per la compensazione di colore sono stati preparati utilizzando le sfere di compensazione BD e il kit di sfere di compensazione reattive per l’ammina ArCTM.

7.2.2.2 controllo FMO, i campioni contenenti cellule sono stati colorati con un cocktail di anticorpi meno i seguenti coniugati anticorpali singoli,

CD27, CD28, e CD57.

### 7.2.3 Standardizzazione MFI

7.2.3.1 I voltaggi del citometro sono stati determinati giornalmente con un controllo di sfere e valori di voltaggio bersaglio.

### 7.3 Colorazione dei campioni

7.3.1 Marcare la provetta per FACS con l'identificativo del campione-DF1, l'identificativo del campione-DF2, l'identificativo del campione-T1, l'identificativo del campione-T2.

7.3.2 Marcare una serie di controlli FMO con CD27-APC-H7, CD28-PE, CD57-PerCPCy5.5, CD45RA-PECy7, CCR-7-PE, CD38-APC, CD137-PE7, lag3-PE, PD1 APC, Tim3-BV421, CD69-PE7, TIGIT-PE, KLRG1-Ax647, e CD154-BV421.

7.3.3 Aggiungere 0,5 a 2 milioni di cellule a ciascuna provetta.

7.3.4 QS a 3 ml di PBS 1X a ciascuna provetta.

7.3.5 Centrifugare le provette a  $400 \times g$ , con accelerazione e freno elevati, per 5 minuti.

7.3.6 Anche se i campioni stanno centrifugando, preparare il colorante Aqua per la marcatura delle cellule morte.

7.3.7 Rimuovere un'aliquota di Acqua dal congelatore e diluire 1/200 in PBS. Mantenere al buio. Aggiungere 2  $\mu$ l di colorante a 198  $\mu$ l di DPBS.

7.3.8 Decantare o aspirare il surnatante dal passaggio 7.3.5.

7.3.9 Aggiungere 25  $\mu$ l di soluzione di Aqua da sopra ai campioni e controlli FMO.

7.3.10 Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (TA) al buio.

7.3.11 Nota: se le cellule sono state inizialmente conservate in un mezzo privo di proteine, allora dovrebbe essere aggiunto un passaggio bloccante, quale 5  $\mu$ l di TruStain per 10 minuti a temperatura ambiente.

7.3.12 Aggiungere 50  $\mu$ l delle combinazioni di anticorpi alle provette appropriate.

7.3.13 Scuotere il supporto per provette per miscelare.

7.3.14 Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente al buio.

7.3.15 Registrare i tempi di inizio e fine. Aggiungere 3 ml di tampone di lavaggio per FACS.

7.3.16 Centrifugare le provette a  $400 \times g$ , con accelerazione e freno elevati, per 5 minuti.

7.3.17 Quando la centrifugazione è completata, decantare o aspirare il surnatante.

7.3.18 Risospendere le cellule facendo scorrere le provette lungo un supporto per provette vuoto.

- 7.3.19 Aggiungere 100  $\mu$ l di paraformaldeide all'1% a ciascuna provetta.
- 7.3.20 Conservare a 40°C al buio fino a che non sono pronte per la raccolta sul citometro a flusso. Nota: i campioni potrebbero essere conservati per fino a 72 ore.
- 7.4 Controllo di compensazione dell'L/D Aqua.
- 7.4.1 Marcare le provette per la FACS come controllo di compensazione dell'L/D Aqua.
- 7.4.2 Aggiungere una goccia di sfere Arc alla provetta.
- 7.4.3 Aggiungere 3  $\mu$ l di L/D Acqua direttamente alle sfere.
- 7.4.4 Incubare le provette a temperatura ambiente al buio per da 10 a 30 minuti.
- 7.4.5 Registrare inizio e fine del tempo di incubazione sul foglio di lavoro
- 7.4.6 Dopo l'incubazione, aggiungere 3 ml di lavaggio FACS a ciascuna provetta.
- 7.4.7 Centrifugare le provette a 400  $\times$  g, con accelerazione e freno elevati, per 5 minuti.
- 7.4.8 Decantare o aspirare il surnatante.
- 7.4.9 Risospendere le provette con 500  $\mu$ l di soluzione di PFA all'1%. Aggiungere 1 goccia di sfera negative. Porre a 40°C al buio fino alla raccolta.
- 7.5 Colorazione del controllo di compensazione.
- 7.5.1 Marcare le provette per la FACS come mostrato nel foglio di lavoro del fenotipo dei TIL post-REP.
- 7.5.2 Aggiungere gli anticorpi come mostrato nel foglio di lavoro del fenotipo dei TIL post-REP.
- 7.5.3 Dopo l'incubazione, aggiungere 3 ml di tampone per FACS a ciascuna provetta.
- 7.5.4 Centrifugare le provette a 500 g, con accelerazione e freno elevati, per 2 minuti.
- 7.5.5 Decantare o aspirare il surnatante.
- 7.5.6 Risospendere le provette con 500  $\mu$ l di PFA all'1% in PBS e conservare a 2-80°C al buio.
- 7.6 Acquisizione dei dati
- 7.6.1 Aprire il programma FACSDiva e fare l'accesso.
- 7.6.2 Nella finestra di dialogo di disappaiamento del citometro, cliccare "impostazioni d'uso del CST".
- 7.6.3 Generare un nuovo esperimento cliccando sul tasto "esperimento" e selezionando il modello "fenotipo esteso".

7.6.4 Cliccare due volte sui valori bersaglio dell'esperimento e regolare i voltaggi per raggiungere i valori bersaglio determinati dall'operatore del Flow Core.

7.6.5 Copiare le impostazioni strumentali e incollarle sul nuovo esperimento.

7.6.6 Generare un campione per ciascun individuo e chiamarlo appropriatamente.

7.6.7 Generare nomi per i campioni secondo le etichette sulle loro provette.

7.6.8 Mescolare con Vortex delicatamente o colpire con il dito prima di porre la provetta nella SIT.

7.6.9 Ottenere i dati sotto REGISTRA nella scheda di acquisizione.

7.6.10 Far correre i campioni a una velocità inferiore a 7.500 eventi per secondo.

7.6.11 Raccogliere tra 50.000 a 100.000 live eventi escludendo i detriti.

#### **ESEMPIO 19: SVILUPPO DEL PROCESSO DI VERIFICA DEL PROCEDIMENTO 2A**

Gli esperimenti in questo esempio sono stati completati per analizzare il procedimento 2A per la produzione dei TIL da tumori derivati da pazienti di melanoma e un singolo cancro della mammella comprendente lo sviluppo dei TIL da tumori in una procedura di pre-REP, cui segue un REP modificato. Speciale enfasi è stata posta sulla costituzione di un prodotto dei TIL congelati e un confronto delle prestazioni del prodotto dei TIL congelati rispetto al procedimento del prodotto dei TIL freschi corrente (procedimento 1C). Questo studio dimostrerà che si osservano profili simili nella valutazione di attributi di qualità critici dei freschi e degli scongelati (numero di cellule, % di vitalità, % di linfociti T CD3+, e produzione di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) stimolata da sfere) così come la procedura di fenotipizzazione estesa con ristimolazione (re-REP) se lo stesso prodotto dei TIL è fresco o congelato. I dati presentati a supporto di questa conclusione includono proliferazione, vitalità, fenotipo, rilascio di IFN- $\gamma$ , potenza, lunghezza dei telomeri, e attività metabolica. I risultati caratterizzano il procedimento 2A, un procedimento pre-REP/REP accorciato seguito dalla crioconservazione dei TIL così come confrontano il procedimento 2A con il procedimento 1C più lungo, come descritto qui.

Le descrizioni dei donatori di tumore, le date di lavorazione e i luoghi di lavorazione possono essere trovati nella tabella 1 sotto (\* indica che il REP è stato fatto cominciare utilizzando una linea di TIL pre-REP congelati):

**Tabella 30: Descrizione di donatori di tumore, data di lavorazione e luoghi di lavorazione.**

<b>ID del tumore</b>	<b>Tipo di tessuto</b>	<b>Fonte</b>	<b>Tessuto</b>
M1061	Melanoma	MT group	primario - parte laterale del piede sinistro

M1062	Melanoma	Moffitt	N/A
M1063	Melanoma	MT group	metastatico C - inguine destro
M1064	Melanoma	MT group	metastatico C – caviglia sinistra
M1065	Melanoma	Bio Options	metastatico - linfonodo ascellare
EP11001	ER+PR+	MT group	primario - carcinoma duttale della mammella sinistra invasivo
M1056*	Melanoma	Moffitt	N/A
M1058*	Melanoma	MT group	metastatico - stadio IIB, parte destra del cuoio capelluto
M1023*	Melanoma	Atlantic Health	primario - ascella destra

### 3. INFORMAZIONI DI SFONDO

3.1 LN-144 è un prodotto immunoterapico per trattare i pazienti con melanoma metastatico. Il prodotto era costituito da linfociti T infiltranti il tumore autologo (TIL) ottenuti da un singolo paziente a seguito della resezione chirurgica di un tumore ed espansi ex vivo attraverso la coltura cellulare di frammenti tumorali spezzettati (pre-REP) cui segue l'espansione rapida dei TIL in presenza di IL-2, anti-CD3, e APC costimolatorie a dose elevata. In seguito ad un precondizionamento di linfodeplezione non mieloablativo, il paziente ha ricevuto un'infusione singola dei suoi TIL e successive infusioni per via endovenosa di aldesleuchina (IL-2) ogni 8 ore per un massimo di 6 dosi. Anche gli studi riguardanti metodi alternativi di espansione dei TIL nell'impostazione dei motivi molecolari associati al danno (i DAMP) all'interno del microambiente intratumorale (TNE) hanno dimostrato un'efficace espansione di linfociti T utile per la terapia (Donia, 2014; Sommerville, 2012).

Il procedimento 1C che è stato utilizzato per la produzione commerciale dei TIL implica una programma di produzione che può prendere ~45-55 giorni per produrre un prodotto dei TIL somministrabile per infusione che viene rilasciato ad un paziente immunodepleto entro 24 ore.

L'immunodeplezione del paziente ricevente deve essere regolata precisamente con la raccolta del prodotto dei TIL corrente. I ritardi nella raccolta o nel rilascio del prodotto fresco possono avere un impatto negativo su un paziente immunodepleto che è in attesa dell'infusione. Il procedimento 2A è migliorato rispetto al procedimento 1C diminuendo il tempo di consegna e i materiali di produzione, a causa delle lunghezze diminuite di entrambe le procedure pre-REP e REP. Inoltre, il procedimento 2A ha aumentato la flessibilità per il tempo di spedizione dei prodotti. Le differenze tra il procedimento 1C e il procedimento 2A nel pre-REP, nel REP e nella raccolta del procedimento (si veda la tabella 2) includono:

3.1.1 Palloni più grandi con aumentata capacità di frammenti tumorali utilizzati nella procedura di pre-REP.

3.1.2 Passaggi che fanno uso di un sistema chiuso o che sono trattabili per l'adattamento futuro a un sistema chiuso.

3.1.3 Numero ridotto di giorni in entrambe le procedure pre-REP e REP.

3.1.4 Un approccio diretto al REP, che ha eliminato la necessità di fenotipizzare le popolazioni pre-REP prima di selezionare specifiche popolazioni di TIL pre-REP per procedere al REP.

3.1.5 Una co-coltura con un numero predeterminato di APC PBMC allogeneiche irradiate in combinazione con anti-CD3 (clone OKT3) calcolato per una sufficiente espansione dei TIL.

3.1.6 Un sistema di lavaggio delle cellule automatizzato per la raccolta.

3.1.7 Una formulazione finale a base di CS10 che è stata preservata criogenicamente prima della spedizione.

**Tabella 31: Impatto del procedimento 2A sul procedimento 1C.**

<b>Passaggio del procedimento</b>	<b>Procedimento 1C</b>	<b>Procedimento 2A</b>	<b>Impatto</b>
<b>PASSAGGIO A: ottenere un campione di tumore da un paziente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>dopo l'intervento chirurgico, possono essere congelati dopo la raccolta e prima del passaggio B.</li> <li>frammentazione fisica</li> <li>4 frammenti per 10 palloni G-REX-10</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>dopo l'intervento chirurgico, possono essere congelati dopo la raccolta e prima del passaggio B.</li> <li>frammentazione fisica</li> <li>40 frammenti per 1 pallone G-REX-100M</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>lo stesso</li> </ul>
<b>PASSAGGIO B: prima espansione</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>durata di 11-21 giorni</li> <li>il terreno di crescita comprende IL-2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>durata di 11 giorni (intervallo da 3 giorni a 14 giorni)</li> <li>il terreno di crescita comprende IL-2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>aumentati frammenti tumorali</li> <li>tempo di coltura per pallone accorciato</li> <li>numero ridotto di passaggi</li> <li>favorevole ad un sistema chiuso</li> </ul>

<p><b>PASSAGGIO C: transizione dalla prima espansione alla seconda espansione</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• i TIL del passaggio B vengono congelati fino a che non vengono fenotipizzati per la selezione, quindi vengono scongelati per procedere al passaggio D (~giorno 30)</li> <li>• il passaggio D richiede <math>&gt;40 \times 10^6</math> TIL</li> <li>• 6 palloni G-REX-100M al giorno 0 del passaggio D</li> <li>• <math>5 \times 10^6</math> TIL e <math>5 \times 10^8</math> cellule nutritive presentanti l'antigene per pallone al giorno 0 del passaggio D</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• i TIL del passaggio B passano direttamente al passaggio D al giorno 11 del passaggio B</li> <li>• il passaggio D richiede 25-200 <math>\times 10^6</math> TIL</li> <li>• 1 pallone G-REX-500M al giorno 11 del passaggio B</li> <li>• 25-200 <math>\times 10^6</math> TIL e <math>5 \times 10^9</math> cellule nutritive presentanti l'antigene al giorno 11 del passaggio B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• procedimento da pre-REP a REP accorciato</li> <li>• numero ridotto di passaggi</li> <li>• eliminata la selezione di fenotipizzazione</li> <li>• favorevole ad un sistema chiuso</li> <li>• numero ridotto di passaggi</li> <li>• durata del REP più breve</li> <li>• trasferimento a sistema chiuso dei TIL tra palloni</li> <li>• scambi dei mezzi a sistema chiuso</li> </ul>
<p><b>PASSAGGIO D: seconda espansione</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• divisione in 18-36 palloni al giorno 7 del passaggio D</li> <li>• durata di 14 giorni per il passaggio D</li> <li>• terreno di crescita comprende IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• divisione <math>\leq 6</math> palloni G-REX-500M al giorno 16</li> <li>• durata di 11 giorni per il passaggio D</li> <li>• terreno di crescita comprende IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene</li> </ul>	

<b>PASSAGGIO E: raccolta dei TIL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• raccolta dei TIL mediante centrifugazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• raccolta dei TIL mediante il sistema di lavaggio delle cellule automatizzato LOVO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• numero ridotto di passaggi</li> <li>• lavaggio delle cellule automatizzato</li> <li>• sistema chiuso</li> <li>• perdita di prodotto ridotta durante il lavaggio</li> </ul>
<b>PASSAGGIO F: formulazione finale/ trasferimento alla sacca per infusione tempo del procedimento complessivo stimato</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prodotto fresco in Hypothermosol</li> <li>• singola sacca per infusione</li> <li>• stabilità di spedizione limitata</li> <li>• 43-55 giorni dal passaggio A al passaggio E</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prodotto crioconservato in PlasmaLyte-A + HSA all'1% e CS10 conservato in LN2</li> <li>• aliquote multiple</li> <li>• stabilità di spedizione più lunga</li> <li>• 22 giorni dal passaggio A al passaggio E</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• flessibilità di spedizione</li> <li>• programmazione dei pazienti flessibile</li> <li>• valutazione del rilascio più tempestiva</li> <li>• consegna al paziente più veloce</li> <li>• diminuita lavorazione nella camera</li> <li>• diminuito costo della merce</li> </ul>

#### 4. ABBREVIAZIONI

µg	microgrammo
µl	microlitro
µm	micrometro
APC	cellule presentanti l'antigene
CD	gruppo di differenziazione
CM	memoria centrale
CM1, CM2	terreni di coltura 1, 2

CO <sub>2</sub>	biossido di carbonio
CS10	terreno di crioconservazione CS10 CryoStor® (BioLife Solutions)
Ct	soglia del ciclo di PCR
DAMP	motivi molecolari associati al danno
dCt	differenza tra il valore di riferimento di Ct e il valore di prova di Ct
ddCt	differenza tra il dCt e il valore standard di Ct per 10 ng
ECAR	velocità di acidificazione extracellulare (misura della glicolisi)
EM	memoria effetttrice
ER+/PR+	recettore degli estrogeni+/recettore del progesterone+
GMP	pratiche di buona fabbricazione
HBSS	soluzione salina bilanciata di Hank
HSA	albumina sierica umana
IFN- $\gamma$	interferone gamma
IL	interleuchina
UI	unità internazionali
LN2	azoto liquido
ml	millilitro
mm	millimetro
ND	non determinato
ng	nanogrammo
°C	gradi Celsius
OCR	tasso di consumo dell'ossigeno (misura della fosforilazione ossidativa)
OKT3	designazione del clone dell'anticorpo monoclonale anti-CD3
PBMC	cellule mononucleate del sangue periferico

PD	sviluppo di procedimenti
REP	protocollo di espansione rapida
Rh	ricombinante umano
SOP	procedura operativa standard
T/S	rapporto tra il numero di copie di ripetizioni telomeriche e il numero di copie di geni singoli
TIL	linfocita infiltrante il tumore
VDJ	segmenti variabili, di diversità, e di legame del recettore dei linfociti T
V $\alpha$ , V $\beta$	segmenti della regione variabile del recettore dei linfociti T maturo nel linfocita infiltrante il tumore prevalente
$\mu$ g	microgrammo
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ m	micrometro
APC	cellule presentanti l'antigene
CD	gruppo di differenziazione
CM	memoria centrale
CM1, CM2	terreni di coltura 1, 2
CO <sub>2</sub>	biossido di carbonio
CS10	terreno di crioconservazione CS10 CryoStor® (BioLife Solutions)
Ct	soglia del ciclo di PCR
DAMP	motivi molecolari associati al danno
dCt	differenza tra il valore di riferimento di Ct e il valore di prova di Ct
ddCt	differenza tra il dCt e il valore standard di Ct per 10 ng
ECAR	velocità di acidificazione extracellulare (misura della glicolisi)
EM	memoria effetttrice
ER+/PR+	recettore degli estrogeni+/recettore del progesterone+

GMP	pratiche di buona fabbricazione
HBSS	soluzione salina bilanciata di Hank
HSA	albumina sierica umana
IFN- $\gamma$	interferone gamma
IL	interleuchina
UI	unità internazionali
LN2	azoto liquido
ml	millilitro
mm	millimetro
ND	non determinato
ng	nanogrammo
°C	gradi Celsius
OCR	tasso di consumo dell'ossigeno (misura della fosforilazione ossidativa)
OKT3	designazione del clone dell'anticorpo monoclonale anti-CD3
PBMC	cellule mononucleate del sangue periferico
PD	sviluppo di procedimenti
REP	protocollo di espansione rapida
Rh	ricombinante umano
SOP	procedura operativa standard
T/S	rapporto tra il numero di copie di ripetizioni telomeriche e il numero di copie di geni singoli
TIL	linfocita infiltrante il tumore
VDJ	segmenti variabili, di diversità, e di legame del recettore dei linfociti T
V $\alpha$ , V $\beta$	segmenti della regione variabile del recettore dei linfociti T maturo nel linfocita infiltrante il tumore prevalente

## 5. DISEGNO SPERIMENTALE

## 5.1 Procedimento 2A

5.1.1 **Pre-REP:** in seguito alla ricezione, il tumore è stato trasferito a una cabina di sicurezza biologica (classe II, tipo A2). Utilizzando una tecnica sterile, il tumore viene rimosso dal contenitore per spedizioni e lavato in HBSS contenente 50 µg/ml di gentamicina. Il tecnico spezzetta il tumore in 40 frammenti da 3 × 3 × 3 mm che vengono trasferiti ad un pallone G-REX-100M contenente mezzo CM1 preriscaldato arricchito con 6.000 UI/ml di rhIL-2. Il pallone viene posto in un incubatore umidificato per colture di tessuti a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% per 11 giorni. Se il tumore genera più di 40 frammenti, allora più di un G-REX-100M può essere allestito. Le cellule vengono quindi raccolte e preparate per il REP.

5.1.2 **REP:** al giorno 11, viene preparato un pallone G-REX-500M contenente 5 l di CM2 arricchito con 3.000 UI/ml di rhIL-2, 30 ng/ml di anti-CD3 (clone OKT3) e 5 × 10<sup>9</sup> cellule nutritive PBMC allogene irradiate. I TIL raccolti dal pallone G-REX-100M pre-REP dopo la riduzione del volume vengono contati e seminati nel pallone G-REX-500M a una densità che può variare tra 5 × 10<sup>6</sup> e 200 × 10<sup>6</sup> cellule. Il pallone viene quindi posto in un incubatore per colture di tessuti umidificato a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% per cinque giorni. Al giorno 16, il volume del pallone G-REX-500M viene ridotto, i TIL vengono contati e la loro vitalità viene determinata. A questo punto, i TIL vengono espansi in multipli palloni G-REX-500M (fino ad un massimo di sei palloni), ciascuno con una densità di semina di 1 × 10<sup>9</sup> TIL/pallone. Tutti i palloni vengono quindi posti in incubatori umidificati per coltura tissutale al 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5% per altri sei giorni. Al giorno 22, il giorno di raccolta, ciascun pallone è ridotto nel volume del 90%, le cellule vengono raggruppate insieme e filtrate attraverso un filtro da 170 µm per il sangue, e quindi raccolte in una sacca Origin EV3000 da 3 l o equivalente in preparazione per il lavaggio automatizzato utilizzando il LOVO.

5.1.3 **Raccolta e formulazione finale:** i TIL vengono lavati utilizzando il sistema automatizzato di lavorazione cellulare LOVO che sostituisce il 99,99% del terreno di coltura cellulare con un tampone di lavaggio composto da PlasmaLyte-A arricchito con HSA all'1%. Il LOVO funziona utilizzando la tecnologia di una membrana di filtrazione rotante che recupera oltre il 92% dei TIL eliminando potenzialmente componenti residui della coltura tissutale, compreso il siero, fattori di crescita, e citochine, così come altri detriti e materiali particellari. Dopo il completamento del lavaggio, una conta cellulare viene eseguita per determinare l'espansione dei TIL e la loro vitalità a seguito della raccolta. Il CS10 viene aggiunto ai TIL lavati ad un rapporto 1:1 volume:volume per raggiungere la formulazione finale del procedimento 2A. Il prodotto finale formulato viene suddiviso in aliquote in sacche da crioconservazione, sigillato, e posto in cassette di alluminio preraffreddate. Le sacche da crioconservazione contenenti i TIL vengono quindi congelate utilizzando un congelatore a velocità controllata CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts) secondo la SOP LAB-018 Rev 000 dell'operazione del congelatore a velocità controllata.

5.2 **Campioni di TIL:** quattro condizioni dei TIL sono state raccolte per il confronto di caratterizzazione.

5.2.1 TIL raccolti di fresco (direttamente da PlasmaLyte-A con tampone di lavaggio con HSA all'1%), TIL scongelati (direttamente dalla sacca del prodotto finale scongelato)

5.2.2 TIL re-REP freschi con fenotipo esteso (TIL raccolti di fresco sottoposti a coltura per 7-14 giorni con IL-2, cellule nutritive PBMC, ed il clone OKT3 anti-CD3)

5.2.3 TIL scongelati con fenotipo esteso (TIL scongelati sottoposti a coltura per 7-14 giorni con IL-2, cellule nutritive PBMC, ed il clone OKT3 anti-CD3)

5.3 **Panoramica della valutazione** (si veda la figura 2)

5.3.1 La **valutazione pre-REP** comprende la valutazione della quantità di IL-2 e l'analisi dei metaboliti della coltura cellulare quali glucosio, acido lattico, L-glutammina e ammoniaca in ogni parte del pre-REP.

5.3.1.1 Quantificazione di IL-2: il mezzo è stato periodicamente rimosso dalla coltura pre-REP e testato mediante ELISA per la quantificazione di IL-2. Fare riferimento alle istruzioni del produttore del kit ELISA Quantikine per IL-2 umana da R&D Systems.

5.3.1.2 Analisi dei metaboliti della coltura cellulare: il mezzo è stato periodicamente rimosso dalla coltura pre-REP e testato per i seguenti metaboliti: glucosio, acido lattico, L-glutammina e ammoniaca. Fare riferimento al manuale dell'utente del bioanalizzatore Roche Cedex per istruzioni.

5.3.2 La **valutazione del REP** includeva saggi estesi quali conte cellulari, % di vitalità, analisi in citometria a flusso di molecole della superficie cellulare, potenza (produzione di IFN- $\gamma$ ), saggio bioluminescente di lisi reindirizzata, produzione di granzima B, metabolismo cellulare e misurazione della lunghezza dei telomeri.

5.3.2.1 **Conte cellulari e vitalità:** i campioni dei TIL sono stati contati e la vitalità è stata determinata utilizzando un contatore di cellule automatizzato Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, Massachusetts) secondo la SOP LAB-003 Rev 000° del contatore di cellule automatizzato citometro per immagini Cellometer K2.

5.3.2.2 **Analisi in citometria a flusso di biomarcatori della superficie cellulare:** i campioni dei TIL sono stati suddivisi in aliquote per l'analisi in citometria a flusso di marcatori della superficie cellulare utilizzando la procedura delineata in WRK LAB-041 Rev 000 per la colorazione di antigeni di superficie dei TIL post-REP

5.3.2.3 **Saggio della potenza (produzione di IFN- $\gamma$ ):** un'altra misura del potenziale citotossico è stata misurata determinando i livelli della citochina IFN- $\gamma$  nei mezzi dei TIL stimolati con anticorpi contro CD3, CD28, e CD137/4-1BB. I livelli di IFN- $\gamma$  nei mezzi da questi TIL stimolati

sono stati determinati utilizzando il WRK LAB-016 Rev 000 per la stimolazione dei TIL per misurare il rilascio di IFN- $\gamma$ .

5.3.2.4 **Saggio bioluminescente di lisi reindirizzata:** Il potenziale citotossico dei TIL di lisare cellule bersaglio è stato valutato utilizzando un saggio di co-cultura dei TIL con la linea cellulare bioluminescente, P815 (clone G6), secondo la SOP delineata in WRK LAB-040 per il saggio bioluminescente di lisi reindirizzata (saggio della potenza) per i TIL.

5.3.2.5 **Produzione di granzima B:** il granzima B è un'altra misura della capacità dei TIL di uccidere le cellule bersaglio. I surnatanti dei mezzi ristimolati come descritto in 5.2.5.3 sono stati valutati anche per i loro livelli di granzima B utilizzando il kit ELISA DuoSet per il granzima B umano (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota) secondo le istruzioni del produttore.

5.3.2.6 **Metabolismo cellulare (respiratorio):** le cellule sono state trattate con inibitori della respirazione mitocondriale e della glicolisi per determinare un profilo metabolico per i TIL consistente della seguente misura: fosforilazione ossidativa basale (misurata mediante OCR), capacità respiratoria residua, attività glicolitica basale (misurata mediante ECAR), e riserva glicolitica. I profili metabolici sono stati eseguiti utilizzando la procedura delineata in WRK LAB-029 per il saggio combinato Seahorse della prova da stress mitocondriale e della glicolisi.

5.3.2.7 **Misurazione della lunghezza dei telomeri:** diversi metodi sono stati utilizzati per misurare la lunghezza di telomeri nel DNA genomico e in preparazioni citologiche. L'analisi dei frammenti di restrizione terminali dei telomeri (TRF) è lo standard elettivo per misurare la lunghezza dei telomeri (de Lange et al., 1990). Tuttavia, la limitazione principale della TRF è il requisito di una quantità elevata di DNA (1,5  $\mu$ g). Due tecniche ampiamente utilizzate per la misurazione delle lunghezze dei telomeri e, precisamente, l'ibridazione fluorescente in situ (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, California) e la PCR quantitativa.

5.3.3 Sono stati presi campioni addizionali per le seguenti prove, e potrebbero essere analizzati nel futuro come richiesto:

5.3.3.1 Analisi in profondità delle citochine

5.3.3.2 Sequenziamento del TCR

## 6. RISULTATI OTTENUTI

Un totale di 9 esperimenti sono stati eseguiti utilizzando i TIL derivati dai tumori descritti nel disegno sperimentale della sezione 2.3 e nelle condizioni di raccolta nella sezione 5.1. I TIL raccolti utilizzando il procedimento 2A sono stati sottoposti alla valutazione delineata nella sezione 5.3.2 allo scopo di comprendere la loro capacità di espandersi, la loro vitalità, il fenotipo, il potenziale citotossico, e il profilo metabolico. Tutte le misure sono state prese per il prodotto dei TIL raccolti di fresco e il prodotto dei TIL congelati e scongelati (procedimento 2A).

6.1 Conte delle cellule e vitalità

6.1.1 Le conte delle cellule sono state prese alla fine del pre-REP, al giorno 5 o 6 del REP (giorno dell'espansione), ed alla fine del REP, sia prima del lavaggio LOVO che dopo il lavaggio LOVO. Le conte cellulari sono state quindi utilizzate per determinare l'espansione dei TIL durante il REP e il recupero dei TIL dopo il lavaggio sul LOVO. Dopo lo scongelamento, le cellule sono state contate ancora per determinare il recupero dopo lo scongelamento (in base alla concentrazione alla quale i TIL sono stati congelati) e la vitalità dopo lo scongelamento prima di procedere con un altro saggio analitico. La tabella 3 riassume tutti questi risultati per le nove corse del procedimento 2A.

**Tabella 32: conte delle cellule, % di vitalità, ed espansione dei TIL dalle corse del procedimento 2A.**

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
<b>inoculo pre-REP</b>	$3,3 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$
<b>conta del giorno 5/6</b>	$1,3 \times 10^9$	$4 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$6,6 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
<b>espansione dal giorno 0 al giorno 11</b>	898	590	470	130	1900	522	771	1400	850
<b>raccolta</b>	$2,8 \times 10^{10}$	$5,6 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{10}$	$7,8 \times 10^9$	$2,63 \times 10^{10}$	$5 \times 10^{10}$	$6,7 \times 10^{10}$	$4,1 \times 10^{10}$
<b>recupero mediante LOVO (%)</b>		68	100	100	92	95	100	90	99
<b>sacche da crioconservazione</b>	3 x 30 ml	2 x 100 ml	2 x 100 ml	2 x 50 ml	3 x 100 ml	2 x 65 ml	2 x 100 ml	2 x 100 ml	2 x 100 ml
<b>recupero dopo lo scongelamento (%)</b>	103	84	90	88	101	82	82	86	78
<b>vitalità dopo lo scongelamento</b>	84,75	84,36	77,15	83,48	79,98	74,85	80,28	85,03	89,21

(%)									
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--

6.1.2 La SOP del procedimento 2A definisce il numero di partenza dei TIL per un REP come intervallo di  $5-200 \times 10^6$  TIL. L'intervallo dei nove campioni dei TIL utilizzati per cominciare i REP del procedimento 2A era da  $4,1 \times 10^6$  (M1065T) a  $1,8 \times 10^8$  (M1064T), con un numero di TIL medio di partenza di  $6,58 \times 10^7$ . In modo interessante, il REP piastrato con il numero inferiore di TIL ha avuto l'espansione più grande alla raccolta REP (intervallo di espansione per tutti e 9 i REP: da 130 a 1.900 volte; espansione media, 840 volte). Il numero medio dei TIL raccolti alla fine di questi nove REP del procedimento 2A era  $4,49 \times 10^{10}$  (intervallo  $7,8 \times 10^9 - 6,7 \times 10^{10}$ ).

6.1.3 Per statistica comparativa del procedimento 1C, si veda sezione di chimica, produzione, e controlli (CMC) della Domanda per un nuovo farmaco da investigare (IND) per LN144/LN-145.

6.1.4 Il procedimento 1C utilizza la manipolazione manuale e la centrifugazione per lavare il prodotto dei TIL. Questo richiede maggior tempo, ma in maniera più importante può risultare nella perdita di fino al 25% del prodotto tra la raccolta e la formulazione finale. Il sistema di lavaggio automatizzato delle cellule LOVO fornisce un modo per minimizzare la perdita cellulare ed introduce anche un lavaggio a sistema chiuso che diminuisce il rischio di contaminazione del prodotto durante i passaggi di lavaggio. Il recupero del prodotto in seguito al passaggio di lavaggio con il LOVO del protocollo ha mostrato una media del  $93,8 \pm 10,4\%$  di recupero del prodotto dei TIL che entrano nel passaggio di lavaggio. Questa statistica comprende il prodotto dei TIL per M1062T, che ha avuto un recupero mediante LOVO del 68%, durante il quale un errore dell'operatore nell'operazione del LOVO è risultato nella necessità di centrifugare il campione e quindi di ricominciare la procedura LOVO (si veda la sezione 7, deviazioni e differenze). Questo rappresenta un miglioramento altamente favorevole a seguito del passaggio di lavaggio del procedimento 1C al giorno di raccolta del REP.

6.1.5 Anche il recupero dei TIL dopo lo scongelamento è un'importante preoccupazione per un prodotto dei TIL congelati. Il recupero del prodotto è stato determinato misurando il numero di cellule recuperate dalla sacca dopo lo scongelamento rispetto al numero di cellule poste in ciascuna sacca da congelamento prima della crioconservazione. L'intervallo di recupero dallo scongelamento era del 78 - 103%, con un recupero medio dell' $88,2 \pm 8,6\%$ .

6.1.6 Sebbene vi sia una differenza significativa nella vitalità dei campioni prima o dopo lo scongelamento, mediamente, vi è solo una perdita nella vitalità del 2% a seguito dello scongelamento. La vitalità dei TIL che vanno incontro alla crioconservazione era dell' $84,3 \pm 4,7\%$ , e gli stessi TIL dopo lo scongelamento avevano una vitalità dell' $82,1 \pm 4,4\%$  ( $p = 0,0742$ , test t di Student appaiato, non parametrico). I criteri di rilascio per il prodotto dei TIL freschi clinici del procedimento 1C richiede una vitalità minima del 70%. Indifferentemente da una piccola perdita di vitalità a

seguito dello scongelamento, tutte le 9 corse del procedimento 2A soddisfano questo criterio di rilascio in seguito allo scongelamento del prodotto criogenico. La tabella 4 e la figura 3 mostrano la vitalità dei TIL che vanno incontro alla crioconservazione (freschi + CS10) e la vitalità dei TIL a seguito dello scongelamento.

**Tabella 33: Confronto della vitalità del prodotto fresco e scongelato.**

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
<b>fresco + CS10</b>	88,05	84,45	82,05	86,75	76,35	77,9	84,8	87,5	90,5
<b>scongelato</b>	84,75	84,36	77,15	83,48	79,98	74,85	80,28	85,03	89,21

**6.2 Espansione re-REP dei TIL.** Oltre ad esaminare la capacità del prodotto fresco di espandersi in un REP, la capacità del prodotto di entrambi i TIL freschi e scongelati di espandersi a seguito della ristimolazione con cellule nutritive APC PBMC fresche allogene irradiate e anti-CD3 fresco è stata valutata. Dopo 7 giorni, questi prodotti dei TIL ristimolati sono stati analizzati per la loro capacità di espandersi dalle condizioni iniziali di coltura. La figura 4 e la tabella 5 mostrano l'espansione media delle cellule TIL re-REP dopo 7 giorni di crescita in coltura. L'analisi dei dati utilizzando un test t di Student accoppiato mostra che la capacità dei TIL di espandersi in un re-REP non è significativamente differente se si comincia il REP con un prodotto dei TIL freschi o dei TIL scongelati ( $p = 0,81$ ).

**Tabella 34: Confronto dell'espansione dei TIL freschi e scongelati in coltura re-REP**

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
<b>fresco</b>	139,67	264	227	60,12	24,67	268,83	176	316,33	202,33
<b>scongelato</b>	177,33	110,33	220,67	177,6	220,2	302,5	114,77	190,67	73,82

**6.3 Metaboliti della coltura cellulare.** Una delle principali premesse del procedimento 2A era che meno tempo della tecnologia e trasferimenti nel procedimento condurrebbero a risparmi di costo e limiterebbero la variabilità. Le possibili conseguenze avverse di ciò erano aumenti dei metaboliti indesiderati e diminuzioni delle fonti di nutrienti. Come mostrato nella figura 5, i valori del sangue normali di elettroliti (sodio e potassio), sostanze nutritive (glutammina e glucosio), e metaboliti (acido lattico e ammoniaca) forniscono un intervallo per considerare quando valutare i risultati che emergono dal pre-REP di 11 giorni. Come mostrato nella figura 6, tre TIL (M1061T, M1062T, e M1064T) sono stati valutati consecutivamente. In

questa impostazione, potassio e sodio erano mantenuti a livelli normali, il glucosio era a >1,0 g/l e la glutammina a >0,3 mmol/l, ben sopra i valori del sangue normali più bassi. Come atteso, il lattato è salito a ben 0,8 g/l, circa 5X il livello trovato nel sangue normalmente e l'ammoniaca a ben 3 mmol/l, come atteso dalle cellule espanse rapidamente e anche sostanzialmente superiore a ciò che si trova normalmente nel sangue.

#### 6.4 Quantificazione di IL-2

6.4.1 Il principale motore della proliferazione dei TIL nel pre-REP oltre al glucosio e alla glutammina integrativi e ad una sufficiente ossigenazione, è la fornitura di livelli elevati di rhIL-2. In seguito alla sua aggiunta a terreni contenenti siero, i livelli di IL-2 sono stati misurati a  $2-3,5 \times 10^3$  UI/ml, diminuendo solo a circa  $1,0 \times 10^3$  UI/ml nel corso degli 11 giorni di cultura. Questo è ben superiore ai 30-100 UI/ml necessari per sostenere la proliferazione dei linfociti T. La valutazione delle concentrazioni di IL-2 utilizzando fonti differenti di IL-2 (Prometheus, Akron, Cellgenix) è attualmente in valutazione in esperimenti separati (QP-17-010: qualificazione di IL-2 da Cellgenix, Akron e Prometheus) presso Lion Biotechnologies, Tampa.

#### 6.5 Produzione di IFN- $\gamma$

6.5.1 Dopo la stimolazione di 24 ore dei TIL con Dynabeads magnetiche anti-CD3, CD28 e 4-1BB come descritto nella sezione 5.3.5.3, il surnatante dalle colture è stato raccolto e analizzato per l'IFN- $\gamma$  utilizzando i kit ELISA. Tutti i TIL ristimolati hanno prodotto più IFN- $\gamma$  rispetto alle loro controparti non stimolate, mostrando che la stimolazione dei TIL è risultata nella loro attivazione. La figura 8 mostra la capacità delle quattro differenti composizioni di TIL (TIL freschi, scongelati, freschi re-REP e scongelati re-REP) testate di rilasciare IFN- $\gamma$  nel mezzo circostante a seguito della ristimolazione.

Le **tabelle 6 e 7** mostrano i valori medi della secrezione di IFN- $\gamma$  nelle 9 corse del procedimento 2A. La secrezione di IFN- $\gamma$  nel mezzo circostante a seguito della ristimolazione non è differente tra il prodotto dei TIL freschi e i TIL crioconservati scongelati. La tabella 6 mostra che il prodotto fresco ha prodotto una media di  $4.143 \pm 2.285$  pg di IFN- $\gamma/10^6$  TIL mentre il prodotto scongelato ha prodotto  $3.910 \pm 1.487$  pg di IFN- $\gamma/10^6$  TIL ( $p = 0,55$  utilizzando il test t di Student accoppiato). Se normalizzato nei confronti del prodotto dei TIL totale (tabella 7), mediamente, i TIL freschi stimolati hanno prodotto  $86 \pm 61$  g di IFN- $\gamma$ , mentre i TIL scongelati stimolati hanno prodotto  $68 \pm 40$  g di IFN- $\gamma$  ( $p = 0,13$ ). Queste scoperte indicano che entrambi i prodotti dei TIL freschi e scongelati producono IFN- $\gamma$  e che non vi è differenza nella capacità dei TIL corrispondenti freschi o scongelati di produrre IFN- $\gamma$  a seguito della stimolazione con anti-CD3/anti-CD28/anti4-1BB.

**Tabella 35: Secrezione di IFN- $\gamma$  nei TIL freschi e scongelati (espressa come pg/10<sup>6</sup> cellule/24 ore)**

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001 T	M1056T	M1058T	M1023T

<b>freschi</b>	4570	3921	5589	619	1363	4263	6065	2983	7918
<b>scongelato</b>	3158	3543	5478	1563	2127	5059	4216	4033	6010
<b>freschi re-REP</b>	3638	1732	971	2676	2753	1461	2374	770	3512
<b>scongelati re-REP</b>	2970	2060	1273	1.074	1744	2522	5042	4038	923

**Tabella 36: secrezione di IFN- $\gamma$  nei TIL freschi e scongelati. Tutti i valori sono in 1012 (espressi come grammi/106 cellule/24 ore)**

	<b>M1061T</b>	<b>M1062T</b>	<b>M1063T</b>	<b>M1064T</b>	<b>M1065T</b>	<b>EP11001 T</b>	<b>M1056T</b>	<b>M1058T</b>	<b>M1023T</b>
<b>freschi</b>	67,1	78,4	99,6	8,4	4,8	66,1	157,0	109,0	187,0
<b>scongelati</b>	47,7	59,7	87,9	18,7	7,5	64,4	88,9	127,0	111,0

## 6.6 Produzione di granzima B

6.6.1 I TIL sono stati stimolati con Dynabeads magnetiche anti-CD3, CD28 e 4-1BB per 24 ore come descritto in 5.2.5.3. e il surnatante dalle colture è stato raccolto dopo 24 ore e analizzato per i livelli di granzima B mediante ELISA. Tutti i TIL ristimolati hanno prodotto più granzima B rispetto alle loro controparti non stimolate, mostrando che la stimolazione dei TIL è risultata nella loro attivazione. La figura 9 mostra la capacità dei TIL freschi, dei TIL freschi re-REP, e dei TIL scongelati re-REP di rilasciare granzima B nel mezzo circostante a seguito della ristimolazione con il cocktail di citochine.

Tutti i prodotti hanno mostrato una produzione di granzima B variabile da 9.190 pg/10<sup>6</sup> cellule vitali a 262.000 pg/10<sup>6</sup> cellule vitali (tabella 8). La tabella 6 mostra che il prodotto fresco ha prodotto una media di 60.644 + 42.959, mentre i re-REP freschi e scongelati hanno prodotto 93.600 + 67.558 e 103.878 + 84.515 rispettivamente. Il confronto tra i re-REP freschi e i re-REP scongelati ha mostrato che non vi è differenza nella capacità dei TIL ottenuti da nessuna delle due condizioni (p = 0,7). A causa della mancanza della misurazione del granzima B nel prodotto scongelato, non è stata eseguita alcuna analisi statistica utilizzando il prodotto dei TIL freschi.

**Tabella 37: Secrezione di granzima B nei TIL freschi, nei TIL freschi re-REP, e nei TIL re-REP scongelati (espressa come pg/106 cellule/24 ore)**

	<b>M1061T</b>	<b>M1062T</b>	<b>M1063T</b>	<b>M1064T</b>	<b>M1065T</b>	<b>EP11001T</b>	<b>M1056T</b>	<b>M1058T</b>	<b>M1023T</b>

<b>freschi</b>	10600	108000	49100	28400	24300	17900	120.000	12900	79100
<b>freschi re-REP</b>	216000	37700	42400	91800	192000	22200	97300	73800	69200
<b>scongelati re-REP</b>	262000	113000	35100	65600	48700	9190	147000	201000	53300

#### 6.7 Analisi in citometria a flusso di biomarcatori della superficie cellulare

Profilazione fenotipica dei TIL: quattro pannelli di anticorpi sono stati standardizzati presso LION per caratterizzare ampiamente il profilo funzionale di linfociti T. Questi pannelli sono stati utilizzati per verificare l'immunofenotipizzazione dei TIL freschi, dei TIL scongelati, dei TIL freschi re-REP, e dei TIL scongelati re-REP. Tutti i dati utilizzati per la rappresentazione grafica in questa sezione vengono forniti anche in un formato di tabella (tabelle 14-24) nella sezione 10 dell'appendice.

#### 6.8 Saggio bioluminescente di lisi reindirizzata

6.8.1 Per determinare la potenziale capacità dei TIL del procedimento 2A di uccidere le loro cellule tumorali bersaglio, noi abbiamo sviluppato un saggio d'efficacia riguardante la co-coltura dei TIL con una linea cellulare bersaglio surrogata bioluminescente P815, come descritto nella sezione 5.3.2.4. Una co-coltura di 4 ore delle differenti composizioni di TIL con P815 in presenza di stimolazione anti-CD3 dà una misura del potenziale citotossico delle cellule TIL espresso come LU50, unità di lisi, che può essere definito come il numero di TIL necessario per uccidere il 50% delle cellule bersaglio. Questo misura è quindi espressa come LU50/10<sup>6</sup> TIL. La figura 32 sotto mostra il potenziale citotossico dei TIL dal prodotto fresco, e dalle due condizioni dei TIL re-REP, freschi re-REP e scongelati re-REP.

6.8.2 Il confronto tra i freschi re-REP e gli scongelati re-REP mostra che non vi è differenza significativa nella capacità di nessuno dei due TIL di uccidere una cellula bersaglio ( $p = 0,3126$ ). Questi dati supportano la conclusione che non vi è differenza tra il prodotto fresco e quello scongelato in termini del potenziale citotossico del prodotto dei TIL. Nessun confronto tra i freschi è stato eseguito, dal momento che il potenziale citotossico non è stato misurato immediatamente dopo lo scongelamento dei TIL. La tabella 9 mostra le unità di lisi dei TIL richieste per uccidere il 50% della linea cellulare bersaglio P815.

**Tabella 38: unità di lisi prodotte dai TIL nei confronti della linea cellulare bersaglio P815**

	<b>freschi</b>	<b>freschi re-REP</b>	<b>scongelati re-REP</b>
<b>M1061T</b>	21,7	42,3	342

<b>M1062T</b>	5,9	17,0	20,9
<b>M1063T</b>	14,2	161	12,5
<b>M10641</b>	22,2	8,7	4,4
<b>M10651</b>	42,6	411	128 8
<b>EP11001T</b>	1,8	4,3	147
<b>M1056T</b>	25,0	16,6	18,2
<b>M10513T</b>	76,9	13,8	16,6
<b>M1023T</b>	30,8	25,6	30,4
<b>media ± DS</b>	26,8 ± 22,5	20,6 ± 13,3	31,1 ± 37,6

## 6.9 Profilo di metabolismo cellulare dei TIL

6.9.1 Per valutare la salute metabolica dei TIL post-REP, noi abbiamo utilizzato gli strumenti analizzatori del metabolismo Seahorse (XFp e XFe96) da Agilent Technologies (Santa Clara, California) seguendo il protocollo delineato nella sezione 5.3.2.6. In breve, trattando cellule con inibitori che hanno come bersaglio alcuni aspetti della fosforilazione ossidativa o della glicolisi, le cellule sono sollecitate in modo tale da permettere la determinazione della loro SRC e della loro riserva glicolitica. Inoltre, i livelli basali di entrambe la fosforilazione ossidativa (OCR basale) e la glicolisi (ECAR basale) possono essere determinati. Infine, poiché gli inibitori della fosforilazione ossidativa e della glicolisi sono combinati nella stessa prova, può essere distinta una potenziale riserva nascosta di SRC che è evidente solo quando le cellule vengono trattate con l'inibitore competitivo della glicolisi, 2-deossiglucosio (2-DG), (marcato SRC2DG), risultando in un aumento dell'SRC che potrebbe altrimenti rimanere nascosto. Questa capacità respiratoria extra è stato marcato come SRC "nascosta". La tabella 9 mostra i profili metabolici dei TIL raccolti di fresco, dei TIL freschi re-REP, e dei TIL scongelati re-REP derivati dalla prova da stress metabolico eseguita sulle cellule.

6.9.2 Le **figure 55A - F** mostrano i dati dalla tabella 38 in forma di grafico. Il prodotto REP raccolto di fresco mostra alcune differenze statistiche dai prodotti re-REP freschi e re-REP scongelati. Questo non è sorprendente poiché il prodotto re-REP è stato ristimolato con APC PBMC fresche irradiate e l'anticorpo anti-CD3 fresco immediatamente dopo il REP o a seguito dello scongelamento. Tuttavia, in tutti i casi, non vi è alcuna differenza significativa tra i prodotti freschi e scongelati quando entrambi sono ristimolati in una procedura di re-REP (si vedano i valori di p della tabella 9). Questo indica che il procedimento di crioconservazione non influisce negativamente i prodotto dei TIL. Più in particolare, per la

fosforilazione ossidativa, i prodotti re-REP hanno un'SRC superiore rispetto ai loro prodotti REP raccolti di fresco corrispondenti. Per la glicolisi, i TIL re-REP hanno livelli di glicolisi statisticamente significativamente più elevati basali ed al contrario livelli statisticamente inferiori di riserva glicolitica rispetto al prodotto REP fresco. Vale la pena considerare che questo potrebbe indicare che i TIL re-REP sono più altamente attivati rispetto ai TIL raccolti di fresco, dal momento che si riporta che i TIL sani attivati posseggono livelli elevati di attività glicolitica (Buck et al., JEM 212:1345-1360; 2015).

**Tabella 39: Profilo metabolico dei TIL del procedimento 2A**

OCR basale, pmol/min	M1061	M1062	M1063	Moff2	Moff3	Moff4	EP11001	M1064	M1065	media	DS	p v. fresco	p v. fresco re-REP
PLLA	50,33	33,95	74,89	36,80	38,48	39,89	63,02		55,89	49,16	14,56		
freschi re- REP	38,92	38,48	54,35	25,98	18,68	38,61	37,33	41,04		36,67	10,57	0,03	
scongelati re- REP	39,25	43,28	60,05	30,68	57,90	59,08	27,85	52,58	32,82	44,83	12,90	0,48	0,11
<b>SRC manifesta, pmol/min</b>													
PLLA	24,74	10,45	101,18	47,32	77,00	35,07	31,39		3,02	41,27	33,22		
freschi re- REP	51,72	36,46	48,24	28,34	37,69	21,02	9,93	99,71		41,64	27,17	0,29	
scongelati re- REP	47,38	40,40	121,86	26,04	37,32	86,47	58,45	89,59	56,45	62,66	30,75	0,16	0,12
<b>SRC20G, pmol/min</b>													
PLLA	14,01	5,72	35,98	29,97	74,62	24,42	31,39		20,70	29,60	20,67		
freschi re- REP	81,80	78,82	52,73	38,69	92,37	42,35	-12,81	137,15		63,89	44,45	0,08	
scongelati re- REP	76,97	77,72	177,48	48,27	56,57	69,05	74,14	130,76	85,89	88,54	40,59	0,00	0,25

REP													
<b>SRC latente, pmol/min</b>													
PLLA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		17,68	2,21	6,25		
freschi re- REP	30,08	42,36	4,50	10,35	54,68	21,33	0,00	2,63		20,74	20,13	0,02	
scongelati re- REP	29,59	37,32	55,62	22,23	19,25	0,00	15,68	41,16	29,44	27,81	16,10	0,01	0,52
<b>ECAR basale, mpH/min</b>													
PLLA	53,44	27,55	136,33	48,72	89,80	62,29	108,38		72,07	74,82	35,20		
freschi re- REP	96,48	96,63	171,47	102,87	145,19	153,97	35,60	147,02		118,65	44,19	0,10	
scongelati re- REP	143,35	173,93	193,39	149,19	169,21	73,17	98,64	96,37	90,55	131,98	43,15	0,01	0,38
<b>Riserva glicolitica, mpH/min</b>													
PLLA	32,11	26,18	52,00	19,09	38,01	39,03	43,14		76,43	40,75	17,61		
freschi re- REP	24,06	8,75	18,17	-8,28	-5,89	10,31	35,34	20,80		12,91	14,85	0,003	
scongelati re- REP	15,50	-18,94	13,56	-6,78	11,45	54,84	-21,37	-12,66	-5,47	3,35	23,75	0,01	0,47

6.9.3 Un confronto diretto tra i prodotti freschi e congelati utilizzando la procedura di re-REP ci ha permesso di determinare che entrambi i prodotti dei TIL freschi e congelati, a seguito di condizioni di stimolazione identiche, risultano in profili metabolici che sono statisticamente indistinti. Entrambi i TIL freschi re-REP e scongelati re-REP hanno livelli simili di respirazione basale (figura 60A,  $36,7 \pm 10,6$  e  $44,8 \pm 12,9$  pmol/min, rispettivamente;  $p = 0,11$ ) così come SRC (manifesta) simile (figura 60B,  $41,6 \pm 27,2$  e  $62,7 \pm 30,8$ ;  $p = 0,12$ ). A seguito del trattamento di queste cellule re-REP con 2-DG, l'inibitore competitivo del glucosio, che risulta in un'inibizione della glicolisi, si vede che entrambi i TIL freschi e

scongelati re-REP mostrano una capacità respiratoria residua extra “nascosta” (SRC2DG; SRC latente) che è principalmente bassa o assente nel campione dei TIL raccolti di fresco (figura 60C); un solo campione aveva livelli elevati di SRC2DG (figura 60C) nei TIL raccolti di fresco, mentre al contrario, solo uno dei sette campioni testati mostrava una mancanza di SRC latente a seguito del re-REP. L’SRC latente (figura 60D) per i freschi re-REP aveva una media di  $20,7 \pm 20,1$  mentre l’SRC nascosta (figura 60D) per i re-REP scongelati variava tra  $27,8 \pm 16,1$ ;  $p = 0,52$ ).

6.9.4 La lettura metabolica più sorprendente dei TIL con fenotipo esteso (re-REP) sono i livelli costantemente elevati di glicolisi basale dei campioni con fenotipo esteso (re-REP). La glicolisi basale (figura 60E) è costantemente elevata nei campioni re-REP, avendo una media di  $118,7 \pm 44,2$  mpH/min nei re-REP freschi e di  $132,0 \pm 43,2$  mpH/min nei re-REP scongelati. Questi campioni non sono statisticamente differenti l’uno dall’altro ( $p = 0,38$ ). Tuttavia, come citato sopra, il campione raccolto di fresco non possiede tali livelli basali elevati di glicolisi. In confronto ai TIL freschi re-REP, questa differenza è sostanziale, ma non significativa ( $p = 0,10$ ); tuttavia, quando viene confrontata con i campioni re-REP scongelati, la differenza è significativa ( $p = 0,01$ ). Queste cellule re-REP sono apparentemente fortemente dipendenti dalla glicolisi per i loro bisogni energetici, dal momento che essi hanno poca riserva glicolitica rimanente quando sollecitati nelle prove metaboliche Seahorse (figura 60F): media dei TIL freschi re-REP  $12,9 \pm 14,9$  mpH/min; TIL scongelati re-REP,  $3,35 \pm 23,8$  mpH/min). Questi re-REP non sono differenti l’uno dall’altro ( $p = 0,47$ ) ma entrambi sono statisticamente differenti rispetto alla riserva glicolitica trovata nei campioni dei TIL raccolti di fresco, che hanno una media di  $40,8 \pm 17,6$  mpH/min ( $p = 0,003$  e  $0,01$  in confronto ai TIL freschi re-REP e scongelati re-REP, rispettivamente). Ulteriori studi dovrebbero essere condotti per determinare la causa sottostante alle differenze viste nelle glicolisi tra questi campioni dei TIL raccolti di fresco e re-REP.

## 6.10 Misurazione della lunghezza dei telomeri

### 6.10.1 Misurazione della lunghezza dei telomeri dei TIL post-REP mediante flow-FISH e qPCR.

6.10.1.1 La flow-FISH è stata eseguita utilizzando il kit di soluzioni per patologia Dako/Agilent (kit per telomeri PNA/FITC per citometria a flusso) e sono state seguite le istruzioni del produttore per misurare la lunghezza media della ripetizione telomerica. La linea di linfociti T di leucemia 1301 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) è stata utilizzata come standard interno di riferimento in ciascun saggio. I singoli TIL sono stati contati e miscelati con le cellule 1301 ad un rapporto cellulare 1:1.  $2 \times 10^6$  TIL sono stati miscelati con  $2 \times 10^6$  cellule 1301. L’ibridazione in situ è stata eseguita in una soluzione di ibridazione (formammide al 70%, BSA all’1%, Tris 20mM, pH 7,0) in duplice copia e in presenza e in assenza di una sonda telomerica PNA coniugata con FITC (FITC-00-CCCTAA-CCC-TAA-CCC-TAA) complementare alla sequenza di ripetizione telomerica a una concentrazione finale di 60nM. Dopo l’aggiunta della sonda telomerica PNA, le cellule sono state incubate per 10 minuti a  $82^\circ\text{C}$  in un blocco

riscaldante. Le cellule sono state quindi poste al buio a temperatura ambiente per una notte. Il mattino seguente, la sonda telomerica in eccesso è stata rimossa mediante lavaggio 2 volte per 10 minuti ciascuno su un blocco riscaldante a 40°C con una soluzione di lavaggio. In seguito ai lavaggi, DAPI (Invitrogen, Carlsbad, California) è stato aggiunto a una concentrazione finale di 75 ng/ml. La colorazione del DNA con DAPI è stata utilizzata per contrastare le cellule nella popolazione G0/G1. L'analisi del campione è stata eseguita utilizzando un citometro a flusso Yeti (Propel-Labs, Fort Collins, Colorado). La fluorescenza dei telomeri del campione in esame è stata espressa come percentuale della fluorescenza (fl) delle cellule 1301 mediante la formula seguente: lunghezza relativa dei telomeri = [(media delle cellule in esame con fl FITC con sonda - media delle cellule in esame con fl FITC senza sonda) × indice del DNA delle cellule 1301 × 100] / [(media delle cellule 1301 con fl FITC con sonda - media delle cellule 1301 con fl FITC senza sonda) × indice del DNA delle cellule in esame].

6.10.1.2 **qPCR:** La qPCR in tempo reale è stata utilizzata per misurare la lunghezza relativa dei telomeri. In breve, il rapporto (T/S) tra il numero di copie di ripetizioni telomeriche e il numero di copie di geni singoli è stato determinato utilizzando un ciclizzatore termico PCR Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) in un formato da 96 pozzetti. Dieci nanogrammi di DNA genomico sono stati utilizzati per la reazione di PCR dei telomeri (Tel) o dell'emoglobina (hgb) e gli inneschi utilizzati erano i seguenti: innesco Tel-1b (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), innesco Tel-2b (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), innesco hgb1 (GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC), e innesco hgb2 (CACCAACTTCATCCACGTTCAACC). Tutti i campioni sono stati analizzati mediante entrambe le reazioni dei telomeri e dell'emoglobina, e l'analisi è stata eseguita in triplice copia sulla stessa piastra. Oltre ai campioni in esame, ciascuna piastra da 96 pozzetti conteneva una curva standard a cinque punti da 0,08 ng a 250 ng utilizzando il DNA genomico isolato dalle cellule 1301. Il rapporto T/S (-ddCt) per ciascun campione è stato calcolato sottraendo il valore di soglia del ciclo (Ct) mediano dell'emoglobina dal valore di Ct dei telomeri mediano. Il relativo rapporto T/S (-ddCt) è stato determinato sottraendo il rapporto T/S del punto della curva standard di 10 ng dal rapporto T/S di ciascun campione sconosciuto.

6.10.1.3 **Risultati della lunghezza dei telomeri e discussione:** I telomeri sono cappucci (sequenze ripetitive nucleotidiche) all'estremità dei cromosomi lineari che svolgono un ruolo critico nel facilitare la replicazione di cromosomi completi. La misurazione dei telomeri è uno strumento emergente nello studio di condizioni quali malattie degenerative, cancro, ed invecchiamento. Studi precedenti da NIH (J. Immunol., 15 novembre 2005; 175(10):7046-52; Clin. Cancer Res., 1 luglio 2011; 17(13): 4550- 4557) hanno mostrato che la lunghezza più lunga dei telomeri dei TIL è associata a una risposta clinica. Al contrario, il gruppo di Radvanyi non ha trovato alcuna differenza significativa nella lunghezza dei telomeri dei TIL tra responsivi e non responsivi (Clin Cancer Res; 18(24); 6758-70). Finora, non vi è alcuna prova per dimostrare che la lunghezza dei telomeri

è associata alla lunghezza della coltura in vitro dei linfociti T. È possibile che i TIL post-REP sottoposti a coltura mediante il procedimento 2A (22 giorno coltura) avranno una lunghezza dei telomeri più lunga in confronto ai TIL sottoposti a coltura mediante il procedimento 1C (coltura di 25-36 giorni).

## **7. DIFFERENZE E DEVIAZIONI**

### **7.1 Deviazioni dal procedimento**

7.1.1 M1061T: Le cellule REP sono state separate al giorno 6 in 4 palloni G-Rex-500M.

7.1.2 M1062T: Le cellule REP sono state separate al giorno 6 in 4 palloni G-Rex-500M. A causa di un errore dell'operatore sul sistema di filtrazione LOVO, è avvenuto un arresto di emergenza durante la procedura che ha richiesto una raccolta manuale dei TIL dal kit monouso. I TIL sono stati filtrati con successo durante una seconda corsa LOVO.

7.1.3 M1063T: Nessuna deviazione. M1064T: Nessuna deviazione.

7.1.4 M1065T: Le cellule pre-REP erano al di sotto delle specifiche per la conta cellulare al giorno 11 ( $<5 \times 10^6$  cellule) ma sono state mandate avanti nel REP. Al giorno 6 del REP, le cellule sono state contate e riposte nel G-Rex500M ed alimentate con 4,5 l di terreno fresco. I TIL non sono stati espansi a questo giorno a causa della conta cellulare insufficiente ( $<1 \times 10^9$  cellule al giorno 6 del REP).

7.1.5 EP11001T: Nessuna deviazione.

7.1.6 M1056T: Le cellule pre-REP sono state sottoposte a coltura presso LION in un pallone G-Rex 100 per fino a 21 giorni. I frammenti di tumore sono stati filtrati al giorno 11 del pre-REP e i TIL sono stati congelati al giorno di raccolta in CS10 al 100% a  $30 \times 10^6$  cellule per flaconcino da 1,5 ml. I TIL congelati sono stati scongelati presso Moffitt PD in CM1 arricchito con 6.000 UI/ml di rhIL-2 e hanno riposato per 3 giorni prima di iniziare il giorno 0 del REP. Al giorno 6 del REP, i TIL sono stati espansi in 4 palloni che hanno proceduto alla raccolta al giorno 11 del REP.

7.1.7 M1058T: Le cellule pre-REP sono state sottoposte a coltura presso LION in un pallone G-Rex 100 per fino a 21 giorni. I frammenti di tumore sono stati filtrati al giorno 11 del pre-REP e i TIL sono stati congelati al giorno di raccolta in CS10 al 100% a  $30 \times 10^6$  cellule per flaconcino da 1,5 ml. I TIL congelati sono stati scongelati presso Moffitt PD in CM1 arricchito con 6.000 UI/ml di rhIL-2 e hanno riposato per 3 giorni prima di iniziare il giorno 0 del REP. Al giorno 6 del REP, le cellule sono state separate in 4 palloni che hanno proceduto alla raccolta al giorno 11 del REP.

7.1.8 M1023T: Le cellule pre-REP sono state sottoposte a coltura presso LION in palloni G-Rex-10 per fino a 21 giorni. I frammenti di tumore sono stati filtrati al giorno 11 del pre-REP e i TIL sono stati congelati al giorno di raccolta in CS10 al 100% a  $30 \times 10^6$  cellule per flaconcino da 1,5 ml. I TIL congelati sono stati scongelati presso Moffitt PD in CM1 arricchito con 6.000 UI/ml di rhIL-2 e hanno riposato per 3 giorni prima di

iniziare il giorno 0 del REP. Al giorno 6 del REP, le cellule sono state fatte espandere in 4 palloni che hanno proceduto alla raccolta al giorno 11 del REP.

## 7.2 Deviazioni dalla valutazione

7.2.1 L'analisi in profondità delle citochine e il sequenziamento del TCR non sono stati eseguiti.

## 8. CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI

8.1 **Sviluppo di un procedimento più robusto.** La sfida per Lion era quella di convertire il precedente procedimento 1C di Lion, che aveva un tempo di trattamento lungo, ad un procedimento 2A di Lion potenzialmente più commerciabile che utilizza raffinamenti che risultano in un tempo di trattamento più breve e una formulazione finale del prodotto dei TIL crioconservati. A questo scopo, nove corse di sviluppo di procedimenti sono state condotte per confermare che i procedimenti vecchio e nuovo dimostravano rese cellulari paragonabili e potenza e fenotipo dei TIL paragonabili. Di particolare importanza è stata la complessità marcatamente diminuita del procedimento complessivo, che è risultata in una riduzione del 50% nella lunghezza complessiva dei procedimenti pre-REP e REP, risultando comunque ancora in rese di TIL paragonabili ( $7,8 \times 10^9$  -  $67 \times 10^9$  cellule) rispetto al procedimento 1C di Lion storico attualmente messo in pratica presso il nostro produttore a contratto. Questo è stato recentemente aggiornato per la presentazione ASCO del giugno 2017 (media:  $41,04 \times 10^9$  cellule con un intervallo di  $1,2-96 \times 10^9$  cellule). Inoltre, Lion ha sviluppato con successo un prodotto dei TIL crioconservati che ha dimostrato un recupero dopo lo scongelamento del 78-103% con vitalità dei TIL >70%, corrispondente ai criteri di rilascio del procedimento 1C corrente (si veda la tabella 2).

8.2 **Ruolo dell'analisi fenotipica estesa (re-REP).** L'abilità di proliferare in risposta alla stimolazione mitogenica (come nei re-REP sperimentali presentati in questo studio) è un attributo di qualità fondamentale dei TIL. Gli esperimenti presentati qui mostrano che 8/9 prodotti dei TIL scongelati sono stati in grado di espandere >100 volte in una settimana in confronto a 7/9 prodotti dei TIL freschi corrispondenti, sostenendo la comparabilità del prodotto dei TIL scongelati con il prodotto dei TIL freschi (tabella 2). Due ulteriori attributi di qualità critici dei TIL sono la loro capacità di rilasciare IFN- $\gamma$  e/o granzima B in seguito alla stimolazione con citochine (CD3/CD28/4-1BB). La stimolazione con citochine di entrambi i prodotti freschi e scongelati è risultata in un rilascio di IFN- $\gamma$  eccedente  $2 \text{ ng}/10^6$  cellule/24 ore in 7/9 prodotti freschi e in tutti i prodotti scongelati (figura 35) (si veda la sezione 6.2 di questo studio). Il rilascio di granzima B (figura 36) è stato osservato in tutte le 9 corse del procedimento. I livelli di CD4 e CD8 (figura 39 e figura 40) hanno dimostrato una notevole coerenza interna tra i prodotti dei TIL freschi e scongelati. Inoltre, l'analisi della capacità dei TIL di uccidere una linea di cellule tumorali surrogate bersaglio (P815, figura 59) ha mostrato che i TIL freschi e scongelati possedevano un potenziale citotossico simile.

8.3 **Una prova da stress metabolico dei TIL rivela una bioenergetica robusta.** Un'analisi dei profili metabolici dei prodotti dei TIL freschi e scongelati stimolati in un re-REP ha dimostrato che entrambi i TIL freschi e scongelati hanno risposto in modo simile alla prova da stress metabolico e non hanno mostrato alcuna differenza effettiva in un pannello di caratteristiche metaboliche (tabella 39). Così, il prodotto dei TIL crioconservati del procedimento 2A può essere considerato paragonabile al prodotto fresco del procedimento 1C in base ai quattro attributi di qualità di identità, potenza, numero di cellule, e vitalità presentati in questo studio. I saggi che confrontavano cellule fresche e scongelate corrispondenti erano abbastanza paragonabili in ogni saggio delineato in questo studio.

8.4 **Criteri di accettabilità:** L'eterogeneità intrinseca dei prodotti dei TIL con una terapia personalizzata per ciascun paziente riflette: (1) le loro uniche molecole limitanti il complesso maggiore di istocompatibilità (i prodotti genici più polimorfici nella biologia umana); (2) la traiettoria evolutiva unica di singoli tumori che emergono nel microambiente tumorale con instabilità genomica e singole mutazioni driver e passenger uniche; e (3) l'eterogeneità conferita dalla variazione allelica, dalla diversità della regione N, e dai riarrangiamenti con VDJ nei segmenti V $\alpha$  e V $\beta$  che definiscono i recettori dei linfociti T utilizzati per il riconoscimento di neoepitopi hanno condiviso antigeni di tumore-testicolo, e prodotti codificati viralmente. La valutazione di un'ulteriore variazione che si verifica come risultato di modifiche del procedimento è così un compito scoraggiante e richiede la valutazione di quanti più parametri possibile per assicurare tale "comparabilità" di un materiale intrinsecamente eterogeneo come possibile. Questo è stato realizzato esaminando fedelmente diversi criteri di accettabilità per la fattibilità e la comparabilità come descritto in dettaglio nella tabella 40 sotto.

**Tabella 40: criteri di accettabilità per la fattibilità e la comparabilità**

<b>Punto di campionamento</b>	<b>Parametro</b>	<b>Metodo della prova</b>	<b>Criteri di accettabilità per la fattibilità</b>	<b>Criteri di accettabilità per la comparabilità</b>
	cellule vitali totali	contatore di cellule automatizzato con AOPI	$\geq 1,5 \times 10^9$ cellule vitali	Nessuna significatività statistica tra i bracci del re-REP dei freschi e congelati (valore di $p < 0,05$ )
	% di vitalità	contatore di cellule automatizzato con AOPI	$\geq 70\%$ di cellule vitali	Nessuna significatività statistica tra i bracci del re-REP dei freschi e congelati (valore di $p < 0,05$ )

	purezza	citometria a flusso	≥90% di linfociti T	Nessuna significatività statistica tra i bracci del re-REP dei freschi e congelati (valore di p<0,05)
		sequenziamento del TCR	N/A	N/A
	potenza	ELISA per IFN-γ	≥2x lo sfondo e ≥400pg/1 x 10 <sup>6</sup> cellule vitali/ 24 ore	Nessuna significatività statistica tra i bracci del re-REP dei freschi e congelati (valore di p<0,05)
		ELISA per il granzima B	≥2x lo sfondo	N/A
		saggio bioluminescente di lisi reindirizzata	N/A	N/A
respirazione	prova da stress Seahorse	N/A	N/A	

In base ai criteri di fattibilità elencati nella tabella 11, i TIL saranno valutati riguardo il fatto se i requisiti sono stati soddisfatti oppure no. Tutti i singoli criteri sono stati soddisfatti per ciascun esperimento e ciascuna linea di TIL (n=9). Il test t di Student è stato utilizzato per l'analisi statistica. Il test t di Student non parametrico è stato utilizzato per calcolare il valore di p per la % di vitalità dal momento che le misure della vitalità non avranno una distribuzione gaussiana. Si veda la tabella 41 sotto.

**Tabella 41: Soddisfazione dei criteri di accettabilità per la fattibilità.**

Linea di TIL	Conta cellulare		% di vitalità		Purezza (citometria a flusso)		Potenza (ELISA per IFN-γ) pg/1 x 10 <sup>6</sup> cellule/24 ore	
	freschi	scongelati	freschi	scongelati	freschi	scongelati	freschi	scongelati
M1061T	6,48x10 <sup>9</sup>	6,66x10 <sup>9</sup>	88,05	84,93	95,3	91,5	4570	3158
M1062T	6,76x10 <sup>9</sup>	5,70x10 <sup>9</sup>	84,45	83,73	99,7	98,9	3921	3543
M1063T	14,9x10 <sup>9</sup>	13,5x10 <sup>9</sup>	82,05	77,15	98,7	99,6	5589	5478
M1064T	8,06x10 <sup>9</sup>	7,08x10 <sup>9</sup>	86,75	83,36	84,5	89,8	619	1563
M1065T	3,06x10 <sup>9</sup>	3,10x10 <sup>9</sup>	76,35	80,90	96,8	91,4	1363	2127

EP11001T	14,9x10 <sup>9</sup>	12,2x10 <sup>9</sup>	77,9	74,85	90,4	94,3	4263	5059
M1056T	13,1x10 <sup>9</sup>	10,7x10 <sup>9</sup>	84,8	80,20	94,2	94,1	6065	4216
M1058T	23,4x10 <sup>9</sup>	20,1x10 <sup>9</sup>	87,5	85,07	99	96,2	2983	4033
M1023T	18,4x10 <sup>9</sup>	144x10 <sup>9</sup>	90,5	89,52	96,5	98,8	7918	6010
<b>valore di P</b>	0,1132		0,0742		0,9855		0,5821	
<b>significativamente differente</b>	No		No		No		No	

In base ai criteri di accettabilità elencati nella tabella 40, i TIL re-REP freschi e congelati sono stati valutati riguardo il fatto se i requisiti sono stati soddisfatti oppure no. (La vitalità non è stata riportata poiché la durata del re-REP era di 7 giorni e le PBMC irradiate residue non potevano essere distinte dai TIL.) I numeri tra parentesi indicano i criteri che non sono stati soddisfatti. Sulla base dei criteri di purezza misurati utilizzando l'espressione CD3+, 6/9 prodotti dei TIL freschi re-REP hanno soddisfatto i criteri severi >90% (M1061, M1065 e EP11001 no) e 8/9 prodotti scongelati hanno passato i criteri di accettabilità perfino in seguito al re-REP. Il basso numero di TIL CD3+ nei freschi re-REP di EP11001T potrebbe essere attribuito all'estrema sottoregolazione del recettore dei linfociti T. La misurazione dei TIL CD3+ come misura di purezza non è stata determinata per i TIL scongelati re-REP di M1023T. Per questa composizione di TIL, la purezza è stata stimata utilizzando la colorazione del TCRab ed è indicata da un asterisco (\*). Il test t di Student è stato utilizzato per l'analisi statistica. Si veda la tabella 42 sotto.

**Tabella 42: Soddisfazione dei criteri di accettabilità per la comparabilità.**

Linea di TIL	Conta cellulare		Purezza (citometria a flusso)		Potenza (ELISA per IFN- $\gamma$ ) pg/1 x 10 <sup>6</sup> cellule/24 ore	
	freschi re-REP	scongelati re- REP	freschi re-REP	scongelati re- REP	freschi re-REP	scongelati re- REP
<b>M1061T</b>	1,40x10 <sup>6</sup>	1,77x10 <sup>6</sup>	<b>(86,1)</b>	99,3	3638	2970
<b>M1062T</b>	2,64x10 <sup>6</sup>	1,10x10 <sup>6</sup>	99,3	97,1	1732	2060
<b>M1063T</b>	2,27x10 <sup>6</sup>	2,21x10 <sup>6</sup>	99,2	97,4	971	1273
<b>M1064T</b>	1,76x10 <sup>6</sup>	1,15 x 10 <sup>6</sup>	83,8	37,8	2676	1.074

<b>M1065T</b>	3,16x10 <sup>6</sup>	1,91x10 <sup>6</sup>	(78,1)	(75,8)	2753	1744
<b>EP11001T</b>	2,02 × 10 <sup>6</sup>	0,738x10 <sup>6</sup>	(18,2)	85,4	1461	2522
<b>M1056T</b>	0,601x10 <sup>6</sup>	1,78x10 <sup>6</sup>	98,1	96,7	2374	5042
<b>M1058T</b>	0,740x10 <sup>6</sup>	2,20x10 <sup>6</sup>	98,4	99,2	770	4038
<b>M1023T</b>	2,69x10 <sup>6</sup>	3,03 × 10 <sup>6</sup>	97	39,9*	3512	923
<b>valore di P</b>	0,6815		0,3369		0,7680	
<b>significativamente differente</b>	No		No		No	

#### Bibliografia

Goff SL, Dudley ME, Citrin DE, Somerville RP, Wunderlich JR, Danforth DN, Zlott DA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Klebanoff CA, Hughes MS, Restifo NP, Langhan MM, Shelton TE, Lu L, Kwong ML, Ilyas S, Klemen ND, Payabyab EC, Morton KE, Toomey MA, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 10;34(20):2389-97. doi: 10.1200/JCO.2016.66.7220. Epub 2016 May 23. PubMed PMID: 27217459; PubMed Central PMCID: PMC4981979.

Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev*. 2014 Jan;257(1):56-71. doi:10.1111/imr.12132. Review. PubMed PMID: 24329789; PubMed Central PMCID: PMC3920180.

Jin J, Sabatino M, Somerville R, Wilson JR, Dudley ME, Stroncek DF, Rosenberg SA. Simplified method of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. *J Immunother*. 2012 Apr;35(3):283-92. doi:10.1097/CJI.0b013e31824e801f. PubMed PMID: 22421946; PubMed Central PMCID: PMC3315105.

Somerville RP, Devillier L, Parkhurst MR, Rosenberg SA, Dudley ME. Clinical scale rapid expansion of lymphocytes for adoptive cell transfer therapy in the WAVE® bioreactor. *J Transl Med*. 2012 Apr 4;10:69.

Donia M, Larsen SM, Met O, Svane IM. Simplified protocol for clinical-grade tumor-infiltrating lymphocyte manufacturing with use of the Wave bioreactor. *Cytotherapy*. 2014 Aug;16(8):1117-20. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.004; PubMed PMID: 24831841.

Henning AL, Levitt DE, Vingren JL, McFarlin BK. Measurement of T-Cell Telomere Length Using Amplified-Signal FISH Staining and Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2017 Jan 5;79:7.47.1-7.47.10. doi: 10.1002/cpcy.11. PubMed PMID 28055115

Kelesidis T, Schmid I. Assessment of Telomere Length, Phenotype, and DNA Content. *Curr Protoc Cytom*. 2017 Jan 5;79:7.26.1-7.26.23. doi: 10.1002/cpcy.12. PubMed PMID: 28055113.

Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, Bekaert S, Bischoff C, Brooks-Wilson A, Chen W, Cooper C, Christensen K, De Meyer T, Deary I, Der G, Diez Roux A, Fitzpatrick A, Hajat A, Halaschek-Wiener J, Harris S, Hunt SC, Jagger C, Jeon HS, Kaplan R, Kimura M, Lansdorp P, Li C, Maeda T, Mangino M, Nawrot TS, Nilsson P, Nordfjall K, Paolisso G, Ren F, Riabowol K, Robertson T, Roos G, Staessen JA, Spector T, Tang N, Unryn B, van der Harst P, Woo J, Xing C, Yadegarfar ME, Park JY, Young N, Kuh D, von Zglinicki T, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team.. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*. 2014 Mar;51:15-27. doi:10.1016/j.exger.2013.12.004. Epub 2013 Dec 21. Review. PubMed PMID: 24365661;PubMed Central PMCID: PMC4523138.

Carbonari M, Tedesco T, Fiorilli M. Correlation between terminal restriction fragments and flow-FISH measures in samples over wide range telomere lengths.

*Cell Prolif*. 2014 Feb;47(1):20-7. doi: 10.1111/cpr.12086. PubMed PMID: 24450811.

Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol*. 1998 Aug;16(8):743-7. PubMed PMID: 9702772.

Li Y, Liu S, Hernandez J, Vence L, Hwu P, Radvanyi L. MART-1-specific melanoma tumor-infiltrating lymphocytes maintaining CD28 expression have improved survival and expansion capability following antigenic restimulation in vitro. *J Immunol*. 2010 Jan 1;184(1):452-65. doi: 10.4049/jimmunol.0901101. Epub 2009 Nov 30. PubMed PMID: 19949105.

Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol*. 2009 Apr;21(2):233-40. doi:10.1016/j.coi.2009.03.002. Epub 2009 Mar 21. Review. PubMed PMID: 19304471; PubMed Central PMCID: PMC3459355.

Shen X, Zhou J, Hathcock KS, Robbins P, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Hodes RJ. Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. *J Immunother*. 2007 Jan;30(1):123-9. PubMed PMID:17198091; PubMed Central PMCID: PMC2151201.

Zhou J, Shen X, Huang J, Hodes RJ, Rosenberg SA, Robbins PF. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):7046-52. PubMed PMID: 16272366; PubMed Central PMCID: PMC1351312.

Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Mar;18(3):175-186.

doi:10.1038/nrm.2016.171. Epub 2017 Jan 18. Review. PubMed PMID: 28096526.

Erdel F, Kratz K, Willcox S, Griffith JD, Greene EC, de Lange T. Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. *Cell Rep.* 2017 Jan 3;18(1):41-53. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.005. PubMed PMID: 28052260; PubMed Central PMCID: PMC5225662.

Cardenas ME, Bianchi A, de Lange T. A *Xenopus* egg factor with DNA-binding properties characteristic of terminus-specific telomeric proteins. *Genes Dev.* 1993 May;7(5):883-94. PubMed PMID: 7684008.

de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 12;91(8):2882-5. Review. PubMed PMID: 8159672; PubMed Central PMCID: PMC43476.

de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol.* 1990 Feb;10(2):518-27. PubMed PMID: 2300052; PubMed Central PMCID: PMC360828.

[“Jul” = luglio;

“May” = maggio;

“Apr” = aprile;

“Aug” = agosto;

“Jan” = gennaio;

“Mar” = marzo;

“Dec” = dicembre;

“Feb” = febbraio;

“Nov” = novembre]

## 9. Tabelle addizionali

**Tabella 43 - Figura 39: cellule CD4+**

ID del tumore	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
fresco	4,85	34	10,5	41,7	64,9	64,7	4,15	12,3	8,38
scongelato	5,68	33	11,3	49,5	61,7	62,6	3,46	17,9	7,6
fresco re-REP	8,1	23,5	19,2	39,	31,9	16,3	6,46	12,9	16,7

scongelato re-REP	11	33	15,3	49,3	39,3	26,7	9,51	17,2	19,1
-------------------	----	----	------	------	------	------	------	------	------

**Tabella 44 - Figura 40: cellule CD8+**

ID del tumore	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
fresco	45,6	54,7	85,8	38,2	28,6	22,3	93,2	84	88,8
scongelato	50,8	55,7	76,7	37	22,8	19	92,9	76,6	84,3
fresco re-REP	63	48,3	72,4	37,9	47,8	5,87	90,3	74,5	74,4
scongelato re-REP	66,3	46,7	47	21,6	19,1	9,23	82,8	63,7	64,3

**Tabella 45 - Figura 41: cellule CD4+CD154+ e figura 105: cellule CD8+CD154+**

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	CD154+	78,6	nd	nd	nd	93,3	62,1	94	76,2
CD8	CD154+	37,3	nd	nd	nd	85,8	19,9	89,3	61,1

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP
CD4	CD154+	88,9	84	56	82,1	68,2	93,6	97	90,3
CD8	CD154+	35,6	49	12,5	19	59,1	77,88	0,025	90,1

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	CD154+	91	87,2	79,1	83,1	89,3	92	90,1	92,6	77,9	66,9
CD8	CD154+	17	20,3	40	36,9	23	27,6	40,5	52,1	17,9	13,7

linfociti	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP
CD4	CD154+	0	91,6	52,1	87,1	77	86,4	92,7	85,1	90,7	81,3
CD8	CD154+	0,00609	61,8	45,3	74,8	47,3	81,7	73,6	78,3	24,2	27,1

Tabella 46 - Figura 43: cellule CD4+CD69+ e figura 17: cellule CD8+CD69+

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo
CD4	CD69+	33,9	nd	nd	nd	82,2	68,8	51,3	84,8
CD8	CD69+	22,4	nd	nd	nd	83	78,3	67,8	78,6

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP
CD4	CD69+	58,7	69,6	67,6	77,6	77,6	86,7	85,5	78,5
CD8	CD69+	80,9	80	62,7	73,2	87,6	87,9	92,2	88,3

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo
CD4	CD69+	82,7	84,4	78,7	58,3	83,9	84,9	89,7	644,6	33,8	38,7
CD8	CD69+	78,9	72,3	69,5	54,5	80,3	86	68	77,8	41,3	48,8

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP
CD4	CD69+	90,2	93,2	74,7	39,1	96,1	93,8	91,1	93,7	35,3	80,1
CD8	CD69+	91,3	90,5	87,6	52,9	95,4	94,2	93,1	93,6	71,1	88,1

Tabella 47 - Figura 45: cellule CD4+CD137+ e figura 19: cellule CD8+CD137+

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo
CD4	CD137+	19,8	nd	nd	nd	65,4	30,4	nd	1,31
CD8	CD137+	19,8	nd	nd	nd	65,4	30,4	nd	1,31

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP
CD4	CD137+	15,4	30,4	73	78,1	62,6	53,2	51,6	64,7
CD8	CD137+	28,8	43,1	39,3	35,3	84,4	85,7	71,1	81

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M11203	
		fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo
CD4	CD137+	524	7,26	7,78	5,4	4,28	3,65	6,89	4,6	4,28	9,67
CD8	CD137+	3,23	7,26	7,78	5,4	4,28	3,65	6,89	4,6	4,28	9,67

linfociti	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 11203	
		fresco	scongelato	fresco re-	scongelato	fresco	scongelato	fresco re-	scongelato	fresco re-	scongelato
T		re- REP	re-REP	REP	re-REP	re- REP	re-REP	REP	re-REP	REP	re-REP
CD4	CD137+	31,1	24,6	65,1	47,8	221	18,6	61,6	56,9	49,8	50,8
CD8	CD137+	50,9	33,8	57,3	54,6	77,3	78,8	76,9	87	58	50,3

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	CM	1,08	n/d	0,59	0,29	10,4	2,08	14,4	0,13
CD8	CM	0,37	n/d	0,9	0,17	3,2	0,66	73,2	0,13

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re- REP	scongelato re- REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re- REP	scongelato re- REP
CD4	CM	2,32	7,71	13,8	12,6	13,4	22,3	15,9	18,6
CD8	CM	1,85	9,38	6,48	14,2	15,7	25,7	24,2	25,8

linfociti	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
T											
CD4	CM	0,42	0,53	0,48	1,17	1,83	1,5	1,36	1,8	2,45	1,79
CD8	CM	0,21	0,67	2,65	1,79	0,33	0,72	0,91	0,67	1,99	2,22

linfociti	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		fresco re- REP	scongelato re-REP	fresco re- REP	scongelato re-REP	fresco re- REP	scongelato re-REP	fresco re- REP	scongelato re-REP	fresco re- REP	scongelato re-REP
CD4	CM	7,03	2,28	18,9	3,73	49,6	55,6	20,1	12,6	22,1	12,7
CD8	CM	5,05	1,6	11,4	3,37	25,8	26,4	21,6	19,8	11,1	7,59

Tabella 49 - Figura 49: cellule dell'EM CD4+ e figura 23: cellule dell'EM CD8+

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	EM	90	n/d	98,3	98,9	83,9	97,2	84,1	99,8
CD8	EM	89,1	n/d	80,6	87,9	92,4	97,8	20,8	98,8

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re- REP	scongelato re- REP	fresco re- REP	scongelato re- REP	fresco re- REP	scongelato re- REP	fresco re- REP	scongelato re- REP
CD4	EM	95,6	84,4	84,5	83,4	84,3	73,7	80,6	80,4
CD8	EM	97,2	87,9	90,8	82,3	82,5	72,2	74,5	73

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	EM	99,4	99,4	96,7	97,4	97,1	97,8	97,4	97,6	9,62	95,3
CD8	EM	98,3	98,6	91,8	95,5	98,8	98,9	98,8	99,2	93,9	95,2

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP
CD4	EM	91,7	97	74,3	90,7	36,2	25,5	73,9	81,8	73,1	76,4
CD8	EM	91,5	96,1	83	90,8	73,2	71,9	77,1	78,2	84,1	85,1

Tabella 50 - Figura 51: cellule CD4+ CD28+ e figura 25: cellule CD8+CD28+

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	CD28+	4,6	5,85	33,2	37	10,5	11,2	31,9	27,6
CD8	CD28+	30,1	34	24,5	23,1	83,8	49,3	22,5	15,5

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP
CD4	CD28+	6,75	7,18	21,6	27,8	18,6	15	23	27,6
CD8	CD28+	24,6	17,9	10	6,4	28,6	18,9	15,7	11

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	CD28+	41,7	38,2	63,2	59,8	3,97	3,29	12,2	17,5	8,27	7,48
CD8	CD28+	13,4	8,52	14,5	12	53	54,4	56,5	62,1	76,5	80,8

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		fresco re- REP	scongelo re-REP	fresco re- REP	scongelo re-REP	fresco re- REP	scongelo re-REP	fresco re- REP	scongelo re-REP	fresco re- REP	scongelo re-REP
CD4	CD28+	12,3	15,2	13,3	20	6,22	9,29	12,3	16,5	15,4	17,9
CD8	CD28+	6,9	2,43	2,07	3,75	24	34	27	36,9	42	43,9

Tabella 51 - Figura 53: cellule CD4+PD-1+ e figura 27: cellule CD8+PD-1+

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo
CD4	PD-1+	48,5	nd	nd	nd	77	40,6	nd	22,4
CD8	PD-1+	37,1	nd	nd	nd	56	24,6	nd	14

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP	fresco re- REP	scongelo re- REP
CD4	PD-1+	36,8	34,2	15,7	26,7	43,9	66	32,4	14,5
CD8	PD-1+	40,4	35,3	6,3	6,21	18	20,4	35,6	23,2

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo	fresco	scongelo
CD4	PD-1+	7,87	7,23	33,3	28,2	33,9	32,8	41,7	38	22,7	23,8
CD8	PD-1+	1,61	0,72	19,2	12,5	23,8	24,7	78,4	59,8	42,6	36,1

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP
CD4	PD-1+	22,4	15,5	40,9	33,4	56	51,3	40,3	32,5	18,9	27,3
CD8	PD-1+	6,49	5,73	29,8	34,6	18,9	15,2	68,6	47	28,9	36,1

Tabella 52- Figura 55: cellule CD4+LAG3+ e figura 29: cellule CD8+LAG3+

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	LAG3+	16,8	nd	nd	nd	93,5	37,3	nd	6,8
CD8	LAG3+	74	nd	nd	nd	98,4	81,5	nd	31,8

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP
CD4	LAG3+	68,3	73,1	35,2	56,9	26,9	27,3	52,6	64
CD8	LAG3+	98,3	98,7	97,1	97,7	89,6	85,1	92,8	94,7

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	LAG3+	47,2	30,5	35,5	20,1	25	27,4	48,6	38	14,5	7,65
CD8	LAG3+	85,3	38,7	89,6	64,2	83,4	81,9	93,2	66,3	90,3	71,1

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M 1203	
		fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP
CD4	LAG3+	65,8	68,2	40,9	46	44,1	39,1	52,1	51	48,5	17,7
CD8	LAG3+	95,4	97,8	92,4	92,5	97,5	98,4	98,2	98,3	97,7	78,1

Tabella 53 - Figura 57: cellule CD4+TIM-3+ e figura 31: cellule CD8+TIM-3+

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M 1063		M1064	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	TIM3+	89,7	nd	nd	nd	98,3	87,6	nd	43,2
CD8	TIM3+	99	nd	nd	nd	99,4	88,1	nd	47

linfociti T	marcatori	M1061		M1062		M1063		M1064	
		fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP	fresco re-REP	scongelato re-REP
CD4	TIM3+	95,3	98	94,5	96,9	90,8	90,2	94,2	82,6
CD8	TIM3+	98,9	98,9	97,3	96,7	97,1	97,7	98,2	95,7

linfociti T	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato	fresco	scongelato
CD4	TIM3+	95	78,8	96,9	91,5	96,4	92,5	88,7	80,1	89,9	82,3
CD8	TIM3+	96,9	50,6	98,8	83	98,3	92,9	96,5	73,6	98,2	88,5

linfociti	marcatori	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		fresco re-REP	scongelo re- REP	fresco re-REP	scongelo re- REP	fresco re-REP	scongelo re- REP	fresco re-REP	scongelo re- REP	fresco re-REP	scongelo re- REP
CD4	TIM3+	91,1	95,4	94,3	98,7	74	75,4	86,5	87,3	94,4	90,6
CD8	TIM3+	94,9	96,5	96,3	98,3	98	99	97,3	98,6	99	97,7

**Tabella 54 - Figura 61: determinazione mediante qPCR e flow-FISH della lunghezza delle ripetizioni telomeriche**

ID del tumore	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
qPCR	0,111878	0,135842	0,149685	0,179244	0,151774	0,137738	0,134904	0,124137	0,086569
flow-FISH	9,330236	1215041	8,782231	7,174627	8,961553	6112918	9,010615	7,944534	5,766692

**ESEMPIO 20: NUOVI LINFOCITI INFILTRANTI IL TUMORE CRIOCONSERVATI (LN-144) SOMMINISTRATI A PAZIENTI CON MELANOMA METASTATICO**

Nuovi linfociti infiltranti il tumore crioconservati (LN-144) somministrati a pazienti con melanoma metastatico dimostrano efficacia e tollerabilità in uno studio clinico multicentrico di fase 2.

**INTRODUZIONE:**

La sicurezza e l'efficacia della terapia cellulare adottiva (ACT) con linfociti infiltranti il tumore (TIL) non crioconservati è stata studiata in centinaia di pazienti con melanoma metastatico. Questo studio clinico multicentrico è stato iniziato con TIL prodotti a livello centrale (LN-144) come prodotti di infusione non crioconservati e crioconservati. Il nostro nuovo procedimento di produzione per gli LN-144 non crioconservati viene utilizzato nella coorte 1, e per gli LN-144 crioconservati viene utilizzato accorciato a 3 settimane nella coorte 2. La produzione della coorte 2 offre un procedimento significativamente più breve, accoppiato con un prodotto dei TIL crioconservati che permette la flessibilità della programmazione dei pazienti e del dosaggio. Il procedimento di produzione più breve riduce il tempo di attesa per il paziente per ricevere il prodotto dei suoi TIL e la crioconservazione aggiunge convenienza alla logistica e al rilascio ai siti clinici.

**METODI:**

C-144-01 è uno studio multicentrico prospettico per valutare pazienti con melanoma metastatico che ricevono LN-144. In seguito ad una linfodeplezione non mieloablativa con un regime di preconditionamento con Cy/Flu, i pazienti ricevono una singola infusione di LN-144 seguita dalla somministrazione di IL-2 (600.000 UI/kg) fino a 6 dosi. I pazienti vengono valutati per una risposta oggettiva come obiettivo primario per fino a 24 mesi.

#### RISULTATI:

Noi caratterizziamo i LN-144 crioconservati somministrati a una seconda coorte di pazienti, la coorte 2 (N=10) in seguito allo stesso regime di trattamento prima e dopo l'infusione dei TIL utilizzato per la coorte 1.

I pazienti della coorte 2 sono stati fortemente sottoposti ad un trattamento precedente con un numero aumentato di linee precedenti con tutti i pazienti aventi terapie anti-CTLA-4 ed anti-PD-1, e massa tumorale più grande (SOD media: 15,3, 10,9 cm per le coorti 2, 1). Il numero mediano di terapie sistemiche precedenti è 4, 3 per le coorti 2, 1, rispettivamente. Un'analisi iniziale dei dati sulla sicurezza dimostra una tollerabilità paragonabile degli LN-144 crioconservati. Il profilo di sicurezza per i pazienti della coorte 1 ricevuti gli LN-144 non crioconservati continua a essere accettabile per questa popolazione di pazienti in stadio avanzato. I TEAE più comuni osservati in entrambe le coorti per frequenza sono nausea, anemia, neutropenia febbrile, conta dei neutrofili diminuita, conta piastrinica diminuita. Una rassegna precoce dei dati di efficacia indica attività antitumorale, compresa la PR, alla terapia con TIL osservata in pazienti trattati nella coorte 2.

#### CONCLUSIONI:

Questo rappresenta il primo studio clinico in un'impostazione multicentrica con TIL prodotti a livello centrale che valuta un nuovo procedimento per un prodotto autologo crioconservato con un procedimento significativamente più breve (approssimativamente 3 settimane). I risultati preliminari indicano gli LN-144 crioconservati come opzione terapeutica sicura e tollerabile per pazienti con melanoma metastatico con i quali le multiple terapie precedenti non sono riuscite, compresi gli inibitori dei checkpoint. Gli LN-144 crioconservati forniscono maggiore flessibilità per pazienti e badanti e permettono un trattamento più immediato per pazienti con una tale necessità medica elevata non soddisfatta. NCT02360579.

#### **ESEMPIO 21: VALUTAZIONE DI TERRENI PRIVI DI SIERO PER L'USO NEL PROCEDIMENTO 2A**

Questo esempio fornisce dati che mostrano la valutazione dell'efficacia di terreni privi di siero come sostituzione per i mezzi standard CM1, CM2, e CM4 che sono attualmente utilizzati nel procedimento 2A. Questo studio ha testato l'efficacia di terreni privi di siero (SFM) disponibili e di alternative prive di siero come sostituzione in tre fasi:

Fase 1: è stata confrontata l'efficacia di espansione dei TIL (n= 3) utilizzando uno standard in relazione a terreni privi di siero CTS OpTmizer o

Prime T CDM o Xvivo-20 con o senza sostituto del siero o lisato piastrinico.

Fase 2: è stata testata la condizione con i terreni privi di siero candidati nel procedimento 2A in mini-scala che utilizza G-Rex 5M (n=3).

#### INFORMAZIONI DI SFONDO

Sebbene la combinazione di mezzi corrente utilizzata nella coltura pre- e post-REP ha dimostrato di essere efficace, possono essersi verificati insuccessi del REP con l'AIM-V. Se è stata identificata un'alternativa priva di siero efficace, renderebbe il procedimento più lineare e semplice da eseguire nei CMO riducendo il numero di tipi di mezzi utilizzati da 3 a 1. Inoltre, il SFM riduce la possibilità di malattia occasionale eliminando l'uso del siero umano. Questo esempio fornisce dati che hanno dimostrato supporto all'uso di terreni privi di siero nei procedimenti 2A.

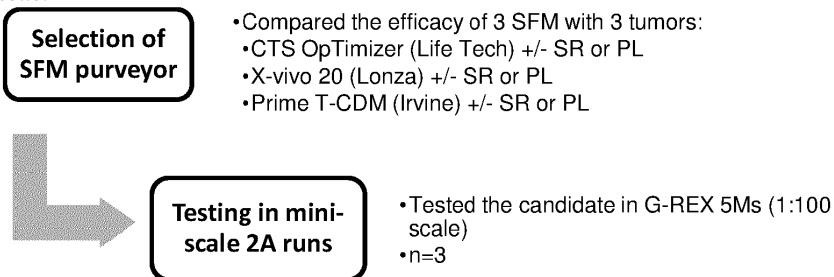
#### ABBREVIAZIONI

µl	microlitro
CM1, 2, 4	Mezzi completi 1, 2, 4
SFM del CTS OpTmizer	terreni privi di siero del sistema di terapia cellulare OpTmizer
g	grammi
hr	ora
IFU	istruzioni per l'uso
IL-2	citochina interleuchina 2
Min	minuto
ml	millilitro
°C	gradi Celsius
pre-REP	protocollo di pre-espansione rapida
REP	protocollo di espansione rapida
RT	temperatura ambiente
SR	sostituto del siero
TIL	linfociti infiltranti il tumore

#### DISEGNO SPERIMENTALE

I pre-REP e i REP sono stati iniziati come citato in LAB-008. La visione d'insieme di queste 3 fasi dell'esperimento viene mostrata nel grafico

sotto:



["Selection of SFM purveyor" = selezione del fornitore di SFM;

"Testing in mini-scale 2A runs" = valutazione in corse 2° in mini-scala;

"Compared the efficacy of 3 SFM with 3 tumors" = comparata l'efficacia di 3 SFM con 3 tumori;

"Or" = oppure;

"Tested the candidate in G-REX 5Ms" = testato il candidato in G-REX 5M;

"1:100 scale" = scala 1:100]

Come fornito nel grafico sopra, il progetto sottintendeva la valutazione di terreni e supplementi privi di siero in due passaggi.

Passaggio 1. Selezione del fornitore di terreno privo di siero. Pre-REP e post-REP sono stati impostati per mimare procedimento 2A in una piastra G-Rex a 24 pozzetti. Il pre-REP è stato iniziato coltivando ciascun frammento/pozzetto della piastra G-Rex a 24 pozzetti in condizioni con triplice o quadruplice copia. Il REP è stato iniziato al giorno 11 coltivando  $4 \times 10^5$  TIL/pozzetto dei 24 pozzetti della G-Rex, con la divisione al giorno 16, la raccolta al giorno 22. CTS OpTimizer, x-Vivo 20, e Prime T-CDM sono stati utilizzati come potenziali terreni privi di siero alternativi per uso nel pre-REP e nel REP. Il sostituto del siero CTS Immune SR (Life Technologies) o il siero di lisato piastrinico (SDBB) sono stati aggiunti al 3% all'SFM. Ciascuna condizione è stata pianificata per la valutazione con almeno 3 tumori in entrambi il pre-REP e il post-REP per mimare il procedimento 2A.

Passaggio 2. I candidati identificati sono stati ulteriormente testati su procedimenti 2A in mini-scala per protocollo (TP-17-007). In breve, il pre-REP è stato iniziato coltivando 2 frammenti/pallone G-Rex 5M in triplice copia per condizione. Il REP è stato iniziato al giorno 11 utilizzando  $2 \times 10^6$ /pallone G-Rex 5M, divisione al giorno 16, raccolta al giorno 22.

**Nota:** Alcuni tumori sono stati sottoposti a lavorazione e messa a punto per misurare parametri multipli in un esperimento.

## OSSERVAZIONI

Sono stati osservati risultati equivalenti o statisticamente migliori nella crescita cellulare confrontando un terreno privo di siero con lo standard utilizzato nel procedimento 2A

Sono stati osservati fenotipo, produzione di IFN- $\gamma$ , e analisi dei metaboliti simili dai TIL cresciuti nei terreni privi di siero quando confrontati con i TIL cresciuti nei mezzi standard utilizzati nel procedimento 2°.

## RISULTATI

### Valutazione dell'efficacia di terreni privi di siero on espansione dei TIL pre- e post-REP.

**CTS OpTmizer + SR (sostituto del siero) ha mostrato un'espansione aumentata dei TIL pre-REP e un'espansione paragonabile dei TIL REP.** CTS OpTmizer, X-Vivo 20, e Prime T-CDM sono stati aggiunti con o senza CTS Immune SR al 3%, sono stati testati nei confronti della condizione standard. In M1079 e L4026, la condizione CTS OpTmizer + CSR ha mostrato un'espansione significativamente aumentata dei TIL pre-REP ( $p < 0,05$ ) quando confrontata con le condizioni standard (CM1, CM2, CM4) (figura 62A). Al contrario, CTS OpTmizer senza CSR non ha aiutato l'espansione dei TIL pre-REP (Appendice 1, 2, 3). CTS OpTmizer + CSR ha mostrato un'espansione paragonabile dei TIL nel post-REP nei due tumori dei 3 testati (figura 2B). Una quantità elevata di variazione è avvenuta nel pre- e nel post-REP con le condizioni di X-Vivo 20 e Prime T-CDM, mentre il CTS OpTmizer era relativamente coerente tra quadruplici copie. Inoltre, il lisato piastrinico addizionato con SFM non aumentava l'espansione dei TIL pre-REP e post-REP in confronto allo standard (figura 62A). Queste scoperte suggeriscono che un sostituto del siero è certamente richiesto per fornire una crescita paragonabile al nostro standard, CTS OpTmizer + CSR può essere un candidato.

Valutazione della condizione candidata nel mini-scala in G-Rex 5M (si veda la figura 64).

Analisi fenotipica dei TIL post-REP. Si veda la figura 66 e la tabella 56 sotto.

**Tabella 56: inclinazione verso CD8 con CTS OpTmizer**

	CD8+ % media	
	Standard	CTS
M1078	11	34
M1079	29,3	43,85
M1080	33,67	54,37

L4020	0,02	0,17
EP11020	28,67	25,07
L4030	0,13	0,09
L4026	9,45	34,06
M1092	5,75	52,47
T6030	66	52,6

Comparabilità dell'interferone gamma

ELISA per l'interferone gamma (Quantikine). La produzione di IFN- $\gamma$  è stata misurata utilizzando il kit ELISA Quantikine da R&D Systems. CTS + SR ha prodotto una quantità paragonabile di IFN- $\gamma$  in confronto alla nostra condizione standard. Si veda la figura 67.

**ESEMPIO 22: IL COCKTAIL PER LINFOCITI DEI FATTORI DI CRESCITA IL-2/IL-15/IL-21 ACCRESCE L'ESPANSIONE E LA FUNZIONE EFFETTRICE DEI LINFOCITI T INFILTRANTI IL TUMORE**

La terapia adottiva con i linfociti T con linfociti infiltranti il tumore (TIL) autologhi ha efficacia clinica dimostrata in pazienti con melanoma metastatico e carcinoma del collo dell'utero. In alcuni studi, gli esiti clinici migliori correlavano positivamente con il numero totale di cellule infuse e/o la percentuale di linfociti T CD8+. I regimi di produzione più attuali utilizzano unicamente IL-2 per promuovere la crescita dei TIL. Un'augmentata espansione dei linfociti è stata riportata utilizzando regimi contenenti IL-15 ed IL-21. Questo studio descrive gli effetti positivi dell'aggiunta di IL-15 ed IL-21 al protocollo dei TIL con IL-2 di seconda generazione recentemente attuato in clinica.

Materiali e metodi

Il procedimento per generare TIL comprende un protocollo di pre-espansione rapida (pre-REP), in cui frammenti tumorali di 1-3 mm<sup>3</sup> di dimensione vengono posti in mezzi contenenti IL-2. Durante il pre-REP, i TIL migrano fuori dai frammenti tumorali e si espandono in risposta alla stimolazione con IL-2.

Per stimolare ulteriormente la crescita dei TIL, i TIL sono espansi attraverso un periodo di coltura secondario chiamato protocollo di espansione rapida (REP) che comprende cellule nutritive PBMC irradiate, IL-2 ed anti-CD3. In questo studio, un protocollo accorciato di espansione pre-REP e REP è stato sviluppato per espandere i TIL mentre si mantengono gli attributi fenotipici e funzionali del prodotto finale dei TIL.

Questo protocollo accorciato di produzione dei TIL è stato utilizzato per verificare l'impatto di IL-2 da sola contro una combinazione di IL2/IL-

15/IL-21. Questi due regimi di coltura sono stati confrontati per la produzione dei TIL cresciuti da tumori coloretali, melanomi, cervicali, tripli negativi della mammella, polmonari e renali. Al completamento del pre-REP, i TIL sottoposti a coltura sono stati valutati per l'espansione, il fenotipo, la funzione (CD107a+ e IFN- $\gamma$ ) e il repertorio del TCR V $\beta$ .

Le colture pre-REP sono state iniziate utilizzando il protocollo standard con IL-2 (600 UI/ml), o con IL-15 (180 UI/ml) ed IL-21 (UI/ml) oltre a IL-2. Le cellule sono state valutate per l'espansione al completamento del pre-REP. Una coltura è stata classificata come avente un'aumentata espansione rispetto all'IL-2 se la crescita complessiva era aumentata di almeno il 20%. Gli studi fenotipici e funzionali di melanoma e polmone vengono presentati qui. Si veda la tabella 57 sotto.

**Tabella 57: Potenziamento dell'espansione durante il pre-REP con IL-2/IL-15/IL-21 in indicazioni multiple**

Istologia del tumore	# di studi con IL-2 rispetto a IL-2/IL-15/IL-21	# di studi che dimostrano un potenziamento della crescita >20% utilizzando IL-2/IL-15/IL-21 (in confronto a IL-2)
melanoma	5	1/5 (20%)
polmonare	8	3/8 (38%)
coloretale	11	7/11 (63%)
cervicale	1	1/1 (100%)
pancreatico	2	2/2 (100%)
glioblastoma	1	1/1 (100%)
triplo negativo della mammella	1	1/2 (50%)

Questi dati dimostrano un'aumentata resa del prodotto dei TIL quando i TIL sono stati sottoposti a coltura con IL-2/IL15/IL-21 in confronto a IL-2 da sola, oltre a differenze fenotipiche e funzionali nel polmone.

L'effetto del triplo cocktail sull'espansione dei TIL era specifico per l'indicazione e ne hanno beneficiato di più i tumori a bassa resa.

Il rapporto fra i linfociti T CD8+/CD4+ è stato aumentato dal trattamento nel prodotto dei TIL nel CPNPC.

L'attività dei linfociti T è sembrata aumentata dall'aggiunta di IL-15 ed IL-21 all'IL-2, come valutato dai livelli dell'espressione di CD107a in entrambi il melanoma e il CPNPC.

I dati forniti qui mostrano che l'espansione dei TIL utilizzando un procedimento più breve, più robusto, quale il procedimento 2A descritto qui nella

domanda e in altri esempi, può essere adattata per comprendere il cocktail di citochine IL-2/IL-15/IL-21, fornendo quindi un mezzo per promuovere ulteriormente l'espansione dei TIL, in particolare in indicazioni specifiche.

Gli esperimenti in atto stanno ulteriormente valutando gli effetti di IL-2/IL-15/IL-21 sulla funzione dei TIL.

Esperimenti addizionali valuteranno l'effetto del triplo cocktail durante il REP (prima espansione).

Queste osservazioni sono specialmente pertinenti all'ottimizzazione e alla standardizzazione dei regimi di coltura dei TIL necessarie per la produzione dei TIL su larga scala con l'ampia applicabilità e disponibilità richieste da una terapia antitumorale dominante.

### **ESEMPIO 23: TIL CRIOCONSERVATI GENERATI CON UN METODO ABBREVIATO**

#### **Sfondo**

Questo esempio fornisce dati in relazione ad un prodotto dei linfociti infiltranti il tumore (TIL) crioconservati per LN-144, generato con un metodo abbreviato adatto per la produzione commerciale a volumi elevati e che mostra attributi di qualità favorevoli per il trasferimento adottivo di cellule (ACT).

I metodi esistenti per generare prodotti clinici dei TIL implicano interventi aperti dell'operatore cui seguono estesi periodi di incubazione per generare un prodotto terapeutico. Il procedimento della generazione 1 prende approssimativamente 6 settimane e dà un prodotto fresco. Per portare la terapia con i TIL a tutti i pazienti che possono beneficiare dal suo potenziale, è stato sviluppato un metodo di coltura abbreviato di 22 giorni, la generazione 2, adatto per la produzione centralizzata con un prodotto farmaceutico crioconservato in grado di essere spedito a siti clinici distanti. La generazione 2 rappresenta un procedimento di produzione cellulare flessibile, robusto, chiuso, e semiautomatizzato che è favorevole alla produzione a volumi elevati su scala commerciale. I prodotti farmaceutici generati mediante questo metodo hanno attributi di qualità paragonabili a quelli generati mediante il procedimento della generazione 1.

#### **Obiettivi dello studio:**

I prodotti farmaceutici generati mediante i procedimenti della generazione 1 (una forma di realizzazione del procedimento 1C) e della generazione 2 (una forma di realizzazione del procedimento 2A) sono stati testati per determinare la comparabilità in termini dei seguenti attributi di qualità:

Dose ed espansione in termini di numero di volte.

Purezza dei linfociti T e rapporti tra i sottoinsiemi di linfociti T.

Espressione fenotipica di molecole costimolatorie su sottoinsiemi di linfociti T.

Lunghezza media relativa delle ripetizioni telomeriche.

Capacità di secernere citochine in risposta alla riattivazione del TCR.

Diversità dei recettori dei linfociti T.

**Panoramica del procedimento della terapia con i TIL:**

ESTRAZIONE: i TIL del paziente vengono rimossi dal microambiente tumorale soppressivo (mediante resezione chirurgica di una lesione)

ESPANSIONE: i TIL vengono espansi esponenzialmente in coltura con IL-2 a dare  $10^9 - 10^{11}$  TIL, prima della loro infusione nel paziente

PREPARAZIONE: il paziente riceve NMA-LD (linfodeplezione non mieloablativa, ciclofosfamide: 60 mg/kg, IV  $\times$  2 dosi e fludarabina: 25 mg/m<sup>2</sup>  $\times$  5 dosi) per eliminare il microambiente tumorale potenzialmente soppressivo e massimizzare l'innesto e la potenza della terapia con i TIL

INFUSIONE: al paziente vengono infusi i suoi TIL espansi (LN-144) e una breve durata di una dose elevata di IL-2 (600.000 UI/kg per fino a 6 dosi) per promuovere l'attivazione, la proliferazione, e l'attività antitumorale citolitica dei TIL

Tabella 58: Riassunto dei miglioramenti del procedimento nella produzione della generazione 2

Passaggio del procedimento	Gen 1	Gen 2	Impatto
Coltura di frammenti	$\leq 21$ giorni, bioreattori multipli, multipli interventi dell'operatore	$\leq 11$ giorni, singolo bioreattore chiuso, nessun intervento	Accorcia la coltura, riduce gli interventi, soggetta ad automazione.
Selezione dei TIL	TIL espansi con IL-2 crioconservati, testati, selezione sulla base del fenotipo, scongelati, $\leq 30 \times 10^6$ TIL in co-coltura	$\leq 200 \times 10^6$ TIL non purificati diretti alla co-coltura	Accorcia il procedimento permettendo un'aumentata semina di co-coltura, riduce i passaggi, elimina la valutazione
Espansione rapida	$\leq 36$ bioreattori, 14 giorni	$\leq 5$ bioreattori, 11 giorni	Riduce gli

			interventi dell'operatore, sistema chiuso, accorcia il procedimento, soggetta ad automazione.
Raccolta/lavaggio	Riduzione di volume e raccolta aperte e manuali. Lavaggio manuale e concentrazione mediante centrifugazione.	Riduzione di volume e raccolta chiuse e semiautomatizzate. Lavaggio e concentrazione automatizzati.	Riduce gli interventi dell'operatore, automatizzata, mantiene il sistema chiuso.
Formulazione	Prodotto ipotermico fresco (2-8°C)	Prodotto crioconservato ( $\leq 150^{\circ}\text{C}$ )	Flessibilità di spedizione, programmazione dei pazienti, valutazione del rilascio più facile, studi sperimentali globali
Tempo di produzione	Tempo del procedimento di 38 giorni	Tempo del procedimento di 22 giorni	Consegna al paziente, produttività della

			camera pulita, COG
--	--	--	-----------------------

**Metodi analitici e strumentazione:**

**Dose e vitalità:** i prodotti finali formulati sono stati campionati e saggiati per le cellule nucleate totali, le cellule vitali totali, e la vitalità determinate mediante la controcolorazione con arancio d'acridina/DAPI utilizzando il contatore di cellule automatizzato NC-200.

**Citometria a flusso:** i prodotti farmaceutici formulati sono stati campionati e saggiati per l'identità mediante FACS. La percentuale di linfociti T è stata determinata come popolazione di cellule vitali doppio positive per CD45, CD3. I flaconcini congelati satellite o sentinella per ciascun procedimento sono stati scongelati e saggiati per marcatori fenotipici estesi comprendenti CD3, CD4, CD8, CD27, e CD28.

**Lunghezza media relativa delle ripetizioni telomeriche:** la tecnologia flow-FISH è stata utilizzata per misurare la lunghezza media della ripetizione telomerica. Questo saggio è stato completato come descritto nel kit per telomeri PNA/FITC DAKO® per il protocollo di citometria a flusso. In breve,  $2 \times 10^6$  cellule TIL sono state combinate con  $2 \times 10^6$  cellule leucemiche 1301. Il DNA è stato denaturato a 82°C per 10 minuti e la sonda PNA-FITC è stata ibridata al buio per una notte a temperatura ambiente. Ioduro di propidio è stato utilizzato per identificare le cellule in fase G0/1.

**Dosaggi immunologici:** l'abilità del prodotto farmaceutico di secernere citochine a seguito della riattivazione è stata misurata in seguito alla coltura con sfere rivestite con mAb (Life Technologies, anti-CD3, anti-CD28 & anti-CD137). Dopo 24 ore, i surnatanti di coltura sono stati raccolti, congelati, scongelati, e saggiati mediante ELISA utilizzando il kit ELISA per l'IFN- $\gamma$  Quantikine (R&D Systems) secondo le istruzioni del produttore.

**Diversità dei recettori dei linfociti T:** l'RNA dai prodotti finali formulati è stato isolato e sottoposto a una PCR multiplex con inneschi specifici per VDJ. Le sequenze di CDR3 espresse all'interno del prodotto dei TIL sono state amplificate semiquantitativamente per determinare la frequenza e la prevalenza di cloni unici dei TIL. Il sequenziamento è stato eseguito sul sequenziatore da bancone Illumina MiSeq. I valori sono stati indicizzati per fornire un punteggio rappresentativo della diversità relativa dei recettori dei linfociti T nel prodotto.

**Risultati e conclusioni:**

I risultati vengono forniti nelle figure da 75 a 81.

Il procedimento della generazione 2 produce un prodotto dei TIL con attributi di qualità paragonabili a quelli della generazione 1.

La generazione 2 produce quantità simili di prodotti dei TIL altamente puri che sono costituiti da rapporti simili di sottoinsiemi di linfociti T

esprimenti livelli paragonabili di molecole costimolatorie rispetto alla Gen 1.

I TIL della generazione 2 mostrano un'umentata diversità dei recettori TCR che, quando coinvolti, iniziano una robusta secrezione di citochine.

Il prodotto farmaceutico crioconservato introduce efficienze logistiche critiche permettendo la flessibilità nella distribuzione.

Diversamente dai precedenti procedimenti, la piattaforma di espansione abbreviata a 22 giorni della generazione 2 presenta una piattaforma di produzione dei TIL aumentabile in scala e logisticamente realizzabile che permette la rapida generazione di dosi in scala clinica per pazienti con una necessità urgente di terapia.

Il protocollo di produzione dei TIL della generazione 2 affronta molte delle barriere che hanno finora ingombrato l'applicazione più ampia della terapia con i TIL.

#### **ESEMPIO 24: VALUTAZIONE DI UN INTERVALLO DI CELLULE NUTRITIVE ALLOGENICHE: RAPPORTI DEI TIL DA 100:1 A 25:1**

Questo studio ha testato la proliferazione dei TIL a 25:1 e 50:1 nei confronti del controllo di 100:1 cellule nutritive allogeneiche contro TIL attualmente utilizzato nel procedimento 1C.

Studi pubblicati dal Reparto di Chirurgia al National Cancer Institute hanno mostrato la soglia per l'attivazione ottimale dei TIL nel pallone G-Rex 100 a  $5 \times 10^6$  cellule nutritive allogeneiche per  $\text{cm}^2$  all'inizio del REP<sup>(1)</sup>. Questo è stato verificato attraverso modellazione matematica, e, con lo stesso modello, è stato previsto che con uno strato nutritivo ottimizzato per il contatto cellula:cellula per unità di area, la proporzione di cellule nutritive allogeneiche rispetto ai TIL può essere diminuita a 25:1 con effetto minimo sull'attivazione e sull'espansione dei TIL.

Questo studio ha stabilito una densità ottimale di cellule nutritive per unità di area all'inizio del REP, e ha validato l'intervallo efficace di rapporti di cellule nutritive allogeneiche all'inizio del REP richiesto per diminuire e normalizzare la quantità di cellule nutritive utilizzate per lotto clinico. Lo studio ha anche validato l'inizio del REP con meno di  $200 \times 10^6$  TIL sottoposti a coltura insieme a un numero fissato di cellule nutritive.

A. Volume di un linfocita T (10  $\mu\text{m}$  di diametro):  $V = (4/3) \pi r^3 = 523,6 \mu\text{m}^3$

B. Colonne di G-Rex 100 (M) con un'altezza di 40  $\mu\text{m}$  (4 cellule):  $V = (4/3) \pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$

C. Numero di cellule richieste per riempire la colonna B:  $4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3 / 523,6 \mu\text{m}^3 = 7,6 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \cdot 0,64 = 4,86 \times 10^8$

D. Numero di cellule che possono essere ottimamente attivate in uno spazio 4D:  $4,86 \times 10^8 / 24 = 20,25 \times 10^6$

E. Numero di cellule nutritive e TIL estrapolati al G-REX-500: TIL:  $100 \times 10^6$  e cellule nutritive:  $2,5 \times 10^9$

Equazione 1. L'approssimazione del numero di cellule mononucleate richiedeva di fornire una geometria icosaedrica per l'attivazione dei TIL in un

cilindro con una base di 100 cm<sup>2</sup>. Il calcolo deriva il risultato sperimentale di  $\sim 5 \times 10^8$  per l'attivazione soglia dei linfociti T che rispecchia strettamente i dati sperimentali dell'NCI<sup>(1)</sup>. (C) Il moltiplicatore (0,64) è la densità di impaccamento casuale per sfere equivalenti come calcolato da Jaeger e Nagel nel 1992<sup>(2)</sup>. (D) Il divisore 24 è il numero di sfere equivalenti che potrebbe venire a contatto con un oggetto simile in uno spazio a 4 dimensioni, "il numero di Newton"<sup>(3)</sup>.

## Riferimenti

<sup>(1)</sup>Jin, Jianjian, et al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. aprile 2012; 35(3): 283-292.

<sup>(2)</sup>Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. marzo 1992 20;255(5051):1523-31.

<sup>(3)</sup>O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

## ESEMPIO 25: STUDI DEGLI ATTRIBUTI DI QUALITÀ CHIAVE PER IL PRODOTTO DEI TIL

### Sfondo

La terapia adottiva con i linfociti T con linfociti infiltranti il tumore (TIL) autologhi ha efficacia clinica dimostrata in pazienti con melanoma metastatico e altri tumori<sup>1-3</sup>.

La maggior parte dei resoconti da studi clinici hanno incluso analisi preliminari dei prodotti dei TIL infusi con l'intenzione di identificare attributi di qualità quali la sterilità, l'identità, la purezza, e la potenza che potrebbero riguardare l'efficacia e/o la sicurezza del prodotto.<sup>4,5</sup>

Qui noi presentiamo la valutazione di tre parametri chiave dei prodotti dal prodotto dei TIL che possono contribuire ad una futura piattaforma di controllo di qualità per uso nella produzione commerciale dei TIL.

### Panoramica del procedimento della terapia con i TIL

1. Il tumore è stato asportato dal paziente e trasportato all'impianto di produzione secondo GMP.
2. All'arrivo, il tumore viene frammentato e posto in palloni con IL-2 per un protocollo di pre-espansione rapida (REP).
3. I TIL pre-REP sono stati ulteriormente propagati in un protocollo REP in presenza di PBMC irradiate, anticorpo anti-CD3 (30 ng/ml), ed IL-2 (3.000 UI/ml).
4. I prodotti dei TIL sono stati valutati per attributi di qualità critici comprendenti: (1) identità (2) purezza, e (3) potenza.
5. Prima dell'infusione dei TIL espansi (LN-144), il paziente ha ricevuto un regime di linfodeplezione non mieloablativa composto da ciclofosfamida e fludarabina. In seguito all'infusione dei TIL, i pazienti hanno ricevuto una breve durata (fino a 6 dosi) di IL-2 a dose elevata

(600.000 UI/kg) per supportare la crescita e l'innesto dei TIL trasferiti.

### **Obiettivi dello studio**

Scopo: caratterizzare completamente i prodotti dei TIL per identità, purezza, e potenza, e quindi (a) guidare la definizione di attributi critici di qualità e (b) supportare la costituzione di criteri di rilascio formali da mettere in pratica nella produzione commerciale dei prodotti dei TIL.

Strategia: sviluppare le seguenti metodologie analitiche per supportare la caratterizzazione dei prodotti dei TIL. In particolare, sono stati eseguiti i seguenti metodi: analisi fenotipica mediante la citometria a flusso per una valutazione dell'identità e della purezza, saggio di rilevamento delle cellule tumorali residue per una misura della purezza, e saggio di rilascio dell'interferone gamma per la valutazione della potenza.

### **Materiali & metodi**

#### **Identità e purezza**

Caratterizzazione fenotipica: i prodotti dei TIL sono stati colorati con anticorpi anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR-7, anti-CD62L, anti-CD19, anti-CD16, ed anti-CD56 e analizzati mediante la citometria a flusso per la quantificazione dei sottoinsiemi di linfociti T e non T.

#### **Purezza**

Saggio di rilevamento del tumore residuo: prodotti dei TIL sono stati colorati con anticorpi anti-MCSP (proteoglicano condroitinsolfato associato al melanoma) ed anti-CD45, così come con il colorante fissabile Aqua LIVE/DEAD, quindi analizzati mediante la citometria a flusso per il rilevamento delle cellule di melanoma. I controlli iniettati sono stati utilizzati per verificare l'accuratezza del rilevamento del tumore e stabilire i criteri di contrasto per l'analisi dei dati.

#### **Potenza**

Saggio di rilascio dell'IFN- $\gamma$ : i prodotti dei TIL sono stati ristimolati con sfere rivestite con anti-CD3/CD28/CD137 per da 18 a 24 ore, dopodiché i surnatanti sono stati raccolti per la valutazione della secrezione dell'IFN- $\gamma$  utilizzando un saggio ELISA.

### **Risultati**

Identità: la maggioranza (>99%) del prodotto dei TIL con melanoma era costituita da cellule CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>.

Le figure 86A-86C forniscono una caratterizzazione fenotipica dei prodotti dei TIL utilizzando un saggio di citometria a flusso a 10 colori. (A) La percentuale dei sottoinsiemi di linfociti T e linfociti non T era definita da CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> e CD45<sup>-</sup> (non linfociti)/CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (linfocita non linfocita T), rispettivamente. Complessivamente, >99% dei prodotti dei TIL testati consisteva di linfociti T (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>). Viene mostrata una media dei

prodotti dei TIL (n=10). (B) Percentuale di due sottoinsiemi di linfociti T comprendenti CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (cerchio blu aperto) e CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (cerchio rosa aperto). Nessuna differenza statistica nella percentuale di entrambi i sottoinsiemi è stata osservata utilizzando il test t di Student non accoppiato (P=0,68). (C) La popolazione di linfociti non T è stata caratterizzata per quattro sottoinsiemi differenti comprendenti: 1) non linfociti (CD45<sup>-</sup>), 2) linfociti NK (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+/56</sup><sup>+</sup>), 3) linfociti B (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), e 4) linfociti non NK/B (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>).

Identità: la maggioranza di prodotto dei TIL con melanoma mostrava un fenotipo dei linfociti T effettori o della memoria, associato alla funzione citotossica dei linfociti T.

Le figure 87A e 87B mostrano la caratterizzazione di sottoinsiemi di linfociti T in popolazioni cellulari CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. I sottoinsiemi di linfociti T vergini, della memoria centrale (TCM), della memoria effettrice (TEF), e della memoria effettrice RA<sup>+</sup> (EMRA) sono stati definiti utilizzando CD45RA e CCR-7. Le figure 87A e 87B mostrano sottoinsiemi rappresentativi di linfociti T da 10 prodotti finali dei TIL in entrambe le popolazioni cellulari CD4<sup>+</sup> (A), e CD8<sup>+</sup> (B). Il sottoinsieme di linfociti T della memoria effettrice (cerchio blu aperto) era una popolazione importante (>93%) in entrambi i sottoinsiemi CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> del prodotto finale dei TIL. Meno del 7% delle cellule dei prodotti dei TIL erano del sottoinsieme della memoria centrale (cerchio rosa aperto). I sottoinsiemi EMRA (cerchio grigio aperto) e vergini (cerchio nero aperto) sono stati appena rilevati nel prodotto dei TIL (<0,02%). I valori di p rappresentano la differenza tra EM e CM utilizzando il test t di Student non accoppiato.

Purezza: MCSP rappresenta un appropriato marcatore del tumore melanoma per il saggio di purezza.

Le figure 88A e 88B mostrano il rilevamento dell'espressione di MCSP e EpCAM in cellule tumorali di melanoma. Le linee cellulari tumorali di melanoma (WM35, 526, e 888), le linee cellulari di melanoma derivate da pazienti sono state generate secondo i metodi descritti qui (1028, 1032, e 1041), e una linea cellulare di adenocarcinoma coloretale (HT29 come controllo negativo) è stata caratterizzata mediante la colorazione per i marcatori MCSP (proteoglicano condroitinsolfato associato al melanoma) e EpCAM (molecola di adesione delle cellule epiteliali). (A) Una media del 90% delle cellule tumorali di melanoma esprimeva MCSP. (B) L'espressione di EpCAM non è stata rilevata nelle linee cellulari tumorali di melanoma in confronto al controllo positivo HT29, una linea cellulare tumorale EpCAM<sup>+</sup>.

Purezza: Sviluppo di un saggio basato su citometria a flusso per il rilevamento di cellule tumorali residue nei prodotti dei TIL.

Le figure 89A e 89B illustrano il rilevamento di controlli iniettati per la determinazione dell'accuratezza del rilevamento del tumore. Il saggio è stato eseguito iniettando quantità note di cellule tumorali nelle sospensioni di PBMC (n=10). 526 cellule tumorali di melanoma MCSP<sup>+</sup> sono state diluite in rapporti di 1:10, 1:100, e 1:1,000, quindi miscelate con PBMC e colorate con anticorpi anti-MCSP ed anti-CD45 e con un colorante per la

vitalità e analizzate mediante la citometria a flusso. (A) Approssimativamente 3.000, 300, e 30 cellule sono state rilevate nella diluizione di 1:10, 1:100, e 1:1.000, rispettivamente. (B) Una media (AV) e una deviazione standard (DS) delle cellule ottenute in ciascuna condizione sono state utilizzate per definire i limiti di riferimento superiore e inferiore.

Purezza: Qualificazione del saggio di rilevamento del tumore residuo utilizzando controlli iniettati.

Le figure 90A e 90B mostrano lo studio di ripetibilità dei limiti superiore e inferiore in controlli iniettati. Tre esperimenti indipendenti sono stati eseguiti in triplice copia per determinare la ripetibilità del saggio di iniezione. (A) Il numero di cellule tumorali MCSP<sup>+</sup> rilevate era costantemente all'interno dell'intervallo dei limiti di riferimento superiore e inferiore. (B) Il grafico di regressione lineare dimostra la correlazione tra cellule MCSP<sup>+</sup> e diluizioni di iniezione ( $R^2=0,99$ ) con la linea nera continua che mostra l'adattamento migliore. Le linee tratteggiate verde e grigia rappresentano i limiti di predizione al 95% nella curva e nei campioni standard (numero dell'esperimento da 1 a 3), rispettivamente.

Purezza: I contaminanti di cellule di tumore melanoma erano sotto il limite di rilevamento del saggio nel prodotto finale dei TIL.

Le figure 91A e 91B mostrano il rilevamento del tumore melanoma residuo nei prodotti dei TIL. I prodotti dei TIL sono stati valutati per la contaminazione tumorale residua utilizzando il saggio sviluppato (n=15). Il numero mediano e la percentuale di eventi MCSP<sup>+</sup> rilevabili erano 2 e 0,0002%, rispettivamente.

Potenza: La secrezione dell'IFN- $\gamma$  da parte dei TIL (costantemente >1.000 pg/ml) ha dimostrato la funzione effettrice del prodotto dei TIL.

La figura 92 mostra la valutazione della potenza dei prodotti dei TIL a seguito dell'attivazione delle cellule T. La secrezione dell'IFN- $\gamma$  dopo la ristimolazione con anti-CD3/CD28/CD137 nei prodotti dei TIL è stata valutata mediante ELISA in duplice copia (n=5). La secrezione dell'IFN- $\gamma$  da parte dei prodotti dei TIL era significativamente maggiore dei controlli non stimolati utilizzando il test di Wilcoxon del rango segnato ( $P=0,02$ ), e costantemente >1.000 pg/ml. La secrezione dell'IFN- $\gamma$  >200 pg/ml è stata considerata essere potente. Il valore di  $P < 0,05$  è considerato statisticamente significativo.

## Conclusione

Sono stati valutati i parametri chiave dei prodotti di identità, purezza, e potenza dei prodotti dei TIL. I prodotti dei TIL prodotti secondo i metodi descritti qui consistevano di più del 99% di linfociti T CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>. La maggioranza dei sottoinsiemi di TIL CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ha mostrato un fenotipo della memoria effettrice, associato alla funzione citotossica dei linfociti T. Un saggio basato su citometria a flusso per rilevare cellule tumorali di melanoma contaminanti nel prodotto finale dei TIL è stato sviluppato e qualificato con successo. Applicando questo saggio, è stato mostrato che le cellule tumorali di melanoma contaminanti nel prodotto finale dei TIL sono sotto il limite di rilevamento del saggio. La secrezione dell'IFN- $\gamma$  da

parte del prodotto finale dei TIL in seguito alla ristimolazione con anti-CD3/CD28/CD137 può servire come saggio d'efficacia per il prodotto TIL in commercio. Questi dati forniscono il fondamento di una piattaforma di controllo di qualità che supporterà lo sviluppo ulteriore di attributi critici di qualità per la produzione commerciale dei prodotti dei TIL.

## **ESEMPIO 26: UN PRODOTTO DEI TIL CRIOCONSERVATI GENERATO CON UN METODO ABBREVIATO ADATTO PER LA PRODUZIONE COMMERCIALE A VOLUMI ELEVATI MOSTRA ATTRIBUTI DI QUALITÀ FAVOREVOLI PER IL TRASFERIMENTO ADOTTIVO DI CELLULE**

### **Sfondo**

I metodi classici per generare linfociti infiltranti il tumore (TIL) per il trasferimento adottivo di cellule (ACT) implicano multipli passaggi di incubazione ex vivo per fornire un prodotto di infusione fresco (non crioconservato).

Il procedimento della prima generazione (Gen 1) ha prodotto una dose dei TIL freschi in approssimativamente 6 settimane. Un procedimento di produzione dei TIL della seconda generazione (Gen 2) che abbrevia la durata della coltura ex vivo a 22 giorni è stato sviluppato (figura 93).

Il procedimento della Gen 2 è adatto per la produzione centralizzata e dà un prodotto di infusione dei TIL crioconservati che porta convenienza nella programmazione, nella logistica, e nel rilascio ai siti clinici. Il prodotto di infusione dei TIL crioconservati per gli LN-144 prodotti dal procedimento della Gen 2 ha attributi di qualità paragonabili al prodotto di infusione dei TIL non crioconservati per i TIL generati mediante il metodo della Gen 1. Il metodo di produzione dei TIL della Gen 2 rappresenta un procedimento di produzione cellulare flessibile, robusto, chiuso, e semiautomatizzato che è favorevole alla produzione dei TIL a volumi elevati su scala commerciale.

### **Obiettivo dello studio**

I prodotti di infusione dei TIL generati mediante i procedimenti di produzione della Gen 1 e della Gen 2 sono stati valutati per determinare la comparabilità in termini dei seguenti attributi di qualità: (1) conta delle cellule (dose), vitalità, velocità di crescita della fase REP, (2) purezza dei linfociti T ed espressione fenotipica di molecole costimolatorie su sottoinsiemi di linfociti T, (3) lunghezza media relativa delle ripetizioni telomeriche, (4) capacità di secernere IFN- $\gamma$  in risposta al coinvolgimento di CD3, CD28, CD137, e (5) diversità dei recettori dei linfociti T presenti nel prodotto di infusione finale (figura 94).

### **Metodi analitici & strumentazione**

Conta cellulare e vitalità: i prodotti di infusione formulati finali sono stati campionati e saggiati per le cellule nucleate totali, le cellule vitali totali, e la vitalità determinate mediante la controcolorazione con arancio d'acridina/DAPI utilizzando il contatore di cellule automatizzato NC-200. I lotti di

sviluppo del procedimento sono stati testati sul contatore della vitalità cellulare Nexcellom Cellometer K2 utilizzando una doppia colorazione fluorescente con arancio d'acridina/ioduro di propidio.

Marcatori fenotipici: i prodotti di infusione formulati sono stati campionati e saggiati per l'identità mediante la colorazione immunofluorescente. La percentuale di linfociti T è stata determinata come popolazione di cellule vitali CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> (doppio positiva). I flaconcini congelati satellite o sentinella per ciascun procedimento sono stati scongelati e saggiati per marcatori fenotipici estesi comprendenti CD3, CD4, CD8, CD27, e CD28. I prodotti di infusione freschi sono stati ottenuti sul BD FACS Canto II, ed i marcatori fenotipici estesi sui prodotti di infusione scongelati sono stati ottenuti sull'analizzatore cellulare Bio-Rad ZE5.

Lunghezza media relativa delle ripetizioni telomeriche: la tecnologia flow-FISH è stata utilizzata per misurare la lunghezza media della ripetizione telomericca. Questo saggio è stato completato come descritto nel kit per telomeri PNA/FITC DAKO® per il protocollo di citometria a flusso. In breve,  $2,0 \times 10^6$  cellule TIL sono state combinate con  $2,0 \times 10^6$  linfociti T leucemici della linea cellulare umana (1301). Il DNA è stato denaturato a 82°C per 10 minuti e la sonda PNA-FITC è stata ibridata al buio per una notte a temperatura ambiente. Ioduro di propidio è stato utilizzato per identificare le cellule in fase G0/1.

Funzione immunitaria: l'abilità del prodotto di infusione di secernere IFN- $\gamma$  a seguito della riattivazione è stata misurata in seguito alla co-coltura con sfere anticorpali rivestite (Life Technologies, anti-CD3, anti-CD28 & anti-CD137). Dopo 24 ore, i surnatanti di coltura sono stati raccolti, congelati, scongelati, e saggiati mediante ELISA utilizzando il kit ELISA per l'IFN- $\gamma$  Quantikine (R&D Systems) secondo le istruzioni del produttore.

Diversità dei recettori dei linfociti T: il RNA dai prodotti di infusione è stato isolato e sottoposto a una PCR multiplex con inneschi specifici per VDJ. Le sequenze di CDR3 espresse all'interno del prodotto dei TIL sono state amplificate semiquantitativamente e sequenziate profondamente per determinare la frequenza e la prevalenza di cloni unici dei TIL. Il sequenziamento è stato eseguito sul sequenziatore da bancone Illumina MiSeq. I valori sono stati indicizzati per fornire un punteggio rappresentativo della diversità relativa dei recettori dei linfociti T nel prodotto.

## **Risultati**

Al giorno 22, il prodotto cellulare ridotto nel volume è stato raggruppato e campionato per determinare la prestazione della coltura prima del lavaggio e della formulazione. Le figure 95A-95C mostrano le cellule vitali totali, la velocità di crescita, e la vitalità. (A) I campioni sono stati analizzati sul contatore di cellule automatizzato NC-200 come descritto precedentemente. La densità totale delle cellule vitali viene determinata dalla media totale di conte duplicate da 4 campioni indipendenti. Il procedimento della Gen 2 ha dato un prodotto dei TIL di una dose simile a

quella della Gen 1 (media della Gen 1 =  $4,10 \times 10^{10} \pm 2,8 \times 10^{10}$ , media della Gen 2 =  $4,12 \times 10^{10} \pm 2,5 \times 10^{10}$ ). (B) La velocità di crescita è stata calcolata per la fase REP come. (C) La vitalità cellulare è stata valutata da 9 lotti di sviluppo del procedimento utilizzando il Cellometer K2 come descritto precedentemente. Nessuna riduzione significativa nella vitalità cellulare è stata osservata in seguito ad un singolo ciclo di congelamento/scongelo del prodotto formulato. La riduzione media della vitalità a seguito dello scongelamento e del campionamento era del 2,19%.

Le figure 96A-96C mostrano che i prodotti della Gen 2 sono colture altamente pure di linfociti T che esprimono molecole costimolatorie a livelli paragonabili a quelli della Gen 1 (figura 96A). I prodotti farmaceutici formulati di fresco sono stati testati per l'identità mediante la citometria a flusso per il rilascio. I procedimenti della Gen 1 e della Gen 2 producono colture di linfociti T a purezza elevata come definito dal fenotipo CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> (doppio positivo) (figure 96B e 96C). I flaconcini satellite crioconservati di prodotto farmaceutico formulato sono stati scongelati e saggiati per il fenotipo esteso mediante la citometria a flusso come descritto precedentemente. I prodotti della Gen 1 e della Gen 2 esprimevano livelli simili di molecole costimolatorie CD27 e CD28 sui sottoinsiemi di linfociti T. Molecole costimolatorie quali CD27 e CD28 possono essere richieste per fornire la trasduzione del segnale secondaria e terziaria necessaria per la proliferazione delle cellule effettrici a seguito del coinvolgimento dei recettori dei linfociti. Il valore di P è stato calcolato utilizzando il test "t" di Mann-Whitney.

La figura 97 mostra che i prodotti della Gen 2 tendono verso lunghezze relative dei telomeri più lunghe. La tecnologia flow-FISH è stata utilizzata per misurare la lunghezza media della ripetizione telomerica come descritto precedentemente. Il valore RTL ha indicato che la fluorescenza media dei telomeri per cromosoma/genoma nella Gen 1 era il  $7,5\% \pm 2,1\%$ , e nella Gen 2 era  $18,4\% \pm 1,8\%$  della fluorescenza dei telomeri per cromosoma/genoma nelle cellule della linea di controllo (linea di cellule leucemiche 1301). I dati indicano che i prodotti della Gen 2 hanno mediamente lunghezze dei telomeri paragonabili a quelle dei prodotti della Gen 1. La lunghezza dei telomeri è una misura surrogata della lunghezza della coltura cellulare ex vivo.

La figura 98 mostra che i prodotti farmaceutici della Gen 2 secernono IFN- $\gamma$  in risposta al reclutamento di CD3, CD28, e CD137. I prodotti farmaceutici crioconservati sono stati scongelati e incubati con le sfere rivestite con anticorpi come descritto precedentemente. I dati vengono espressi come quantità di IFN- $\gamma$  prodotta da  $5 \times 10^5$  cellule vitali in 24 ore. I prodotti farmaceutici della Gen 2 hanno mostrato una capacità aumentata di produrre IFN- $\gamma$  a seguito della riattivazione rispetto ai prodotti farmaceutici della Gen 1. L'abilità del prodotto farmaceutico di essere riattivato e secernere citochine è una misura surrogata della funzione in vivo a seguito del legame del TCR ad un antigene affine nel contesto dell'HLA.

Le figure 99A e 99B mostrano che i prodotti farmaceutici della Gen 2 hanno un' aumentata diversità di recettori dei linfociti T unici. La diversità dei recettori dei linfociti T è stata valutata come segue. L'RNA da  $10 \times 10^6$  TIL dai prodotti di infusione della Gen 1 e della Gen 2 è stato saggiato per determinare il numero e la frequenza totali di sequenze di CDR3 uniche presenti in ciascun prodotto. (figura 99A) Le sequenze di CDR3 uniche sono state indicizzate rispetto alla frequenza in ciascun prodotto per fornire un punteggio rappresentativo della diversità complessiva dei recettori dei linfociti T nel prodotto. (figura 99B) Numero medio totale di sequenze di CDR3 uniche presenti in ciascun prodotto di infusione. I prodotti dei TIL da entrambi i procedimenti erano costituiti da popolazioni policlonali di linfociti T con specificità e avidità differenti per un antigene. L'ampiezza del repertorio totale di linfociti T può essere indicativa del numero di epitopi perseguibili presentati sulle cellule tumorali.

### **Conclusioni**

Il procedimento di produzione della Gen 2 ha prodotto un prodotto di infusione dei TIL (LN-144) con attributi di qualità paragonabili a quelli della Gen 1. La Gen 2 ha prodotto dosi simili di TIL altamente puri. I sottoinsiemi di linfociti T erano in rapporti simili ed esprimevano molecole costimolatorie a livelli paragonabili rispetto alla Gen 1. I TIL della Gen 2 tendevano verso una lunghezza relativa dei telomeri più lunga commisurata ad un ridotto periodo di coltura ex vivo. I TIL della Gen 2 hanno mostrato un' aumentata diversità dei recettori TCR che, quando coinvolti, hanno iniziato una robusta secrezione di IFN- $\gamma$ , una misura della funzione effettrice citolitica. Così, il procedimento di espansione chiuso abbreviato a 22 giorni della Gen 2 con il prodotto di infusione crioconservato presenta una piattaforma di produzione dei TIL aumentabile in scala e logisticamente realizzabile che permette la rapida generazione di dosi in scala clinica per pazienti oncologici in immediato bisogno di una nuova opzione di terapia.

### **Riferimenti**

<sup>1</sup>Dudley, M. E. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 2346-2357, doi:10.1200/JCO.2005.00.240 (2005).

<sup>2</sup>Chandran, S. S. et al. Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes: a single-center, two-stage, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* doi:10.1016/S1470-2045(17)30251-6 (2017).

<sup>3</sup>Stevanovic, S. et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J. Clin. Oncol.* 33, doi:10.1200/jco.2014.58.9093 (2015).

<sup>4</sup>Revisori e sponsor dell'FDA: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), CFR 21 610,3(r), 2008.

5 Richards JO, Treisman J, Garlie N, Hanson JP, Oaks MK. Flow cytometry assessment of residual melanoma cells in tumor-infiltrating lymphocyte cultures. *Cytometry A* 2012; 81:374-81.

## **ESEMPIO 27: IL COCKTAIL PER LINFOCITI T DEI FATTORI DI CRESCITA IL-2/IL-15/IL-21 HA AUMENTATO L'ESPANSIONE E LA FUNZIONE EFFETTRICE DI LINFOCITI T INFILTRANTI IL TUMORE IN UN NUOVO PROCEDIMENTO DESCRITTO QUI**

### **Sfondo**

La terapia adottiva con i linfociti T con TIL autologhi ha efficacia clinica dimostrata in pazienti con melanoma metastatico e carcinoma del collo dell'utero. In alcuni studi, gli esiti clinici migliori hanno correlato positivamente con il numero totale di cellule infuse e/o la percentuale di linfociti T CD8<sup>+</sup>. I regimi di produzione più attuali utilizzano unicamente IL-2 per promuovere la crescita dei TIL. Un'aumentata espansione dei linfociti è stata riportata utilizzando regimi contenenti IL-15 ed IL-21. Questo studio descrive gli effetti positivi e le sinergie dell'aggiunta di IL-15 ed IL-21 alle forme di realizzazione del procedimento 2A e ai procedimenti di produzione dei TIL della generazione 2.

### **Generazione dei TIL utilizzando un nuovo procedimento descritto qui**

Il tumore viene asportato dal paziente e trasportato all'impianto di produzione secondo GMP o ad un laboratorio per gli scopi di ricerca. All'arrivo, il tumore è stato frammentato, e posto in palloni con IL-2 per il protocollo di pre-espansione rapida (pre-REP) per 11 giorni. Per gli studi con triplo cocktail, IL-2, IL-15, ed IL-21 (IL-2/IL-15/IL-21) sono state aggiunte all'inizio del pre-REP. Per il protocollo di espansione rapida (REP), i TIL sono stati sottoposti a coltura con cellule nutritive e anticorpo anti-CD3 per ulteriori 11 giorni (figura 100).

### **Materiali e metodi**

Il procedimento per generare TIL includeva un protocollo di pre-espansione rapida (pre-REP), in cui frammenti tumorali di 1-3 mm<sup>3</sup> di dimensione sono stati posti in mezzi contenenti IL-2. Durante il pre-REP, i TIL hanno migrato fuori dai frammenti tumorali e si sono espansi in risposta alla stimolazione con IL-2.

Per stimolare ulteriormente la crescita dei TIL, i TIL sono stati espansi attraverso un periodo di coltura secondario chiamato protocollo di espansione rapida (REP) che includeva cellule nutritive PBMC irradiate, IL-2 e anticorpo anti-CD3. Un protocollo accorciato di espansione pre-REP e REP è stato sviluppato per espandere i TIL mentre si mantengono gli attributi fenotipici e funzionali del prodotto finale dei TIL. Questo protocollo accorciato di generazione dei TIL è stato utilizzato per verificare l'impatto di IL-2 da sola contro una combinazione di IL2/IL-15/IL-21 aggiunta al passaggio pre-REP. Questi due regimi di coltura sono stati confrontati per la generazione dei TIL cresciuti da tumori colorettali, melanomi, cervicali, tripli negativi della mammella, polmonari e renali. Al completamento del pre-REP, i TIL sottoposti a coltura sono stati valutati

per l'espansione, il fenotipo, la funzione (CD107a<sup>+</sup> e IFN $\gamma$ ) e il repertorio del TCR V $\beta$ .

Lo studio mostra il potenziamento dell'espansione durante il pre-REP con IL-2/IL-15/IL-21 in istologie tumorali multiple. Le colture pre-REP sono state iniziate utilizzando il protocollo standard con IL-2 (6.000 UI/ml), o con IL-15 (180 UI/ml) ed IL-21 (1 UI/ml) oltre a IL-2 (figura 101). Le cellule sono state valutate per l'espansione al completamento del pre-REP. Una coltura è stata classificata come avente un'aumentata espansione rispetto all'IL-2 se la crescita complessiva era aumentata di almeno il 20%. Gli studi fenotipici e funzionali di melanoma e polmone vengono discussi ulteriormente nel paragrafo seguente (nel testo in grassetto nella figura 101).

IL-2/IL-15/IL-21 ha aumentato la percentuale di cellule CD8<sup>+</sup> nel carcinoma polmonare, ma non nel melanoma. Nelle figure 102A e 102B, i TIL derivati da (A) melanoma (n=4), e (B) polmone (n=7) sono stati valutati fenotipicamente per le cellule CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> utilizzando la citometria a flusso dopo il pre-REP. Il valore di P rappresenta la differenza tra le condizioni con IL-2 e IL-12/IL-15/IL-21 utilizzando il test t di Student non appaiato.

L'espressione di CD27 era leggermente aumentata nelle cellule CD8<sup>+</sup> nelle colture trattate con IL-2/IL-15/IL-21. Nelle figure 103A e 103B, i TIL derivati da (A) melanoma (n=4), e (B) polmone (n=7) sono stati valutati fenotipicamente per CD27<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup> nelle cellule CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> utilizzando la citometria a flusso dopo il pre-REP. L'espressione di CD27, un marcatore cellulare associato ad un fenotipo più giovane che ha correlato con i risultati per la terapia adottiva con i linfociti T, era leggermente aumentata nei TIL CD8<sup>+</sup> derivati dalla coltura con IL-2/IL-15/IL-21 contro IL-2 da sola.

I sottoinsiemi di linfociti T erano inalterati con l'aggiunta di IL-15/IL-21. Nelle figure 104A e 104B, i TIL sono stati valutati fenotipicamente per i sottoinsiemi effettori/della memoria (CD45RA e CCR-7) nelle cellule CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> (dati non mostrati) da (A) melanoma (n=4), e (B) polmone (n=8) mediante citometria a flusso dopo il pre-REP. TEM = memoria effettrice (CD45RA<sup>-</sup>, CCR-7<sup>-</sup>), TCM = memoria centrale (CD45RA<sup>-</sup>, CCR-7<sup>+</sup>), TSCM = cellule staminali della memoria (CD45RA<sup>+</sup>, CCR-7<sup>+</sup>), TEMRA = linfociti T effettori (CD45RA<sup>+</sup>CCR-7<sup>-</sup>).

La capacità funzionale dei TIL è stata aumentata in modo differenziale con IL-2/IL-15/IL-21. Nelle figure 105A e 105B, i TIL derivati da (A) melanoma (n=4) e (B) polmone (n=5) sono stati valutati per l'espressione CD107a<sup>+</sup> in risposta alla stimolazione con PMA per 4 ore nelle cellule CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, mediante la citometria a flusso. (C) I TIL pre-REP derivati da melanoma e polmone sono stati stimolati per 24 ore con l'anticorpo anti-CD3 solubile e i surnatanti sono stati valutati per l'IFN- $\gamma$  mediante ELISA.

La frequenza relativa del repertorio TCRv $\beta$  è stata alterata in risposta a IL-2/IL-15/IL-21 in polmone, ma non nel melanoma. Nelle figure 106A e 106B, il repertorio TCRv $\beta$  (24 specificità) è stato valutato nei TIL derivati da un (A) melanoma e un (B) tumore al polmone utilizzando il kit

Beckman Coulter per la citometria a flusso.

### **Riassunto**

Questo lavoro dimostra la capacità del cocktail di IL-2/IL-15/IL-21 di aumentare i numeri dei TIL in confronto a IL-2 da sola (>20%) nel procedimento della generazione 2, oltre ad avere un impatto sulle caratteristiche fenotipiche e funzionali.

L'effetto del triplo cocktail sull'espansione dei TIL era dipendente dall'istologia. Il rapporto fra i linfociti T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> è stato aumentato con l'aggiunta di IL-2/IL-15/IL-21 nei tumori polmonari. L'aggiunta di IL-15 ed IL-21 ha aumentato l'espressione di CD107a e la produzione di IFN- $\gamma$  nei TIL derivati da tumori polmonari. L'aggiunta di IL-2/IL-15/IL-21 ha alterato il repertorio TCR $\nu\beta$  nel polmone. Il procedimento di espansione dei TIL della generazione 2 è stato utilizzato per includere il cocktail di citochine IL-2/IL-15/IL-21, fornendo quindi un mezzo per promuovere ulteriormente l'espansione dei TIL in istologie tumorali specifiche, quali tumori polmonari e colorettali. Queste osservazioni sono specialmente pertinenti all'ottimizzazione e alla standardizzazione dei regimi di coltura dei TIL necessarie per la produzione dei TIL su larga scala con l'ampia applicabilità e disponibilità richiesta per una terapia antitumorale dominante.

### **ESEMPIO 28: I NUOVI LINFOCITI INFILTRANTI IL TUMORE CRIOCONSERVATI (LN-144) SOMMINISTRATI A PAZIENTI CON MELANOMA METASTATICO HANNO DIMOSTRATO EFFICACIA E TOLLERABILITÀ IN UNO STUDIO CLINICO MULTICENTRICO DI FASE 2**

#### **Sfondo**

La sicurezza e l'efficacia della terapia cellulare adottiva (ACT) che utilizza linfociti infiltranti il tumore (TIL) sono state studiate in centinaia di pazienti con melanoma metastatico, e hanno dimostrato tassi di risposta obiettiva (ORR) significativi e duraturi<sup>1</sup>. In uno studio di fase 2 in atto, C-144-01, che utilizza la produzione centralizzata in GMP dei TIL, sono stati valutati entrambi i procedimenti di produzione dei TIL non crioconservati della generazione 1 (Gen 1) e crioconservati della generazione 2 (Gen 2).

La Gen 1 ha una durata di produzione di approssimativamente 5-6 settimane (somministrata nella coorte 1 dello studio C-144-01), mentre la Gen 2 ha una durata di produzione di 22 giorni (procedimento 2A, somministrata nella coorte 2 dello studio C-144-01). I dati preliminari dai pazienti della coorte 1, a cui è stato infuso il prodotto preparato con gli LN-144 della Gen 1, sono stati incoraggianti nel trattamento di pazienti con melanoma metastatico post-PD-1 dal momento che la terapia con i TIL ha prodotto risposte.<sup>2</sup> I vantaggi della Gen 2 includevano: (A) la riduzione nel tempo che pazienti e medici aspettano per infondere i TIL al paziente; (B) la crioconservazione permette flessibilità nella programmazione, nella distribuzione, e nel rilascio; e (C) la riduzione dei costi di produzione. I dati preliminari dalla coorte 2 sono presentati qui. La figura 107 mostra una

forma di realizzazione del procedimento di produzione degli LN-144 crioconservati della Gen 2 (procedimento 2A).

### **Progettazione dello studio: studio C-144-01 di fase 2 nel melanoma metastatico**

Studio di fase 2 a 3 coorti multicentrico per verificare l'efficacia e la sicurezza di linfociti autologhi infiltranti il tumore (LN-144) per il trattamento di pazienti con melanoma metastatico.

Criteri di inclusione essenziali: (1) melanoma metastatico misurabile e  $\geq 1$  lesione resecabile per la generazione dei TIL; (2) progressione su almeno una linea precedente di terapia sistemica; (3) età  $\geq 18$ ; e (4) ECOG PS 0-1.

Coorti di trattamento: (1) prodotto degli LN-144 non crioconservati; (2) prodotto degli LN-144 crioconservati; e (3) nuovo trattamento con LN-144 per pazienti senza risposta o che progrediscono dopo una risposta iniziale. La figura 108 mostra la progettazione dello studio.

Obiettivi: (1) primario: efficacia definita come ORR e (2) secondario: sicurezza ed efficacia.

### **Metodi**

Pacchetto di sicurezza della coorte 2: 13 pazienti che sono stati sottoposti a resezione allo scopo della generazione dei TIL e hanno ricevuto qualsiasi componente del trattamento in studio.

Pacchetto di efficacia della coorte 2: 9 pazienti che hanno ricevuto il preconditionamento di NMA-LD, l'infusione degli LN-144 e almeno una dose di IL-2, ed hanno avuto almeno una valutazione dell'efficacia. 4 pazienti non avevano una valutazione dell'efficacia al tempo della suddivisione dei dati.

I dati sui biomarcatori sono stati mostrati per tutte le letture dei dati disponibili alla data della suddivisione dei dati.

### **Risultati**

La figura 109 fornisce una tabella che illustra le caratteristiche di confronto dei pazienti dalla coorte 1 (ASCO 2017) rispetto a quelli della coorte 2.

La coorte 2 ha: una media di 4 terapie precedenti; tutti i pazienti hanno ricevuto precedenti anti-PD-1 ed anti-CTLA-4; ed avevano una massa tumorale superiore riflessa da una maggiore somma dei diametri (SOD) per le lesioni bersaglio e una superiore LDH media nelle condizioni di base.

La figura 110 fornisce una tabella che mostra gli eventi avversi emersi durante il trattamento ( $\geq 30\%$ ).

Per la coorte 2 (LN-144 crioconservati), le caratteristiche del prodotto di infusione e della terapia con i TIL erano (1) numero medio di cellule TIL infuse:  $37 \times 10^9$ , e (2) il numero mediano di somministrazioni di dosi di IL-2 era 4,5. La figura 111 mostra l'efficacia del prodotto di infusione e della terapia con TIL per i pazienti da #1 a #8.

La figura 112 mostra lo stato clinico di pazienti valutabili per la risposta con malattia stabile (SD) o una risposta migliore. Una risposta parziale

(PR) per il paziente 6 non è stata confermata in quanto il paziente non ha ancora raggiunto la seconda valutazione dell'efficacia. Un paziente (paziente 9) è deceduto prima della prima valutazione (considerato ancora nel gruppo per l'efficacia).

Dei 9 pazienti nel gruppo per l'efficacia, un paziente (paziente 9) non era valutabile (NE) a causa di morte correlata a melanoma prima della prima valutazione del tumore non rappresentata nella figura 112. Le risposte sono state osservate in pazienti trattati con la Gen 2. Il tasso di controllo di malattia (DCR) era del 78%. Il tempo alla risposta era simile a quello della coorte 1. Un paziente (paziente 3) con malattia progressiva (PD) come risposta migliore non è stato incluso nel grafico a corsie.

La figura 113 mostra la variazione percentuale nella somma dei diametri. Il paziente 9 non ha avuto la valutazione della malattia post-LN-144 a causa di morte correlata a melanoma prima del giorno 42. Giorno -14: variazione % della somma di diametri dalla valutazione al livello basale (giorno -14). Dal giorno -14 al giorno 126: variazione % della SOD dal livello basale. Giorno -14 = livello basale. Giorno 0 = infusione degli LN-144.

A seguito del trattamento con i TIL, è stato osservato un aumento di HMGB1 (figura 114). I livelli plasmatici di HMGB1 sono stati misurati utilizzando il kit ELISA per HMGB1 (Tecan US, Inc). I dati mostrati rappresentano la variazione in termini di numero di volte nei livelli di HMGB1 prima (giorno -7) e dopo (giorno 4 e giorno 14) l'infusione degli LN-144 nei pazienti della coorte 1 e della coorte 2 (i valori di p sono stati calcolati utilizzando il test di t a due code appaiato sulla base dei dati trasformati in logaritmi). La dimensione del campione (in grassetto e in corsivo) e i valori medi (in corsivo) vengono mostrati tra parentesi per ciascun punto temporale. HMGB1 viene secreta dalle cellule immunitarie attivate e rilasciata dalle cellule tumorali danneggiate. Gli aumentati livelli di HMGB1 osservati dopo il trattamento con LN-144 suggeriscono quindi un meccanismo mediato dal sistema immunitario di attività antitumorale.

I livelli plasmatici di IP-10 sono stati misurati utilizzando un saggio Luminex. I dati mostrati nella figura 115 rappresentano la variazione in termini di numero di volte nei livelli di IP-10 prima (giorno -7) e dopo (giorno 4 e giorno 14) l'infusione degli LN-144 nei pazienti della coorte 1 e della coorte 2 (i valori di p sono stati calcolati utilizzando il test di t a due code appaiato sulla base dei dati trasformati in logaritmi). La dimensione del campione (in grassetto e in corsivo) e i valori medi (in corsivo) vengono mostrati tra parentesi per ciascun punto temporale. L'incremento nell'IP-10 dopo l'infusione di LN-144 viene monitorato per comprendere la possibile correlazione con persistenza dei TIL.

I dati aggiornati dalla coorte 2 (n=17 pazienti) vengono riportati nelle figure da 116 a 121. In confronto alla coorte 1 e a una forma di realizzazione del procedimento della Gen 1, che hanno mostrato un DCR del 64% e un tasso di risposta complessivo (ORR) del 29% (n=14), la coorte 2 e una forma di realizzazione del procedimento della Gen 2 hanno mostrato un DCR dell'80% e un ORR del 40% (n=10).

## Conclusioni

I risultati preliminari dai dati esistenti dimostrano sicurezza paragonabile tra i prodotti dei TIL LN-144 della Gen 1 e della Gen 2. La somministrazione del prodotto dei TIL con il procedimento della Gen 2 (procedimento 2A, come descritto qui) conduce a risposte cliniche sorprendentemente aumentate viste in pazienti con melanoma metastatico a malattia avanzata, tutti hanno progredito con le terapie anti-PD-1 ed anti-CTLA-4 precedenti. Il DCR per la coorte 2 era del 78%.

I dati preliminari sui biomarcatori sostengono il meccanismo d'azione citolitico proposto per la terapia con TIL.

La forma di realizzazione del procedimento di produzione della Gen 2 descritta qui prende 22 giorni. Questo procedimento accorcia significativamente la durata del tempo che un paziente deve aspettare per ricevere i suoi TIL, offre flessibilità nella tempistica di dosaggio dei pazienti, e conduce a una riduzione del costo di produzione, mentre vengono forniti altri vantaggi rispetto ad approcci precedenti che permettono la commercializzazione e la registrazione con agenzie regolatorie della salute. I dati clinici preliminari nel melanoma metastatico utilizzando una forma di realizzazione del procedimento di produzione della Gen 2 indicano anche un miglioramento sorprendente nell'efficacia clinica dei TIL, misurato mediante DCR, ORR, e altre risposte cliniche, con un tempo alla risposta e un profilo di sicurezza simili in confronto ai TIL prodotti utilizzando il procedimento della Gen 1. L'efficacia inaspettatamente migliorata del prodotto dei TIL della Gen 2 è anche dimostrata da un incremento di più di cinque volte nella produzione di IFN- $\gamma$  (figura 98), che è correlato all'efficacia migliorata in generale (figura 122), alla policlonalità significativamente migliorata (figura 99A e figura 99B), e alla superiore produzione media di IP-10 e MCP-1 (dalla figura 123 alla figura 126). Sorprendentemente, nonostante il procedimento della Gen 2 molto più breve, molte altre caratteristiche critiche del prodotto dei TIL sono simili a quelle osservate utilizzando procedimenti di produzione più tradizionali, comprendenti la lunghezza relativa dei telomeri (figura 97) e l'espressione di CD27 e CD28 (figura 96B e figura 96C).

## Riferimenti

<sup>1</sup>Goff, et al. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 10 luglio 2016; 34(20):2389-97.

<sup>2</sup>Sarnaik A, Kluger H, Chesney J, et al. Efficacy of single administration of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in heavily pretreated patients with metastatic melanoma following checkpoint therapy. *J. Clin. Oncol.* 2017; 35 [supplementi; riassunto 3045].

## ESEMPIO 29: STUDI DI FASE 2 DI HNSCC E CARCINOMA DEL COLLO DELL'UTERO

Arruolamento per lo studio di fase 2 dell'HNSCC (carcinoma a cellule squamose della testa e del collo; C-145-03). 13 pazienti hanno acconsentito

allo studio, i TIL sono stati raccolti da 10 pazienti e alla fine 7 pazienti sono stati sottoposti ad infusione con 1 in più in corso.

Arruolamento nello studio di fase 2 del carcinoma del collo dell'utero (C-145-04). 8 pazienti hanno acconsentito allo studio, i TIL sono stati raccolti da 4 pazienti e infine 2 pazienti sono state sottoposte ad infusione e 2 in più in corso.

I dati iniziali dallo studio in atto vengono fornito nella figura 127. La malattia stabile (SD) e/o la risposta progressiva sono state osservate in entrambi i pazienti con HCNSCC e con cancro cervicale trattati con la terapia con i TIL fino a 84 giorni.

Gli esempi esposti sopra vengono forniti per dare a coloro che hanno abilità ordinaria nell'arte una descrizione completa e una descrizione di come produrre ed utilizzare le forme di realizzazione delle composizioni, i sistemi e i metodi dell'invenzione, e non sono intesi limitare l'ambito di ciò che gli inventori considerano come loro invenzione. Le modifiche dei suddetti modi per realizzare l'invenzione che sono ovvie a persone di esperienza nell'arte vengono intese essere nell'ambito delle rivendicazioni seguenti. Tutti i brevetti e tutte le pubblicazioni citate nella descrizione sono indicativi dei livelli di esperienza di coloro che sono esperti nell'arte a cui l'invenzione si riferisce.

Tutti i titoli e le indicazioni di sezione vengono utilizzati solo per scopi di chiarezza e riferimento e non devono essere considerati limitanti in alcun modo. Per esempio, coloro che sono esperti nell'arte comprenderanno l'utilità di combinare vari aspetti da differenti titoli e sezioni come appropriato.

Le forme di realizzazione e gli esempi specifici descritti qui vengono offerti solo a titolo di esempio, e la domanda deve essere limitata solo dai termini delle rivendicazioni allegate, insieme all'ambito completo di equivalenti per cui le rivendicazioni sono legittimate.

#### **Sequenze:**

La SEQ ID NO: 1 è la sequenza amminoacidica della catena pesante del muromonab.

La SEQ ID NO: 2 è la sequenza amminoacidica della catena leggera del muromonab.

La SEQ ID NO: 3 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-2 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 4 è la sequenza amminoacidica dell'aldesleuchina.

La SEQ ID NO: 5 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-4 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 6 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-7 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 7 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-15 ricombinante umana.

La SEQ ID NO: 8 è la sequenza amminoacidica di una proteina IL-21 ricombinante umana.

Sequenze amminoacidiche del muromonab.

Identificatore	Sequenza (simboli degli amminoacidi a una lettera)	
SEQ ID NO: 1 catena pesante del muromonab	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCRASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTN NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVVYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 catena leggera del muromonab	QIVLTQSPA I MSASPGEKVT MTCASASSVS YMNWYQQRSG TSPKRWIYDT SKLASGVP FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFFPS SEQLTSGGAS VVCFLNFPYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHRTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

Sequenze amminoacidiche delle interleuchine.

Identificatore	Sequenza (simboli degli amminoacidi a una lettera)	
SEQ ID NO: 3 IL-2 ricombinante umana (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMLINGIN NYKNPKLTRM LTFKPYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII SLTL	60 120 134
SEQ ID NO: 4 aldesleuchina	PTSSSTRKTQ LQLEHLLDL QMLINGINNY KNPKLTRMLT KFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO: 5 IL-4 ricombinante umana (rhIL-4)	MHKCDITIQE IIKTLNLSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO: 6 IL-7 ricombinante umana (rhIL-7)	MDCDIEGRDG KYESVLMVS IDQLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTIIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TRSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLEQEI TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO: 7 IL-15 ricombinante umana (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MRCFLLELQV ISLES GDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO: 8 IL-21 ricombinante umana (rhIL-21)	MQDRHMIRM R QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVS I KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSL LQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

## RIVENDICAZIONI

1. Metodo per espandere linfociti infiltranti il tumore (TIL) in una popolazione terapeutica di TIL comprendente:

(a) l'aggiungere i frammenti tumorali trattati da un tumore resecato da un paziente in un sistema chiuso per ottenere una prima popolazione di TIL;

(b) l'eseguire una prima espansione coltivando la prima popolazione dei TIL in un terreno di coltura cellulare comprendente IL-2 per ottenere una seconda popolazione di TIL, in cui la prima espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una prima area superficiale permeabile ai gas, in cui la prima espansione viene eseguita per circa 3-11 giorni per ottenere la seconda popolazione dei TIL, in cui la seconda popolazione dei TIL è almeno 50 volte maggiore nel numero rispetto alla prima popolazione dei TIL, e in cui la transizione dal passaggio (a) al passaggio (b) avviene senza apertura del sistema;

(c) l'eseguire una seconda espansione integrando il terreno di coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL con ulteriori IL-2, OKT-3, e cellule presentanti l'antigene (APC), per produrre una terza popolazione di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita per circa 7-11 giorni per ottenere la terza popolazione dei TIL, in cui la terza popolazione dei TIL è una popolazione terapeutica di TIL, in cui la seconda espansione viene eseguita in un contenitore chiuso che fornisce una seconda area superficiale permeabile ai gas, e in cui la transizione dal passaggio (b) al passaggio (c) avviene senza apertura del sistema;

(d) il raccogliere la popolazione terapeutica dei TIL ottenuti dal passaggio (c), in cui la transizione dal passaggio (c) al passaggio (d) avviene senza apertura del sistema, e in cui la popolazione terapeutica dei TIL raccolta comprende TIL sufficienti per un dosaggio terapeuticamente efficace dei TIL;

(e) il trasferire la popolazione dei TIL raccolta dal passaggio (d) a una sacca per infusione, in cui il trasferimento dal passaggio (d) a (e) avviene senza apertura del sistema, e

(f) la crioconservazione della sacca per infusione comprendente la popolazione dei TIL raccolta utilizzando un procedimento di crioconservazione.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, dove il numero di TIL sufficiente per un dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $1 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$  TIL.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1, dove il numero di TIL sufficiente per un dosaggio terapeuticamente efficace è da circa  $5 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  TIL.

4. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il procedimento di crioconservazione viene eseguito utilizzando un rapporto 1:1 tra la popolazione dei TIL raccolta e il mezzo di crioconservazione.

5. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui le cellule presentanti l'antigene sono cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC).
6. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti entro un periodo da circa 10 giorni a circa 22 giorni.
7. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti entro un periodo da circa 15 giorni a circa 22 giorni.
8. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti entro un periodo da circa 10 giorni a circa 20 giorni.
9. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui i passaggi da (a) ad (e) vengono eseguiti entro un periodo da circa 20 giorni a circa 22 giorni.
10. Metodo secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui al passaggio (c) le cellule presentanti l'antigene (APC) vengono aggiunte alla coltura cellulare della seconda popolazione dei TIL in un rapporto APC:TIL di 25:1.
11. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui il mezzo di crioconservazione comprende dimetilsolfossido (DMSO).
12. Metodo secondo la rivendicazione 11, in cui il mezzo di crioconservazione comprende DMSO dal 7% al 10%.

\* \* \* \* \*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

  
Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

## LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1/136

FIGURA 1

“Process 2A-22 Days Process, 2-3 Days Harvest/Ship” = procedimento 2A-procedimento di 22 giorni, raccolta da 2 a 3 giorni/spedizione

“Excise Tumor” = asportare il tumore

“ $\geq 1.5$  cm Diameter” =  $\geq 1,5$  cm di diametro

“Overnight” = per una notte

“1-3 mm<sup>2</sup> Fragments” = frammenti da 1 a 3 mm<sup>2</sup>

“40 Fragments” = 40 frammenti

“G-Rex 100m Closed” = G-Rex 100m chiuso

“Bulk TILs” = TIL non purificati

“Direct To REP-Day 11” = diretto al giorno 11 del REP

“Co-Culture TIL and Feeder Cells” = sottoporre a cocoltura TIL e cellule nutritive

“G-Rex 500m Closed-Day 16 Split” = G-Rex 500m chiuso-divisione al giorno 16

“LOVO-Day 22 Harvest” = LOVO-raccolta al giorno 22

“LN2-Freeze in Aliquots” = congelamento in azoto liquido in aliquote

“Scheduled Cryoshipper” = contenitore per la crioconservazione programmato

“Thaw And Infuse” = scongelare e infondere

“GMP MANUFACTURING FACILITY” = impianto di produzione in accordo con le pratiche di buona fabbricazione

“Initial TIL Culture (Pre-REP) = 11d” = coltura iniziale di TIL (pre-REP) = 11 giorni

“Rapid Expansion Protocol (REP) = 11d” = protocollo di espansione rapida (REP) = 11 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 2/136

FIGURA 2

“Process Development” = sviluppo del procedimento

“Step” = passaggio

“Current Process” = procedimento attuale

“New Process” = nuovo procedimento

“Impact” = impatto

“4 Fragments/10 G-Rex 10-21 Days” = 4 frammenti/10 G-Rex da 10 a 21 giorni

“Pre-REP Freeze->Testing->Thaw-Day 27->40e6TIL” = congelamento pre-REP->esame->scongelo-giorno 27-TIL >40e6

“36 G-Rex 100-Day 30 >5e6TIL – Split – Day 36” = 36 G-Rex 100-giorno 30 TIL>5e6 – divisione – giorno 36

“Harvest Day 43+Harvesting By Centrifugation” = giorno 43 di raccolta+raccolta mediante centrifugazione

“Fresh Product-Hypothermosol-Single Infusion Bag” = prodotto fresco-hypothermosol-singola sacca per infusione

“43+ Day Process Time” = tempo di procedimento giorno 43+

“40 Fragments/1-G-Rex 100 CS- (x2?) 11 Days” = 40 frammenti/1-G-Rex 100 CS- (x2?) 11 giorni

“Direct to REP-Day 11- <200e6” = diretto al REP-giorno 11- <200e6

“4-5 G-Rex 500CS-TIL-Split Day 16” = da 4 a 5 G-Rex 500CS-TIL-divisione al giorno 16

“Harvest Day 22 LOVO-Automated Cell Washer” = raccolta giorno 22 LOVO-sistema di lavaggio cellulare automatizzato

“Cryopreserved Product-CS10 in LN2, Multiple Aliquots” = prodotto crioconservato-CS10 in azoto liquido, aliquote multiple

“22 Day Process Time” = tempo di procedimento di 22 giorni

“Increases Tumor Sample/Container, Shortens Culture, Reduces Steps, Amenable To Closed System” = aumenta il campione/contenitore del tumore, accorcia la coltura, riduce i passaggi, disponibile per un sistema chiuso

“Shorten Process, Reduces Steps, Eliminates Testing” = accorcia il procedimento, riduce i passaggi, elimina l’esame

“Reduces Steps, Closed System, Shorter REP” = riduce i passaggi, sistema chiuso, REP più corto

“Reduces Steps, Automated, Closed System” = riduce i passaggi, automatizzato, sistema chiuso

“Shipping Flexibility, Patient Scheduling, Easier Release Testing, Global Trials Turnaround To Patient, Clean Room Throughput, COGs” = flessibilità di spedizione, programmazione del paziente, esame di rilascio più facile, conversione degli studi clinici globali al paziente, volume di produzione della camera sterile, COG

“Overnight” = per una notte

“2-3 mm<sup>2</sup> Fragments” = frammenti da 2 a 3 mm<sup>2</sup>

“Bulk TIL” = TIL non purificati

“Freeze Test Thaw” = congelare, esaminare, scongelare

“Co-Culture TIL and Feeder Cells” = sottoporre a cocoltura TIL e cellule nutritive

“G-Rex 100m (36 Flasks) Rapid Expand To 1.5-150x10<sup>9</sup>” = G-Rex 100m (36 palloni) espansione rapida da 1,5x10<sup>9</sup> a 150x10<sup>9</sup>

“Centrifuge” = centrifugare

“Infusion Bag” = sacca per infusione

“GMP MANUFACTURING FACILITY” = impianto di produzione in accordo con le pratiche di buona fabbricazione

“Initial TIL Culture (Pre-REP) 1-3 Weeks” = coltura iniziale di TIL (pre-REP) da 1 a 3 settimane

“Rapid Expansion Protocol (REP) 2 Weeks” = protocollo di espansione rapida (REP) 2 settimane

“Figure” = figura

TAVOLA 3/136

FIGURA 3

“Timeline-Process 1C-Current process” = linea del tempo-procedimento 1C-procedimento attuale

“Surgery” = intervento chirurgico

“Pre-REP Initiation” = inizio del pre-REP

“Feed” = alimentazione

“Feed/Harvest” = alimentazione/raccolta

“Pre-REP” = pre-REP

“REP Thaw” = scongelamento del REP

“REP Initiation” = inizio del REP

“Pre-REP Testing (Phenotype, Sterility)” = esame pre-REP (fenotipo, sterilità)

“Day 7 Split (Sterility Mycoplasma Cell count)” = giorno 7, divisione (sterilità, conta delle cellule, Micoplasma)

“Day 14 Harvest (Sterility, Mycoplasma CD3 count Gram Stain, Endotoxin)” = giorno 14, raccolta (sterilità, Micoplasma, colorazione Gram per la conta di CD3, endotossina)

“Reinfuse” = infondere nuovamente

“Report to Site” = riportare al sito

“Lymphodepletion Chemo” = chemioterapia di linfodeplezione

“Ship” = spedizione

“Release on: Gram Stain, Day 7 Sterility, Day 7 Mycoplasma, Day 14 Endotoxin, Day 14 CD3 count” = rilascio sulla base di: colorazione Gram, sterilità al giorno 7, Micoplasma al giorno 7, endotossina al giorno 14, conta di CD3 al giorno 14

“Figure” = figura

TAVOLA 4/136

FIGURA 4

“TIL Therapy Timeline-v2A-Day 16 REP >250e6” = linea del tempo della terapia con TIL-v2A-giorno 16 del REP >250e6

“Day 6 REP count >250e6” = giorno 6 del REP, conta >250e6

“Surgery” = intervento chirurgico

“Pre-REP Initiation” = inizio del pre-REP

“REP Initiation” = inizio del REP

“Pre-REP Harvest” = raccolta pre-REP

“Day 6 Split (Sterility Mycoplasma Cell count)” = giorno 6, divisione (sterilità, Micoplasma, conta delle cellule)

“Day 11 Harvest (Sterility, Mycoplasma CD3 count Gram Stain, Endotoxin)” = giorno 11, raccolta (sterilità, Micoplasma, CD3, colorazione Gram per la conta, endotossina)

“Reinfuse” = infondere nuovamente

“Report to Site” = riportare al sito

“Lymphodepletion Chemo” = chemioterapia di linfodeplezione

“Ship” = spedizione

“Interleukin-2” = interleuchina-2

“Release on: Gram Stain, Day 6 Sterility, Day 6 Mycoplasma, Day 11 Endotoxin, Day 11 CD3 count” = rilascio sulla base di: colorazione Gram, sterilità al giorno 6, Micoplasma al giorno 6, endotossina al giorno 11, conta di CD3 al giorno 11

“Total Therapy Time (operation □ infusion) = 25 days” = tempo totale della terapia (operazione □ infusione) = 25 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 5/136

FIGURA 5

“TIL Therapy Timeline-v2A-Day 16 REP >250e6” = linea del tempo della terapia con TIL-v2A-giorno 16 del REP >250e6

“Day 6 REP count <250e6” = giorno 6 del REP, conta <250e6

“Surgery” = intervento chirurgico

“Pre-REP Initiation” = inizio del pre-REP

“REP Initiation” = inizio del REP

“Pre-REP Harvest” = raccolta pre-REP

“Day 6 Split (Sterility Mycoplasma Cell count)” = giorno 6, divisione (sterilità, Micoplasma, conta delle cellule)

“Day 11 Harvest (Sterility, Mycoplasma CD3 count Gram Stain, Endotoxin)” = giorno 11, raccolta (sterilità, Micoplasma, CD3, colorazione Gram per la conta, endotossina)

“Reinfuse” = infondere nuovamente

“Report to Site” = riportare al sito

“Lymphodepletion Chemo” = chemioterapia di linfodeplezione

“Ship” = spedizione

“Release on: Gram Stain, Day 6 Sterility, Day 6 Mycoplasma, Day 11 Endotoxin, Day 11 CD3 count” = rilascio sulla base di: colorazione Gram, sterilità al giorno 6, Micoplasma al giorno 6, endotossina al giorno 11, conta di CD3 al giorno 11

“Total Therapy Time (surgery □ infusion) = 31 days” = tempo totale della terapia (intervento chirurgico □ infusione) = 31 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 6/136

FIGURA 6

“Day” = giorno

“Tumor Extraction and Shipment” = estrazione e spedizione del tumore

“Tumor Arrival” = arrivo del tumore

“40 Tumor Fragments” = 40 frammenti di tumore

“Final Conc.” = concentrazione finale

“Prep” = preparazione

“Incubate 7 Days” = incubare 7 giorni

“Feed TIL in G-REX 500M Flask” = nutrire i TIL in un pallone G-REX 500M

“Incubate 9 Days” = incubare 9 giorni

“Se9 irradiated allogenic feeders” = cellule nutritive allogeniche irradiate con Se9

“Wash feeders once in CM2” = lavare le cellule nutritive una volta in CM2

“Thaw feeders” = scongelare le cellule nutritive

“Volume Reduction to 500mL” = riduzione del volume a 500 ml

“Filter TIL into IL transfer pack” = filtrare i TIL in un pacco per il trasferimento dell’IL

“Cell count/Viability” = conta/vitalità cellulare

“Cellometer” = cellometro

“LOVO Membrane Filtration System” = sistema di filtrazione a membrane LOVO

“Wash Buffer” = tampone di lavaggio

“Prep wash buffer” = tampone di lavaggio preparativo

“Formulation (50% LOVO product, 50% CS10)” = formulazione (prodotto con LOVO al 50%, CS10 al 50%)

“Controlled Rate Freezer” = congelatore a velocità controllata

“Long-term storage” = conservazione a lungo termine

“Figure” = figura

TAVOLA 7/136

FIGURA 7

“Figure” = figura

“P value” = valore di p

“P value summary” = riassunto del valore di p

“Significantly different?” = significativamente differente?

“One- or two-tailed P value?” = valore di p a una coda oppure a due code?

“Two-tailed” = a due code

“Number of pairs” = numero di coppie

“Cells” = cellule

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“How effective was the pairing?” = quanto è stato efficace l'accoppiamento?

“Correlation coefficient” = coefficiente di correlazione

“P value (one tailed)” = valore di p (a una coda)

“Was the pairing significantly effective?” = l'accoppiamento è stato significativamente efficace?

TAVOLA 8/136

FIGURA 8

“Figure” = figura

“P value summary” = riassunto del valore di p

“Significantly different?” = significativamente differente?

“One- or two-tailed P value?” = valore di p a una coda oppure a due code?

“Two-tailed” = a due code

“Number of pairs” = numero di coppie

“Cell Concentration” = concentrazione cellulare

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“How effective was the pairing?” = quanto è stato efficace l'accoppiamento?

“Correlation coefficient” = coefficiente di correlazione

“P value (one tailed)” = valore di p (a una coda)

“Was the pairing significantly effective?” = l'accoppiamento è stato significativamente efficace?

“Yes” = sì

TAVOLA 9/136

FIGURA 9

“Figure” = figura

“P value summary” = riassunto del valore di p

“Significantly different?” = significativamente differente?

“One- or two-tailed P value?” = valore di p a una coda oppure a due code?

“Two-tailed” = a due code

“Number of pairs” = numero di coppie

“Concentration” = concentrazione

“Fresh vs. Thaw cell recovery” = recupero cellulare fresco vs. scongelato

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“How effective was the pairing?” = quanto è stato efficace l'accoppiamento?

“Correlation coefficient” = coefficiente di correlazione

“P value (one tailed)” = valore di p (a una coda)

“Was the pairing significantly effective?” = l'accoppiamento è stato significativamente efficace?

“Yes” = sì

TAVOLA 10/136

FIGURA 10

“Figure” = figura

“P value summary” = riassunto del valore di p

“Significantly different?” = significativamente differente?

“One- or two-tailed P value?” = valore di p a una coda oppure a due code?

“Two-tailed” = a due code

“Number of pairs” = numero di coppie

“Viability” = vitalità

“Cell Concentration” = concentrazione cellulare

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“How effective was the pairing?” = quanto è stato efficace l'accoppiamento?

“Correlation coefficient” = coefficiente di correlazione

“P value (one tailed)” = valore di p (a una coda)

“Was the pairing significantly effective?” = l'accoppiamento è stato significativamente efficace?

“Yes” = sì

TAVOLA 11/136

FIGURA 11a

“Day 0 – Tumor Isolation” = giorno 0 – isolamento del tumore

“Tumor tissue in Hypothermosol + 50 ug/mL Gentamicin + 2.5 ug/mL Amphotericin B” = tessuto tumorale in Hypothermosol + gentamicina 50 µg/ml + amfotericina B 2,5 µg/ml

“Bioburden Sample Transport Medium” = terreno di trasporto del campione per la carica batterica

“Isolation” = isolamento

“50 µg/ml Gentamicin Sulfate” = gentamicina solfato 50 µg/ml

“Tumor fragments” = frammenti del tumore

“1L/flask” = 1 l/pallone

“Seed  $\leq 1X$  G-Rex100MCS  $\leq 50$  fragments/flask 1L/flask” = seminare  $\leq 1X$  G-Rex100MCS  $\leq 50$  frammenti/pallone 1L/pallone

“Remaining Tissue Sample” = campione di tessuto rimanente

“Day 11 REP Initiation” = giorno 11 inizio del REP

“Spent Medium Removal” = rimozione del terreno utilizzato

“BacT Sterility Sample 10 ml spent medium/harvested unit” = campione per la sterilità BacT 10 ml di terreno utilizzato/unità raccolta

“Transfer to 1L transfer pack” = trasferire ad un pacco di trasferimento da 1 l

“Cell Count & Viability” = conta e vitalità cellulari

“Viable TIL to flow CD3/CD45” = TIL vitali per fluire CD3/CD45

“TILs” = TIL

“Variable volume” = volume variabile

“Volume reduce excess TIL” = il volume riduce i TIL in eccesso

“10mins” = 10 minuti

“Feeder Cells, Irradiated  $\geq 2$  donors, 3 bags,  $2.5 \times 10^9$ /bag” = cellule nutritive, irradiate  $\geq 2$  donatori, 3 sacche,  $2.5 \times 10^9$ /sacca

“Cryopreserve excess TIL  $1 \times 10^8$  mL in CS10 1 mL/vial” = crioconservare i TIL in eccesso  $1 \times 10^8$  ml in CS10 1 ml/flaconcino

“Feeder Thaw” = scongelare le cellule nutritive

“Pool Feeders  $5 \times 10^9$  viable cells” = raggruppare le cellule nutritive,  $5 \times 10^9$  cellule vitali

“Cell Count & Viability” = conta e vitalità cellulari

“Seed 1x G-Rex500MCS  $5 \times 10^6$  –  $2 \times 10^8$  TIL  $5 \times 10^9$  feeder cells/flask” = seminare 1x G-Rex500MCS  $5 \times 10^6$  –  $2 \times 10^8$  TIL  $5 \times 10^9$  cellule nutritive/pallone

“Figure” = figura

“REP PD Process PFD Page 1/3” = procedimento PD REP PFD pagina 1/3

TAVOLA 12/136

FIGURA 11b

“Figure” = figura

“Day 16 – Culture Split” = giorno 16 – divisione della coltura

“Spent Medium Sampling & Removal” = campionamento e rimozione del terreno utilizzato

“Spent Medium Samples” = campioni di terreno utilizzato

“BacT Sterility Sample Pooled spent medium” = terreno utilizzato raggruppato di campioni per la sterilità BacT

“Mycoplasma PCR Sample Diluent Pooled spent medium” = terreno utilizzato raggruppato di diluente per campioni di PCR per Micoplasma

“Transfer cell suspension to 1L transfer pack” = trasferire la sospensione cellulare a un pacco di trasferimento da 1 l

“Store Pooled TILs in incubator when not needed for sampling or seeding” = conservare i TIL raggruppati in incubatore quando non necessari per il campionamento o per la semina

“TIL Cell Count” = conta cellulare di TIL

“Mycoplasma PCR Sample” = campione per la PCR di Micoplasma

“cells” = cellule

“Remove QC Samples” = rimuovere i campioni QC

“Yes” = sì

“Continue processing, notify client” = continuare la lavorazione, notificare il cliente

“Split & Seed” = dividere e seminare

“flask” = pallone

“# Flasks:  $TVC \div (1 \times 10^9 TVC/flask)$  rounded up to nearest whole number” = numero di palloni:  $TVC \div (1 \times 10^9 TVC/pallone)$  arrotondato al numero intero più vicino

“REP Cultures” = colture del REP

“REP PD Process PFD Page 2/3” = procedimento PD REP PFD pagina 2/3

TAVOLA 13/136

FIGURA 11c

“Figure” = figura

“Day 22 – REP Harvest” = giorno 22 – raccolta del REP

“Spent Medium removal” = rimozione del terreno utilizzato

“supernate” = surnatante

“Pool supernate 10L Bioprocess bag(s)” = raggruppare la/e sacca/sacche per bioprocessi da 10 l di surnatante

“Mycoplasma PCR Sample Diluent” = diluente del campione per PCR di Micoplasma

“3L Cell culture bag (Origen EV3000 or equivalent)” = sacca per coltura cellulare da 3 l (Origen EV3000 o equivalente)

“Cell Count & Viability” = conta e vitalità cellulari

“sample” = campione

“Wash Buffer” = tampone di lavaggio

“Volume Reduction LOVO 2 Cycles, 10:1 concentration” = riduzione del volume LOVO 2 cicli, concentrazione 10:1

“Min” = minuto

“Formulate 1:1 with cold CS10” = formulare 1:1 con CS10 freddo

“Add IL-2” = aggiungere IL-2

“Satellite Vial Prep” = preparazione di flaconcini satellite

“Cryopreserved Satellite Vial Sample 10 x 0.5mL/vial” = campione in flaconcino satellite crioconservato 10 x 0,5 ml/flaconcino

“Remove QC Release Test Samples & Air (Mycoplasma, Endotoxin, Sterility, Gram Stain, Cell Count, viability, flow, IFN- $\gamma$ , Retain)” = rimuovere i campioni per le prove di rilascio di QC e l'aria (Mycoplasma, endotossina, sterilità, colorazione di Gram, conta cellulare, vitalità, flusso, IFN- $\gamma$ , conservare)

“Manual Fill 0.5 mL/vial” = riempimento manuale 0,5 ml/flaconcino

“Formulate bulk Product Bag stored at 2-8°C in between processing steps” = formulare una sacca di prodotto sfuso conservata da 2°C a 8°C tra i passaggi di lavorazione

“Aliquot into CS750 cryobags 90-120mL/bag” = aliquotare in criosacche CS750 da 90 a 120 ml/sacca

“Controlled Rate Freeze Preset-6 Profile” = profilo 6 preimpostato di congelamento a velocità controllata

“Visually Inspect” = ispezionare visivamente

“Store in vapor phase LN” = conservare in azoto liquido in fase di vapore

“Ship” = spedire

“REP PD Process PFD Page 3/3” = procedimento PD REP PFD pagina 3/3

TAVOLA 14/136

FIGURA 12

“Cells count” = conta cellulare

“Figure” = figura

TAVOLA 15/136

FIGURA 13

“% of viable cells” = % di cellule vitali

“Figure” = figura

TAVOLA 16/136

FIGURA 14

“% Frequency of Live” = % di frequenza di cellule vive

“Figure” = figura

TAVOLA 17/136

FIGURA 15

“IFN- $\gamma$  (pg/1e6 viable cells/24hrs)” = IFN- $\gamma$  (pg/1e6 cellule vitali/24 ore)

“TIL product” = prodotto di TIL

“Inhouse TIL” = TIL prodotti internamente

“Moffitt TIL” = TIL Moffitt

“Figure” = figura

TAVOLA 18/136

FIGURA 16

“IFN- $\gamma$  (pg/1e6 viable cells/24hrs) log10 scale” = IFN- $\gamma$  (pg/1e6 cellule vitali/24 ore) scala in log10

“TIL product” = prodotto di TIL

“Inhouse TIL” = TIL prodotti internamente

“Moffitt TIL” = TIL Moffitt

“Figure” = figura

TAVOLA 19/136

FIGURA 17

“TCRa/b and NK” = TCRa/b e NK

“% Frequency of Parent” = % di frequenza del genitore

“Figure” = figura

TAVOLA 20/136

FIGURA 18

“CD8 subsets” = sottotipi di CD8

“% Frequency of live” = % di frequenza di cellule vive

“CD4 subsets” = sottotipi di CD4

“CD8/CD4 Ratio” = rapporto CD8/CD4

“Figure” = figura

TAVOLA 21/136

FIGURA 19

“CD4 Memory Subsets” = sottotipi della memoria CD4

“% Frequency of Parent” = % di frequenza del genitore

“Naive” = vergine

“CD8 Memory Subsets” = sottotipi della memoria CD8

“Figure” = figura

TAVOLA 22/136

FIGURA 20

“PD1 Expression” = espressione di PD1

“% Frequency of Parent” = % di frequenza del genitore

“LAG-3 Expression” = espressione di LAG-3

“Tim-3 Expression” = espressione di Tim-3

“Figure” = figura

TAVOLA 23/136

FIGURA 21

“41BB Expression” = espressione di 41BB

“% Frequency of Parent” = % di frequenza del genitore

“CD69 Expression” = espressione di CD69

“KLRG1 Expression” = espressione di KLRG1

“Figure” = figura

TAVOLA 24/136

FIGURA 22

“TIGIT Expression” = espressione di TIGIT

“% Frequency of Parent” = % di frequenza del genitore

“Figure” = figura

TAVOLA 25/136

FIGURA 23

“CD27 Expression” = espressione di CD27

“% Frequency of Parent” = % di frequenza del genitore

“CD28 Expression” = espressione di CD28

“Figure” = figura

TAVOLA 26/136

FIGURA 24

“Relative Telomere length” = lunghezza relativa dei telomeri

“Process” = procedimento

“Figure” = figura

TAVOLA 27/136

FIGURA 25

“Relative Telomere length” = lunghezza relativa dei telomeri

“Process” = procedimento

“Figure” = figura

TAVOLA 28/136

FIGURA 26

“Figure” = figura

“Unresectable or Metastatic Melanoma Progressed after Prior Anti-PD-1 therapy and, if BRAF mutant, after BRAF inhibitor” = melanoma non rimovibile o metastatico progredito dopo una precedente terapia anti-PD-1 e, se mutante in BRAF, dopo un inibitore di BRAF

“Cohort 1: Fresh TIL Product” = coorte 1: prodotto dei TIL freschi

“Cohort 2: Cryopreserved TIL Product” = coorte 2: prodotto dei TIL crioconservati

“Cohort 3: TIL Re-treatment” = coorte 3: ritrattamento dei TIL

TAVOLA 29/136

FIGURA 27

“Figure” = figura

“Process 2A: about 22 days from Steps A-E” = procedimento 2A: circa 22 giorni dai passaggi da A a E

“STEP” = passaggio

“Obtain Patient Tumor Sample” = ottenere il campione tumorale del paziente

“Fragmentation and First Expansion” = frammentazione e prima espansione

“3 days to 14 days” = da 3 giorni a 14 giorni

“First Expansion to Second Expansion Transition” = transizione dalla prima espansione alla seconda espansione

“No Storage and Closed System” = nessuna conservazione e sistema chiuso

“Second Expansion” = seconda espansione

“IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells” = IL-2, OKT-3, e cellule nutritive presentanti l'antigene

“Closed System” = sistema chiuso

“Harvest TILS from Step D” = raccogliere i TIL dal passaggio D

“Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)” = formulazione e/o trasferimento finale alla sacca per infusione

(crioconservare facoltativamente)

TAVOLA 30/136

FIGURA 28a

“Day 0 – Tumor Isolation” = giorno 0 – isolamento del tumore

“Tumor tissue in Hypothermosol + 50 µg/ml Gentamicin + 2.5 µg/ml Amphotericin B” = tessuto tumorale in Hypothermosol + gentamicina 50 µg/ml + amfotericina B 2,5 µg/ml

“Bioburden Sample Transport Medium” = terreno di trasporto del campione per la carica batterica

“Isolation” = isolamento

“50 µg/ml Gentamicin Sulfate” = gentamicina solfato 50 µg/ml

“Tumor fragments” = frammenti del tumore

“1L/flask” = 1 l/pallone

“Seed  $\leq 1 \times 10^5$  G-Rex100MCS  $\leq 50$  fragments/flask 1L/flask” = seminare  $\leq 1 \times 10^5$  G-Rex100MCS  $\leq 50$  frammenti/pallone 1L/pallone

“Remaining Tissue Sample” = campione di tessuto rimanente

“Day 11 REP Initiation” = giorno 11 inizio del REP

“Spent Medium Removal” = rimozione del terreno utilizzato

“BacT Sterility Sample 10 ml spent medium/harvested unit” = campione per la sterilità BacT 10 ml di terreno utilizzato/unità raccolta

“Transfer to 1L transfer pack” = trasferire ad un pacco di trasferimento da 1 l

“Cell Count & Viability” = conta e vitalità cellulari

“Viable TIL to flow CD3/CD45” = TIL vitali per fluire CD3/CD45

“TILs” = TIL

“Variable volume” = volume variabile

“Volume reduce excess TIL” = il volume riduce i TIL in eccesso

“10mins” = 10 minuti

“Feeder Cells, Irradiated  $\geq 2$  donors, 3 bags,  $2.5 \times 10^9$ /bag” = cellule nutritive, irradiate  $\geq 2$  donatori, 3 sacche,  $2.5 \times 10^9$ /sacca

“Cryopreserve excess TIL  $1 \times 10^8$  mL in CS10 1 mL/vial” = crioconservare i TIL in eccesso  $1 \times 10^8$  ml in CS10 1 ml/flaconcino

“Feeder Thaw” = scongelare le cellule nutritive

“Pool Feeders 5E09 viable cells” = raggruppare le cellule nutritive 5E09 cellule vitali

“Cell Count & Viability” = conta e vitalità cellulari

“Seed 1x G-Rex500MCS 5x10<sup>6</sup> – 2x10<sup>8</sup> TIL 5x10<sup>9</sup> feeder cells/flask” = seminare 1x G-Rex500MCS 5x10<sup>6</sup> – 2x10<sup>8</sup> TIL 5x10<sup>9</sup> cellule nutritive/pallone

“Figure” = figura

“REP PD Process PFD Page 1/3” = procedimento PD REP PFD pagina 1/3

TAVOLA 31/136

FIGURA 28b

“Day 16 – Culture Split” = giorno 16 – divisione della coltura

“Spent Medium Sampling & Removal” = campionamento e rimozione del terreno utilizzato

“Spent Medium Samples” = campioni di terreno utilizzato

“BacT Sterility Sample Pooled spent medium” = terreno utilizzato raggruppato di campioni per la sterilità BacT

“Mycoplasma PCR Sample Diluent Pooled spent medium” = terreno utilizzato raggruppato di diluente per campioni di PCR per Micoplasma

“Transfer cell suspension to 1L transfer pack” = trasferire la sospensione cellulare a un pacco di trasferimento da 1 l

“Store Pooled TILs in incubator when not needed for sampling or seeding” = conservare i TIL raggruppati in incubatore quando non necessari per il campionamento o per la semina

“TIL Cell Count” = conta cellulare di TIL

“Mycoplasma PCR Sample” = campione per la PCR di Micoplasma

“cells” = cellule

“Remove QC Samples” = rimuovere i campioni QC

“Yes” = sì

“Continue processing, notify client” = continuare la lavorazione, notificare il cliente

“Split & Seed” = dividere e seminare

“flask” = pallone

“# Flasks:  $TVC \div (1 \times 10^9 \text{ TVC/flask})$  rounded up to nearest whole number” = numero di palloni:  $TVC \div (1 \times 10^9 \text{ TVC/pallone})$  arrotondato al numero intero più vicino

“REP Cultures” = colture del REP

“REP PD Process PFD Page 2/3” = procedimento PD REP PFD pagina 2/3

TAVOLA 32/136

FIGURA 28c

“Figure” = figura

“Day 22 – REP Harvest” = giorno 22 – raccolta del REP

“Spent Medium removal” = rimozione del terreno utilizzato

“supernate” = surnatante

“Pool supernate 10L Bioprocess bag(s)” = raggruppare la/e sacca/sacche per bioprocessi da 10 l di surnatante

“Mycoplasma PCR Sample Diluent” = diluente del campione per PCR di Micoplasma

“3L Cell culture bag (Origen EV3000 or equivalent)” = sacca per coltura cellulare da 3 l (Origen EV3000 o equivalente)

“Cell Count & Viability” = conta e vitalità cellulari

“sample” = campione

“Wash Buffer” = tampone di lavaggio

“Volume Reduction LOVO 2 Cycles, 10:1 concentration” = riduzione del volume LOVO 2 cicli, concentrazione 10:1

“Min” = minuto

“Formulate 1:1 with cold CS10” = formulare 1:1 con CS10 freddo

“Add IL-2” = aggiungere IL-2

“Satellite Vial Prep” = preparazione di flaconcini satellite

“Cryopreserved Satellite Vial Sample 10 x 0.5mL/vial” = campione in flaconcino satellite crioconservato 10 x 0,5 ml/flaconcino

“Remove QC Release Test Samples & Air (Mycoplasma, Endotoxin, Sterility, Gram Stain, Cell Count, viability, flow, IFN- $\gamma$ , Retain)” = rimuovere i campioni per le prove di rilascio di QC e l'aria (Micoplasma, endotossina, sterilità, colorazione di Gram, conta cellulare, vitalità, flusso, IFN- $\gamma$ ,

conservare)

“Manual Fill 0.5 mL/vial” = riempimento manuale 0,5 ml/flaconcino

“Formulate bulk Product Bag stored at 2-8°C in between processing steps” = formulare una sacca di prodotto sfuso conservata da 2°C a 8°C tra i passaggi di lavorazione

“Aliquot into CS750 cryobags 90-120mL/bag” = aliquotare in criosacche CS750 da 90 a 120 ml/sacca

“Controlled Rate Freeze Preset-6 Profile” = profilo 6 preimpostato di congelamento a velocità controllata

“Visually Inspect” = ispezionare visivamente

“Store in vapor phase LN” = conservare in azoto liquido in fase di vapore

“Ship” = spedire

“REP PD Process PFD Page 3/3” = procedimento PD REP PFD pagina 3/3

TAVOLA 33/136

FIGURA 29

“Tumor arrives” = il tumore arriva

“Day” = giorno

“Supernatant Collection Throughout Pre-REP” = raccolta del surnatante attraverso il pre-REP

“IL-2 Analysis” = analisi di IL-2

“Metabolite Studies” = studi dei metaboliti

“Freeze Cells” = congelare le cellule

“Endpoint Supernatant Collection” = raccolta di surnatante al punto finale

“Cytokine Analysis” = analisi delle citochine

“Extended Assays” = saggi estesi

“ReREP for 7 days” = re-REP per 7 giorni

“Fresh REP Analysis” = analisi di REP fresco

“Fresh ReREP Analysis” = analisi di re-REP fresco

“Cell Count/Viability, Flow Phenotype, Indirect Killing Assay, IFN-g and Granzyme B Production, TCR Sequencing, Cellular Metabolism” =

conta/vitalità cellulare, fenotipo del flusso, saggio indiretto di uccisione, produzione di IFN- $\gamma$  e granzima B, sequenziamento del TCR, metabolismo cellulare

“Thaw Cells” = scongelare le cellule

“Thaw ReREP Analysis” = analisi di re-REP scongelato

“Figure” = figura

TAVOLA 34/136

FIGURA 30

“% of viable cells” = % di cellule vitali

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Figure” = figura

TAVOLA 35/136

FIGURA 31

“Re-REP – Fold expansion” = Re-REP – espansione in termini di numero di volte

“Fold expansion of TIL (Day 7)” = espansione in termini di numero di volte dei TIL (giorno 7)

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Figure” = figura

TAVOLA 36/136

FIGURA 32

“Normal Blood Values” = valori ematici normali

“Glucose” = glucosio

“Glutamine” = glutammina

“Sodium” = sodio

“Potassium” = potassio

“Lactic Acid” = acido lattico

“Ammonia” = ammoniaca

“Figure” = figura

TAVOLA 37/136

FIGURA 33a

“Glucose” = glucosio

“# of days in Pre-REP” = numero di giorni in pre-REP

“Lactate” = lattato

“Potassium” = potassio

“Figure” = figura

TAVOLA 38/136

FIGURA 33b

“L-Glutamine” = L-glutammina

“# of days in Pre-REP” = numero di giorni in pre-REP

“Ammonia” = ammoniaca

“Sodium” = sodio

“Figure” = figura

TAVOLA 39/136

FIGURA 34

“# of days in Pre-REP” = numero di giorni in pre-REP

“Figure” = figura

TAVOLA 40/136

FIGURA 35

“cells/24hrs” = cellule/24 ore

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“Figure” = figura

TAVOLA 41/136

FIGURA 36

“Granzyme B” = granzima B

“cells/24hrs” = cellule/24 ore

“Fresh” = fresco

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“Figure” = figura

TAVOLA 42/136

FIGURA 37

“% Frequency of Live” = % di frequenza di cellule vive

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 43/136

FIGURA 38

“% Frequency of Live” = % di frequenza di cellule vive

“CD56+ cells” = cellule CD56+

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 44/136

FIGURA 39

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 45/136

FIGURA 40

“% Frequency of CD8” = % di frequenza di CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Yes” = sì

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 46/136

FIGURA 41

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 47/136

FIGURA 42

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 48/136

FIGURA 43

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 49/136

FIGURA 44

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 50/136

FIGURA 45

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 51/136

FIGURA 46

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 52/136

FIGURA 47

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 53/136

FIGURA 48

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 54/136

FIGURA 49

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 55/136

FIGURA 50

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 56/136

FIGURA 51

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Yes” = sì

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 57/136

FIGURA 52

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 58/136

FIGURA 53

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 59/136

FIGURA 54

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 60/136

FIGURA 55

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 61/136

FIGURA 56

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Yes” = sì

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 62/136

FIGURA 57

“% Frequency of CD4” = % di frequenza di CD4

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 63/136

FIGURA 58

“% Frequency of CD8” = % di frequenza dei CD8

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh TIL vs Thawed TIL” = TIL freschi vs TIL scongelati

“Yes” = sì

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Fresh TIL” = TIL freschi

“Thawed TIL” = TIL scongelati

“Fresh reREP TIL” = TIL re-REP freschi

“Thawed reREP TIL” = TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

“Mean” = media

TAVOLA 64/136

FIGURA 59

“P815 assay” = saggio P815

“Fresh” = fresco

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“T-Test” = test di t

“P-value” = valore di p

“Summary” = riassunto

“Significant” = significativo

“Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL” = TIL re-REP freschi vs TIL re-REP scongelati

“Figure” = figura

TAVOLA 65/136

FIGURA 60

“Basal OCR” = OCR basale

“Min” = minuto

“Fresh” = fresco

“Fresh ReREP” = re-REP freschi

“Thaw ReREP” = re-REP scongelati

“Overt SRC” = SRC manifesta

“Covert SRC” = SRC nascosta

“Basal ECAR” = ECAR basale

“Glycolytic Reserve” = riserva glicolitica

“Figure” = figura

TAVOLA 66/136

FIGURA 61

“Relative Telomere length” = lunghezza relativa dei telomeri

“Figure” = figura

TAVOLA 67/136

FIGURA 62

“Figure” = figura

“Average Viable Cell count” = conta media delle cellule vitali

“Day” = giorno

“Standard” = standard

“Fragments/condition” = frammenti/condizione

TAVOLA 68/136

FIGURA 63

“Figure” = figura

“Average Viable Cell count” = conta media delle cellule vitali

“Day” = giorno

“Fragments/condition” = frammenti/condizione

TAVOLA 69/136

FIGURA 64a

“Figure” = figura

“Viable Cell count” = conta delle cellule vitali

TAVOLA 70/136

FIGURA 64b

“Figure” = figura

“Viable Cell count” = conta delle cellule vitali

TAVOLA 71/136

FIGURE 65A e 65B

“Figure” = figura

“Total Viable cells” = cellule vitali totali

TAVOLA 72/136

FIGURA 65C

“Figure” = figura

“Pre-REP Cell count” = conta cellulare pre-REP

“Post-REP Cell count” = conta cellulare post-REP

TAVOLA 73/136

FIGURA 66

“Figure” = figura

“CD8 skewing” = inclinazione verso CD8

“Absolute % CD8+ Cells” = % assoluta di cellule CD8+

“Media Condition” = condizione del terreno

TAVOLA 74/136

FIGURA 67

“Figure” = figura

“cells/24hrs” = cellule/24 ore

“Unstimulated” = non stimolato

“Stimulated” = stimolato

TAVOLA 75/136

FIGURA 68

“Excise Tumor” = asportare il tumore

“Or” = o

“Bulk TILs” = TIL non purificati

“Direct to Rapid Expansion” = diretto all’espansione rapida

“Co-Culture TIL and Feeder Cells” = sottoporre a cocoltura TIL e cellule nutritive

“Tumor Fragment Culture (Pre-REP) 11 days” = coltura dei frammenti tumorali (pre-REP) 11 giorni

“Rapid Expansion (REP) 11 days” = espansione rapida (REP) 11 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 76/136

FIGURA 69

“% of Live Cells” = % di cellule vive

“Melanoma” = melanoma

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

“Figure” = figura

TAVOLA 77/136

FIGURA 70

“% of Live Cells” = % di cellule vive

“Melanoma” = melanoma

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

“Figure” = figura

TAVOLA 78/136

FIGURA 71

“% of CD8+” = % di CD8+

“Melanoma” = melanoma

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

“% of CXCR3 (of CD8+)” = % di CXCR3 (di CD8+)

“Lung” = polmone

“Figure” = figura

TAVOLA 79/136

FIGURA 72

“% of CD107a+” = % di CD107a+

“Melanoma” = melanoma

“Unstimulated” = non stimolato

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

“Figure” = figura

TAVOLA 80/136

FIGURA 73a

“Melanoma” = melanoma

“% Vbeta (CD8+ T cells)” = % Vbeta (cellule T CD8+)

“Figure” = figura

TAVOLA 81/136

FIGURA 73b

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

“% Vbeta (CD8+ T cells)” = % Vbeta (cellule T CD8+)

“Figure” = figura

TAVOLA 82/136

FIGURA 74

“Excise Tumor” = asportare il tumore

“≤4.0 cm Diameter” = ≤4.0 cm di diametro

“Express courier from Clinical Site to CMO” = corriere espresso dal sito clinico alla CMO

“Cut into fragments” = tagliare in frammenti

“≤50 Fragments” = ≤50 frammenti

“Ex vivo culture” = coltura ex vivo

“Bulk TILs” = TIL non purificati

“Direct To REP” = diretto al REP

“Co-Culture TIL and Feeder Cells” = sottoporre a cocoltura TIL e cellule nutritive

“Expansion ex vivo scale up” = aumento ex vivo dell’espansione

“Harvest” = raccolta

“LN2 cryopreserved LN-144 infusion product controlled rate freeze” = congelamento a velocità controllata del prodotto di infusione LN-144  
crioconservato in azoto liquido

“Express courier in cryoshipper from CMO to clinical site” = corriere espresso in contenitore per la crioconservazione dalla CMO al sito clinico

“Thaw, Infuse + IL-2 administration” = scongelare, infondere + somministrazione di IL-2

“NMA-LD preconditioning therapy” = terapia di preconditionamento con NMA-LD

“GMP MANUFACTURING FACILITY” = impianto di produzione in accordo con le pratiche di buona fabbricazione

“Tumor Fragment Culture (Pre-REP) 11 days” = coltura dei frammenti tumorali (pre-REP) 11 giorni

“Rapid Expansion (REP) 11 days” = espansione rapida (REP) 11 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 83/136

FIGURA 75

“Figure” = figura

“At Harvest” = alla raccolta

“Viable Cell count” = conta delle cellule vitali

“Cohort” = coorte

“Fold expansion” = espansione in termini di numero di volte

“Fold Expansion of TIL” = espansione in termini di numero di volte dei TIL

TAVOLA 84/136

FIGURA 76

“Figure” = figura

“% Frequency of Live” = % di frequenza di cellule vive

TAVOLA 85/136

FIGURA 77

“Figure” = figura

“CD8 subsets” = sottotipi CD8

“% Frequency of Live” = % di frequenza di cellule vive

“CD4 subsets” = sottotipi CD4

TAVOLA 86/136

FIGURA 78

“Figure” = figura

“CD27 Expression” = espressione di CD27

“% Frequency of Parent” = % di frequenza del genitore

“CD28 Expression” = espressione di CD28

TAVOLA 87/136

FIGURA 79

“Figure” = figura

“Relative Telomere length” = lunghezza relativa dei telomeri

TAVOLA 88/136

FIGURA 80

“Figure” = figura

“Viable cells” = cellule vitali

“24hrs” = 24 ore

TAVOLA 89/136

FIGURA 81

“Figure” = figura

“# of Unique CDR3” = # di CDR3 uniche

“Diversity Score” = punteggio di diversità

TAVOLA 90/136

FIGURA 82

“Excise Tumor” = asportare il tumore

“≤4.0 cm Diameter” = ≤4.0 cm di diametro

“≤96hrs” = ≤96 ore

“8-27 mm<sup>3</sup> Fragments” = frammenti da 8 a 27 mm<sup>3</sup>

“≤50 Fragments” = ≤50 frammenti

“Closed single use bioreactor” = bioreattore monouso chiuso

“Bulk TILs” = TIL non purificati

“Direct To Rapid Expansion” = diretto all’espansione rapida

“Co-Culture TIL and Feeder Cells” = sottoporre a cocoltura TIL e cellule nutritive

“Scale Up” = aumento

“Semi-automated Harvest/Wash/Formulate/Aliquot” = raccolta semiautomatizzata/lavare/formulare/aliquotare

“LN2-freeze in aliquots” = congelamento in azoto liquido in aliquote

“Scheduled Cryoshipper” = contenitore per la crioconservazione programmato

“Thaw And Infuse” = scongelare e infondere

“GMP MANUFACTURING FACILITY” = impianto di produzione in accordo con le pratiche di buona fabbricazione

“Tumor Fragment Culture (Pre-REP) 11 days” = coltura dei frammenti tumorali (pre-REP) 11 giorni

“Rapid Expansion (REP) 11 days” = espansione rapida (REP) 11 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 91/136

FIGURA 83

“Figure” = figura

“Process 1C: 43-55 Days for Steps A-E” = procedimento 1C: da 43 a 55 giorni per i passaggi da A a E

“Process 2A: about 22 days from Steps A-E” = procedimento 2A: circa 22 giorni dai passaggi da A a E

“STEP” = passaggio

“Obtain Patient Tumor Sample” = ottenere il campione tumorale del paziente

“Fragmentation and First Expansion” = frammentazione e prima espansione

“11 days to 21 days” = da 11 giorni a 21 giorni

“3 days to 14 days” = da 3 giorni a 14 giorni

“First Expansion to Second Expansion Transition” = transizione dalla prima espansione alla seconda espansione

“Optional Storage until Selection” = conservazione facoltativa fino alla selezione

“No Storage and Closed System” = nessuna conservazione e sistema chiuso

“Second Expansion” = seconda espansione

“IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells” = IL-2, OKT-3, e cellule nutritive presentanti l'antigene

“Optionally repeat one or more times” = ripetere facoltativamente una o più volte

“Closed System” = sistema chiuso

“Harvest TILs from Step D” = raccogliere i TIL dal passaggio D

“Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag” = formulazione e/o trasferimento finale alla sacca per infusione

“Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)” = formulazione e/o trasferimento finale alla sacca per infusione  
(crioconservare facoltativamente)

TAVOLA 92/136

FIGURA 84

“Figure” = figura

“Process Step” = passaggio del procedimento

“Process 1C Embodiment” = forma di realizzazione del procedimento 1C

“Process 2A Embodiment” = forma di realizzazione del procedimento 2A

“Advantages” = vantaggi

“4 Fragments per 10 G-REX-10 flasks” = 4 frammenti per 10 palloni G-REX-10

“11-21 day duration” = durata da 11 a 21 giorni

“Pre-REP TIL are frozen until phenotyped for selection then thawed to proceed to the REP (-day 30)” = i TIL pre-REP vengono congelati fino alla fenotipizzazione per la selezione quindi scongelati per procedere al REP

“REP requires >40x10<sup>6</sup> TIL” = il REP richiede >40x10<sup>6</sup> TIL

“6 G-REX 100M flasks on REP day 0” = 6 palloni G-REX 100M al giorno 0 del REP

“Split to 18-36 flasks on REP day 7” = dividere in da 18 a 36 palloni al giorno 7 del REP

“14 day duration” = durata di 14 giorni

“Harvest” = raccolta

“TIL harvested via centrifugation” = TIL raccolti mediante centrifugazione

“Final Formulation” = formulazione finale

“Fresh Product in Hypothermosol” = prodotto fresco in Hypothermosol

“Single Infusion Bag” = singola sacca per infusione

“Limited shipping stability” = stabilità limitata di spedizione

“Overall Estimated Process Time” = tempo totale stimato del procedimento

“43-55 days” = da 43 a 55 giorni

“40 Fragments per 1 G-REX 100M flask” = 40 frammenti per 1 pallone G-REX 100M

“11 day duration” = durata di 11 giorni

“Pre-REP TIL directly move to REP on day 11” = i TIL pre-REP vanno direttamente al REP il giorno 11

“REP requires 25-200x106 TIL” = il REP richiede da 25x106 a 200x106 TIL

“1 G-REX-500M flask on day 11” = 1 pallone G-REX-500M al giorno 11

“25-200x106 TIL and 5x109 PBMC feeders on day 11” = da 25x106 a 200x106 TIL e 5x109 PBMC nutritivi al giorno 11

“Split to  $\leq 6$  G-REX-500M flasks on day 16” = dividere in  $\leq 6$  palloni G-REX-500M al giorno 16

“TIL harvested via LOVO automated cell washing system” = TIL raccolti attraverso il sistema di lavaggio cellulare automatizzato LOVO

“Cryopreserved product in PlasmaLyte-A + 1% HSA and CS10 stored in LN2” = prodotto crioconservato in PlasmaLyte-A + HSA all'1% e CS10 conservato in azoto liquido

“Multiple aliquots” = aliquote multiple

“Longer shipping stability” = stabilità più lunga di spedizione

“22 days” = 22 giorni

“Increased tumor fragments per flask” = frammenti tumorali aumentati per pallone

“Shortened culture time” = tempo di coltura accorciato

“Reduced number of steps” = numero ridotto di passaggi

“Amenable to closed system” = disponibile per un sistema chiuso

“Shortened pre-REP-to-REP process” = procedimento da pre-REP a REP accorciato

“Eliminated phenotyping selection” = eliminata la selezione fenotipica

“Shorter REP duration” = durata inferiore del REP

“Closed system transfer of TIL between flasks” = trasferimento a sistema chiuso dei TIL tra i palloni

“Closed system media exchanges” = scambi di terreno a sistema chiuso

“Automated cell washing” = lavaggio cellulare automatizzato

“Closed system” = sistema chiuso

“Reduced loss of product during wash” = ridotta perdita di prodotto durante il lavaggio

“Shipping flexibility” = flessibilità di spedizione

“Flexible patient scheduling” = programmazione flessibile del paziente

“More timely release testing” = prova di rilascio più puntuale

“Faster turnaround to patient” = conversione più rapida al paziente

TAVOLA 93/136

FIGURA 85

“Figure” = figura

“Potency” = potenza

“Purity” = purezza

“Identity” = identità

“Key critical quality attributes” = attributi critici chiave di qualità

TAVOLA 94/136

FIGURE 86A E 86B

“Non-T-cell” = cellula non T

“T-cell” = cellula T

“Figure” = figura

“% of CD45+CD3+” = % di CD45+CD3+

TAVOLA 95/136

FIGURA 86C

“Non-T-cell” = cellula non T

“Non-NK/B-cell” = cellula non NK/B

“Non-lymphocyte” = non linfocita

“NK cells” = cellule NK

“B-cells” = cellule B

“Figure” = figura

TAVOLA 96/136

FIGURE 87A E 87B

“% of CD3+CD4+ T-cell subset” = % di sottotipo di cellule T CD3+CD4+

“Naive” = vergini

“% of CD3+CD8+ T-cell subset” = % di sottotipo di cellule T CD3+CD8+

“Figure” = figura

TAVOLA 97/136

FIGURE 88A e 88B

“% of MCSP+” = % di MCSP+

“Tumor” = tumore

“Figure” = figura

“Isotype control” = controllo isotipico

TAVOLA 98/136

FIGURA 89A E 89B

“MCSP+ cells” = cellule MCSP+

“1 to 10” = da 1 a 10

“1 to 100” = da 1 a 100

“1 to 1000” = da 1 a 1000

“Dilution” = diluizione

“Figure” = figura

“AV” = media

“Upper limit” = limite superiore

“Lower limit” = limite inferiore

TAVOLA 99/136

FIGURE 90A e 90B

“Dilution” = diluizione

“Range (upper-lower)” = intervallo (superiore-inferiore)

“Figure” = figura

“Number of MCSP+” = numero di MCSP+

“AV” = media

TAVOLA 100/136

FIGURE 91A e 91B

“Number of MCSP+ events” = numero di eventi MCSP+

“Detection limit” = limite di rilevamento

“TIL products” = prodotti di TIL

“Figure” = figura

TAVOLA 101/136

FIGURA 92

“Unstimulated” = non stimolato

“Stimulated” = stimolato

“Figure” = figura

TAVOLA 102/136

FIGURA 93

“Excise Tumor” = asportare il tumore

“Fragmentation” = frammentazione

“Ex vivo culture” = coltura ex vivo

“Co-Culture TIL and Feeder Cells” = sottoporre a cocoltura TIL e cellule nutritive

“Expansion ex vivo” = espansione ex vivo

“Harvest” = raccolta

“LN2 cryopreserved LN-144 infusion” = crioconservato in azoto liquido infusione di LN-144

“Thaw, Infuse + IL-2 administration” = scongelare, infondere + somministrazione di IL-2

“NMA-LD preconditioning therapy” = terapia di preconditionamento con NMA-LD

“Tumor Fragment Culture (Pre-REP) 11 days” = coltura dei frammenti tumorali (pre-REP) 11 giorni

“Rapid Expansion (REP) 11 days” = espansione rapida (REP) 11 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 103/136

FIGURA 94

“Figure” = figura

“Process step” = passaggio di procedimento

“Impact” = impatto

“Fragment Culture” = coltura di frammenti

“≤21 days, multiple bioreactors, multiple operator interventions” = ≤21 giorni, bioreattori multipli, interventi multipli degli operatori

“≤11 days, single closed bioreactor, no intervention” = ≤11 giorni, singolo bioreattore chiuso, nessun intervento

“Shortens culture, reduces interventions” = accorcia la coltura, riduce gli interventi

“TIL selection” = selezione di TIL

“IL-2 expanded TIL cryopreserved, tested, selection based on phenotype, thaw, rest, co-culture” = TIL espansi con IL-2 crioconservati, testati, selezionati sulla base del genotipo, scongelare, riposo, cocoltura

“Bulk TIL direct to co-culture” = TIL non purificati diretti alla cocoltura

“Reduces steps, eliminates testing, increases clonal diversity” = riduce i passaggi, elimina gli esami, aumenta la diversità clonale

“Harvest/Wash” = raccolta/lavaggio

“Manual volume reduction and harvest” = riduzione del volume e raccolta manuali

“Manual wash and concentration” = lavaggio e concentrazione manuali

“Closed semi-automated volume reduction and harvest” = riduzione del volume e raccolta semiautomatizzate chiuse

“Automated wash and concentration” = lavaggio e concentrazione automatizzati

“Reduces operator interventions, reduces processing time, maintains functionally closed system” = riduce gli interventi degli operatori, riduce il tempo di processamento, mantiene un sistema funzionalmente chiuso

“Formulation” = formulazione

“Fresh hypothermic product” = prodotto ipotermico fresco

“Cryopreserved product” = prodotto crioconservato

“Allows for global trials through increased flexibility in shipping and patient scheduling” = permette gli studi globali attraverso aumentata flessibilità nella spedizione e nella programmazione del paziente

“Manufacturing time” = tempo di produzione

“38 day process time” = tempo di procedimento di 38 giorni

“22 day process time” = tempo di procedimento di 22 giorni

“Turnaround to patient, clean room throughput, lower cost of goods” = consegna al paziente, produttività della camera sterile, costo inferiore dei beni

TAVOLA 104/136

FIGURE 95A E 95B

“Figure” = figura

“Viable Cell count” = conta delle cellule vitali

“Growth rate (days<sup>-1</sup>)” = velocità di crescita (giorni<sup>-1</sup>)

TAVOLA 105/136

FIGURE 95C e 96A

“Figure” = figura

“Viability” = vitalità

“% of viable cells” = % di cellule vitali

“Fresh” = fresco

“Thaw” = scongelato

“% Frequency of Live” = % di frequenza di cellule vive

TAVOLA 106/136

FIGURE 96B E 96C

“Figure” = figura

“CD27 Expression” = espressione di CD27

“% Frequency of Parent” = % di frequenza di un genitore

“CD28 Expression” = espressione di CD28

TAVOLA 107/136

FIGURE 97 E 98

“Figure” = figura

“Relative Telomere length” = lunghezza relativa dei telomeri

“Viable cells” = cellule vitali

“24hrs” = 24 ore

TAVOLA 108/136

FIGURE 99A E 99B

“Figure” = figura

“Diversity Score” = punteggio di diversità

“# of Unique CDR3” = # di CDR3 uniche

TAVOLA 109/136

FIGURA 100

“Figure” = figura

“D” = giorno

“Excise tumor” = asportare il tumore

“Irradiated PBMCs” = PBMC irradiate

FIGURA 101

“Figure” = figura

“Tumor Histology” = istologia del tumore

“Melanoma” = melanoma

“Lung” = polmone

“Colorectal” = coloretale

“Cervical” = cervicale

“Pancreatic” = pancreatico

“Glioblastoma” = glioblastoma

“Triple Negative Breast” = triplo negativo della mammella

“# of studies demonstrating >20% enhancement of growth using IL-2/IL-15/IL-21 (compared to IL-2)” = # di studi che dimostrano un aumento della crescita >20% utilizzando IL-2/IL-15/IL-21 (rispetto a IL-2)

TAVOLA 110/136

FIGURE 102A E 102B

“Figure” = figura

“Melanoma” = melanoma

“% of Live Cells” = % di cellule vive

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

TAVOLA 111/136

FIGURE 103A E 103B

“Figure” = figura

“Melanoma” = melanoma

“% of Live Cells” = % di cellule vive

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

TAVOLA 112/136

FIGURE 104A E 104B

“Figure” = figura

“Melanoma” = melanoma

“% of CD8+” = % di CD8+

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

TAVOLA 113/136

FIGURE 105A E 105B

“Figure” = figura

“Melanoma” = melanoma

“% of CD107a+” = % di CD107a+

“Unstimulated” = non stimolato

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

TAVOLA 114/136

FIGURA 105C

“Figure” = figura

“Unstimulated” = non stimolato

TAVOLA 115/136

FIGURA 106A

“Figure” = figura

“Melanoma” = melanoma

“% Vbeta (CD8+ T cells)” = % di Vbeta (cellule T CD8+)

TAVOLA 116/136

FIGURA 106B

“Figure” = figura

“Lung Carcinoma” = carcinoma polmonare

“% Vbeta (CD8+ T cells)” = % di Vbeta (cellule T CD8+)

TAVOLA 117/136

FIGURA 107

“Excise Tumor” = asportare il tumore

“Fragmentation” = frammentazione

“Ex vivo culture” = coltura ex vivo

“Bulk TILs” = TIL non purificati

“Co-Culture TIL and Feeder Cells” = sottoporre a cocoltura TIL e cellule nutritive

“Expansion ex vivo” = espansione ex vivo

“Harvest” = raccolta

“LN2 cryopreserved LN-144 infusion” = crioconservato in azoto liquido infusione di LN-144

“Thaw, Infuse + IL-2 administration” = scongelare, infondere + somministrazione di IL-2

“NMA-LD preconditioning therapy” = terapia di preconditionamento con NMA-LD

“GMP MANUFACTURING FACILITY” = impianto di produzione in accordo con le pratiche di buona fabbricazione

“Tumor Fragment Culture (Pre-REP) 11 days” = coltura dei frammenti tumorali (pre-REP) 11 giorni

“Rapid Expansion (REP) 11 days” = espansione rapida (REP) 11 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 118/136

FIGURA 108

“Figure” = figura

“Unresectable or Metastatic Melanoma Progressed after Prior Anti-PD-1 therapy and, if BRAF mutant, after BRAF inhibitor” = melanoma non rimovibile o metastatico progredito dopo una precedente terapia anti-PD-1 e, se mutante in BRAF, dopo un inibitore di BRAF

“Cohort 1: Non-Cryopreserved TIL Product” = coorte 1: prodotto dei TIL non crioconservati

“Cohort 2: Cryopreserved TIL Product” = coorte 2: prodotto dei TIL crioconservati

“Cohort 3: TIL Re-treatment” = coorte 3: ritrattamento dei TIL

TAVOLA 119/136

FIGURA 109

“Characteristic” = caratteristica

“Historical Cohort” = coorte storica

“Cohort” = coorte

“Gender” = genere

“Male” = maschio

“Female” = femmina

“Age” = età

“Median” = mediana

“Min” = minimo

“Max” = massimo

“Prior therapies” = terapie precedenti

“Mean # prior systemic therapies” = # medio di terapie sistemiche precedenti

“Target Lesion Sum of Diameter” = somma dei diametri della lesione bersaglio

“Mean” = media

“Baseline ECOG score” = punteggio di ECOG basale

“BRAF Status” = stato di BRAF

“Mutated” = mutato

“Wild Type” = selvatico

“Baseline LDH” = LDH basale

“1-2 times” = da 1 a 2 volte

“Number of Target & Non-Target Lesions (at Baseline)” = numero di lesioni bersaglio e non bersaglio (al basale)

“Figure” = figura

TAVOLA 120/136

FIGURA 110

“Preferred Term” = termine preferito

“Historical Cohort” = coorte storica

“Cohort” = coorte

“Any Grade” = qualsiasi grado

“Grade” = grado

“Number of patients reporting at least one Treatment-Emergent AE” = numero di pazienti che riportano almeno un AE emergente dal trattamento

“Nausea” = nausea

“Platelet count decreased” = conta piastrinica diminuita

“Anaemia” = anemia

“Neutrophil count decreased” = conta neutrofilica diminuita

“Febrile neutropenia” = neutropenia febbrile

“White blood count decreased” = conta delle cellule bianche del sangue diminuita

“Chills” = brividi

“Diarrhoea” = diarrea

“Fatigue” = fatica

“Vomiting” = vomito

“Constipation” = costipazione

“Decreased appetite” = appetito diminuito

“Headache” = mal di testa

“Hypocalcaemia” = ipocalcemia

“Hypokalaemia” = ipocalcemia

“Hypophosphataemia” = ipofosfemia

“Hypotension” = ipotensione

“Lymphocyte count decreased” = conta linfocitaria diminuita

“Nasal Congestion” = congestione nasale

“Pyrexia” = febbre

“Cough” = tosse

“Oedema peripheral” = edema periferico

“Pruritus” = prurito

“Notes: Adverse events are coded by MedDRA version 18.1” = note: gli eventi avversi sono codificati da MedDRA versione 18.1

“Patients with multiple events for a given preferred term are counted only once using the maximum grade under each preferred term” = i pazienti con multipli eventi per un dato termine preferito vengono contati una volta sola utilizzando il grado massimo sotto ciascun termine preferito

“Events are sorted by decreasing frequency of preferred term under SOC per any grade” = gli eventi vengono classificati diminuendo la frequenza del termine preferito sotto SOC per qualsiasi grado

“Treatment-Emergent Adverse Events refer to all AEs starting on or after the first dose date of pre-treatment chemotherapy (Fludarabine and Cyclophosphamide) up to the last dose of IL2 + 30 days” = gli eventi avversi emergenti dal trattamento si riferiscono a tutti gli eventi avversi che iniziano con o dopo la data della prima dose di chemioterapia di pretrattamento (fludarabina e ciclofosfamide) fino all'ultima dose di IL2 + 30 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA 121/136

FIGURA 111

“Figure” = figura

“Best Overall Response” = migliore risposta complessiva

“Change from Baseline” = variazione dal basale

“Patient Number” = numero del paziente

FIGURA 112

“Figure” = figura

“Patients” = pazienti

“Time (months) from first dose of lymphodepletion” = tempo (mesi) dalla prima dose di linfodeplezione

“PR start” = inizio di PR

“Ongoing response” = risposta in corso

TAVOLA 122/136

FIGURA 113

“Percent Change” = variazione percentuale

“Day” = giorno

“LN-144 infusion” = infusione di LN-144

“Screening” = esame

“Visit” = visita

“Figure” = figura

TAVOLA 123/136

FIGURA 114

“Day” = giorno

“Cohort” = coorte

“Figure” = figura

TAVOLA 124/136

FIGURA 115

“Day” = giorno

“Cohort” = coorte

“Figure” = figura

TAVOLA 125/136

FIGURA 116

“Characteristic” = caratteristica

“Cohort” = coorte

“Gender” = genere

“Male” = maschio

“Female” = femmina

“Age” = età

“Median” = mediana

“Min” = minimo

“Max” = massimo

“Prior therapies” = terapie precedenti

“Mean # prior systemic therapies” = # medio di terapie sistemiche precedenti

“Target Lesion Sum of Diameter” = somma dei diametri della lesione bersaglio

“Mean” = media

“Baseline ECOG” = ECOG basale

“BRAF Status” = stato di BRAF

“Mutated” = mutato

“Wild Type” = selvatico

“Unknown” = sconosciuto

“Baseline LDH” = LDH basale

“1-2 times” = da 1 a 2 volte

“>2 times” = >2 volte

“Number of Target & Non-Target Lesions (at Baseline)” = numero di lesioni bersaglio e non bersaglio (al basale)

“Cohort 2 has: 3.6 median prior therapies, high tumor burden at baseline as reflected by 140 mm sum of diameters for target lesions” = la coorte 2 ha: una mediana di 3,6 terapie precedenti, un elevato carico tumorale al basale come riflesso da una somma dei diametri di 140 mm per le lesioni bersaglio

“Figure” = figura

TAVOLA 126/136

FIGURA 117

“Preferred Term” = termine preferito

“Cohort” = coorte

“Any Grade” = qualsiasi grado

“Grade” = grado

“Number of patients reporting at least one Treatment-Emergent AE” = numero di pazienti che riportano almeno un AE emergente dal trattamento

“Pyrexia” = piressia

“Anaemia” = anemia

“Neutrophil count decreased” = conta neutrofilica diminuita

“Platelet count decreased” = conta piastrinica diminuita

“Febril neutropenia” = neutropenia febbrile

“Fatigue” = fatica

“Chills” = brividi

“Nausea” = nausea

“White blood count decreased” = conta delle cellule bianche del sangue diminuita

“Lymphocyte count decreased” = conta linfocitaria diminuita

“Diarroea” = diarrea

“Decreased appetite” = appetito diminuito

“Notes: Patients with multiple events for a given preferred term are counted only once using the maximum grade under each preferred term.

Treatment-Emergent Adverse Events refer to all AEs starting on or after the first dose date of pre-treatment chemotherapy (Fludarabine and Cyclophosphamide) up to the last dose of IL2 + 30 days” = i pazienti con multipli eventi per un dato termine preferito vengono contati una volta sola utilizzando il grado massimo sotto ciascun termine preferito. Gli eventi avversi emergenti dal trattamento si riferiscono a tutti gli eventi avversi che iniziano con o dopo la data della prima dose di chemioterapia di pretrattamento (fludarabina e ciclofosfamide) fino all’ultima dose di IL2 + 30 giorni

“Figure” = figura

TAVOLA

127/136

FIGURA 118

“Figure” = figura

“Patient Number” = numero del paziente

“PR start” = inizio di PR

“Ongoing follow-up without PD” = follow-up in corso senza PD

“Progression” = progressione

“Time (months) since Cy/Flu infusion (lymphodepletion)” = tempo (mesi) dall’infusione di Cy/Flu (linfodeplezione)

TAVOLA 128/136

FIGURA 119

“Figure” = figura

“Best Overall Response” = migliore risposta complessiva

“% Change from Baseline” = % di variazione dal basale

“Patient Number” = numero del paziente

TAVOLA 129/136

FIGURA 120

“Figure” = figura

“Response” = risposta

“Patients” = pazienti

“Objective Response Rate” = tasso di risposta oggettivo

“Disease Control Rate” = tasso di controllo della malattia

“Partial Response” = risposta parziale

“Stable Disease” = malattia stabile

“Progressive Disease” = malattia progressiva

“Non-Evaluable” = non valutabile

TAVOLA 130/136

FIGURA 121

“Pre-Treatment” = pretrattamento

“18 wks Post-Treatment” = 18 settimane dopo il trattamento

“Lt low. quad. abdom.” = quadrante addominale inferiore sinistro

“wk” = settimane

“Lt upper. quad. abdom.” = quadrante addominale superiore sinistro

“Lt renal” = renale sinistro

“Rt femoral” = femorale destro

“short axis” = asse corto

“Figure” = figura

TAVOLA 131/136

FIGURA 122

“Figure” = figura

“Fold induction” = induzione in termini di numero di volte

“No Activity” = nessuna attività

“Activity” = attività

TAVOLA 132/136

FIGURA 123

“Day” = giorno

“Figure” = figura

TAVOLA 133/136

FIGURA 124

“Day” = giorno

“Figure” = figura

TAVOLA 134/136

FIGURA 125

“Day” = giorno

“Figure” = figura

TAVOLA 135/136

FIGURA 126

“Day” = giorno

“Figure” = figura

TAVOLA 136/136

FIGURA 127

“Cervical Carcinoma” = carcinoma cervicale

“Infusion” = infusione

“# cells infused” = # di cellule infuse

“Response day” = giorno di risposta

“9-Aug-17” = 9 agosto 17

“19-Sep-17” = 19 settembre 17

“31-May-17” = 31 maggio 17

“20-Jun-17” = 20 giugno 17

“1-Aug-17” = 1 agosto 17

“14-Sep-17” = 14 settembre 17

“03-Nov-17” = 03 novembre 17

“07-Nov-17” = 07 novembre 17

“08-Nov-17” = 08 novembre 17

“bil” = miliardi

“needs confirmation” = necessita di conferma

“discon.” = discontinuato

“response at 6 months” = risposta a 6 mesi

“response at 9 months” = risposta a 9 mesi

“response at 4 months” = risposta a 4 mesi

“passed away” = deceduto

“Median prior therapies for HNSCC: 4, all have had poor anti-PD-1. The data is live and subject to change.” = mediana delle terapie precedenti per HNSCC: 4, tutte avevano avuto poco anti-PD-1. Il dato è vivo e soggetto a cambiamento.

“Figure” = figura

\* \* \* \* \*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

  
Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Process 2A-22 Days Process, 2-3 Days Harvest/Ship

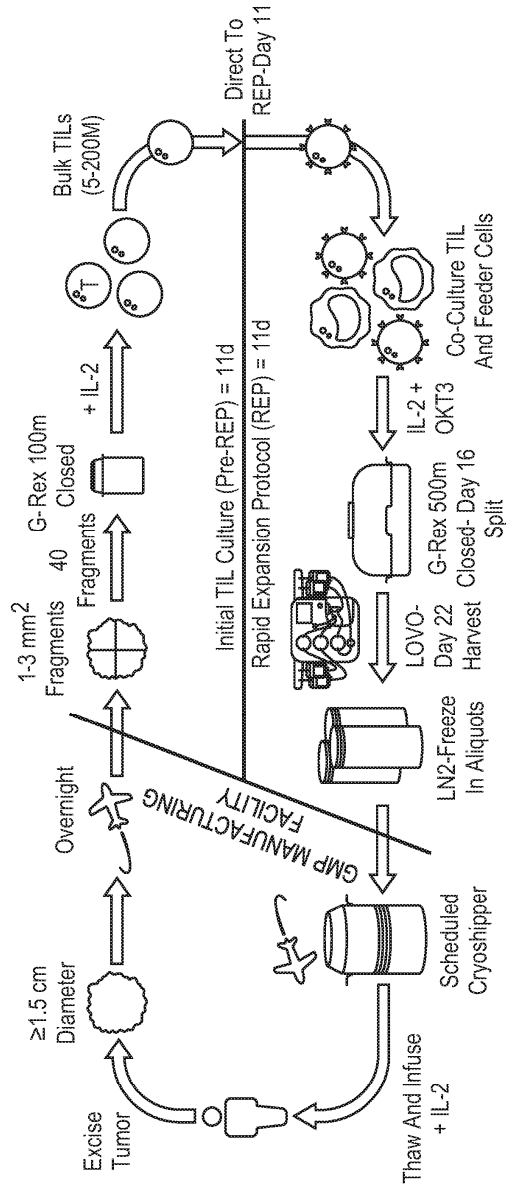


Figure 1

Process Development

Step	Current Process-1C	New Process-2A	Impact
1	4 Fragments/10 G-Rex 10-21 Days	40 Fragments/1-G-Rex 100 CS- (x2?) 11 Days	Increases Tumor Sample/Container, Shortens Culture, Reduces Steps, Amenable To Closed System
2	PreREP Freeze-> Testing -> Thaw- ~Day 27- >40e6TIL	Direct To REP- Day 11- <200e6	Shorten Process, Reduces Steps, Eliminates Testing
3	36 G-Rex 100-~Day 30 >5e6TIL - Split ~Day 36	4-5 G-Rex 500CS- TIL- Split Day 16	Reduces Steps, Closed System, Shorter REP
4	Harvest Day ~43+ Harvesting By Centrifugation	Harvest Day 22 LOVO-Automated Cell Washer	Reduces Steps, Automated, Closed System
5	Fresh Product- Hypothermosol-Single Infusion Bag	Cryopreserved Product-CS10 In LN <sub>2</sub> , Multiple Aliquots	Shipping Flexibility, Patient Scheduling, Easier Release Testing, Global Trials
6	43+ Day Process Time	22 Day Process Time	Turnaround To Patient, Clean Room Throughput, COGs

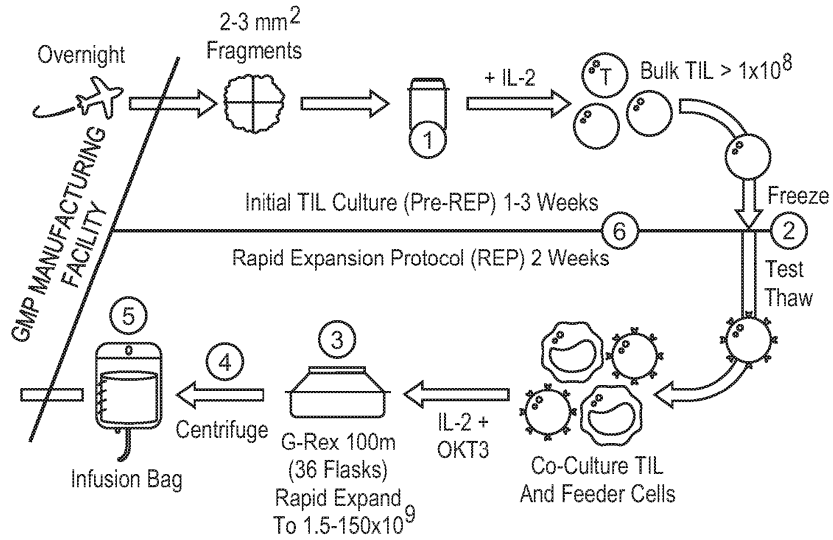


Figure 2

Timeline- Process 1C- Current process

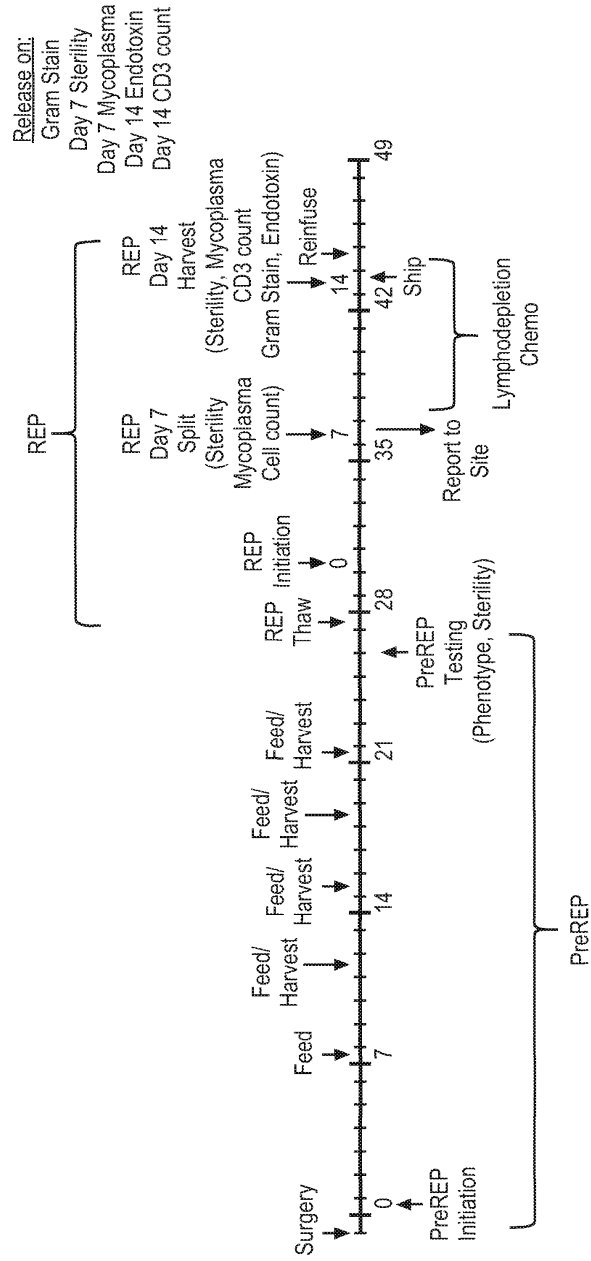


Figure 3

TIL Therapy Timeline- v2A- Day 16 REP >250e6

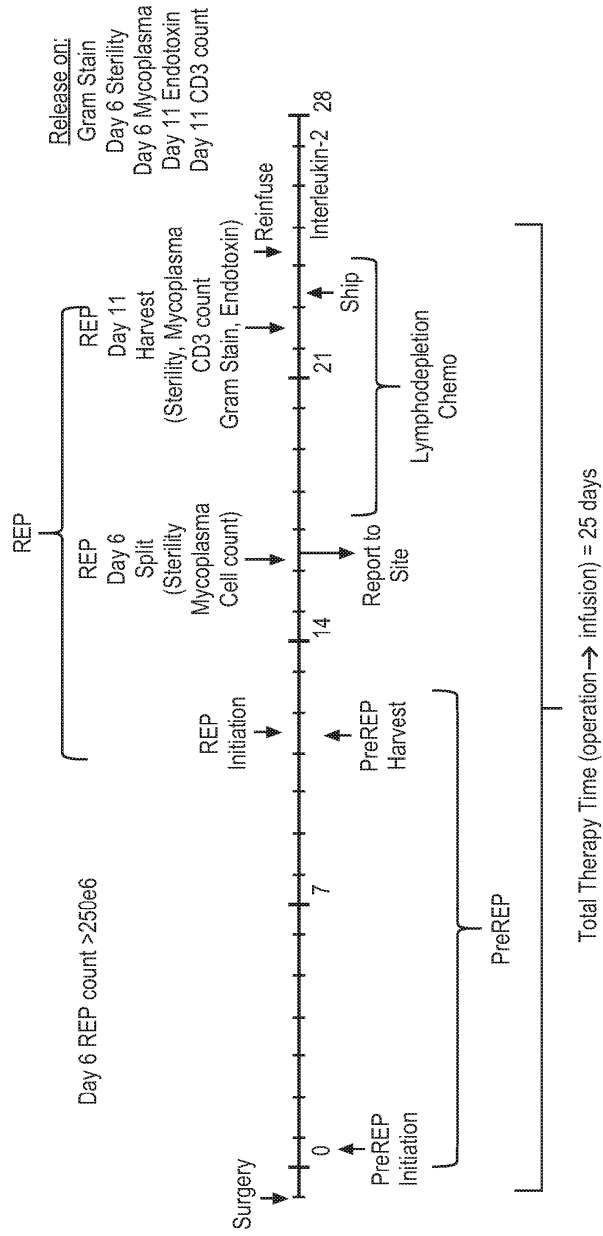


Figure 4

TIL Therapy Timeline- v2A- Day 16 REP >250e6

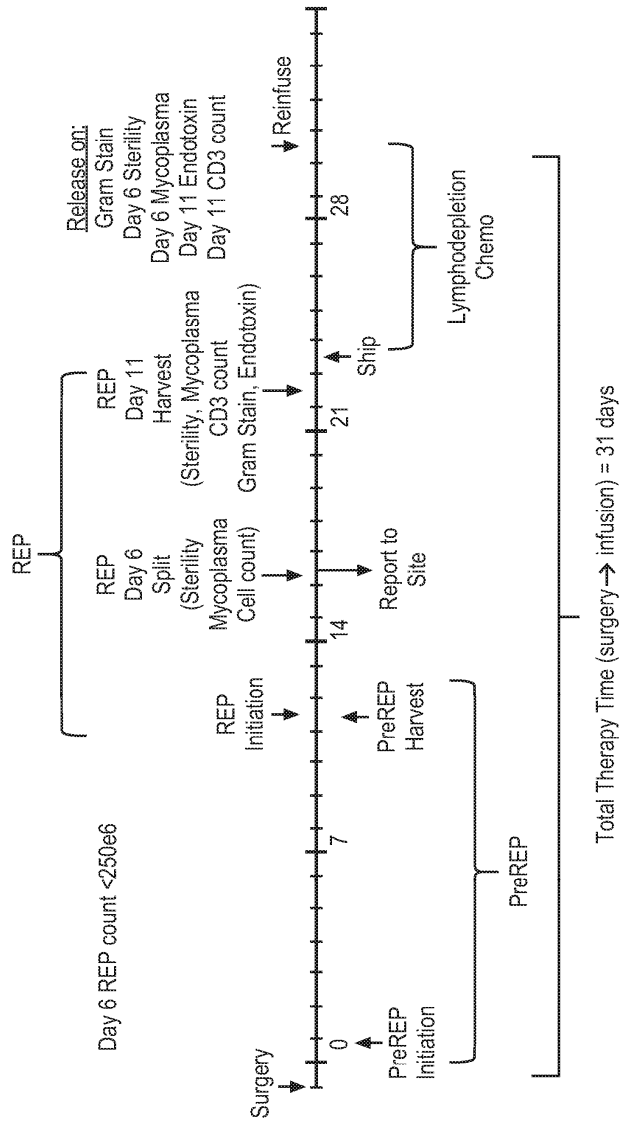


Figure 5

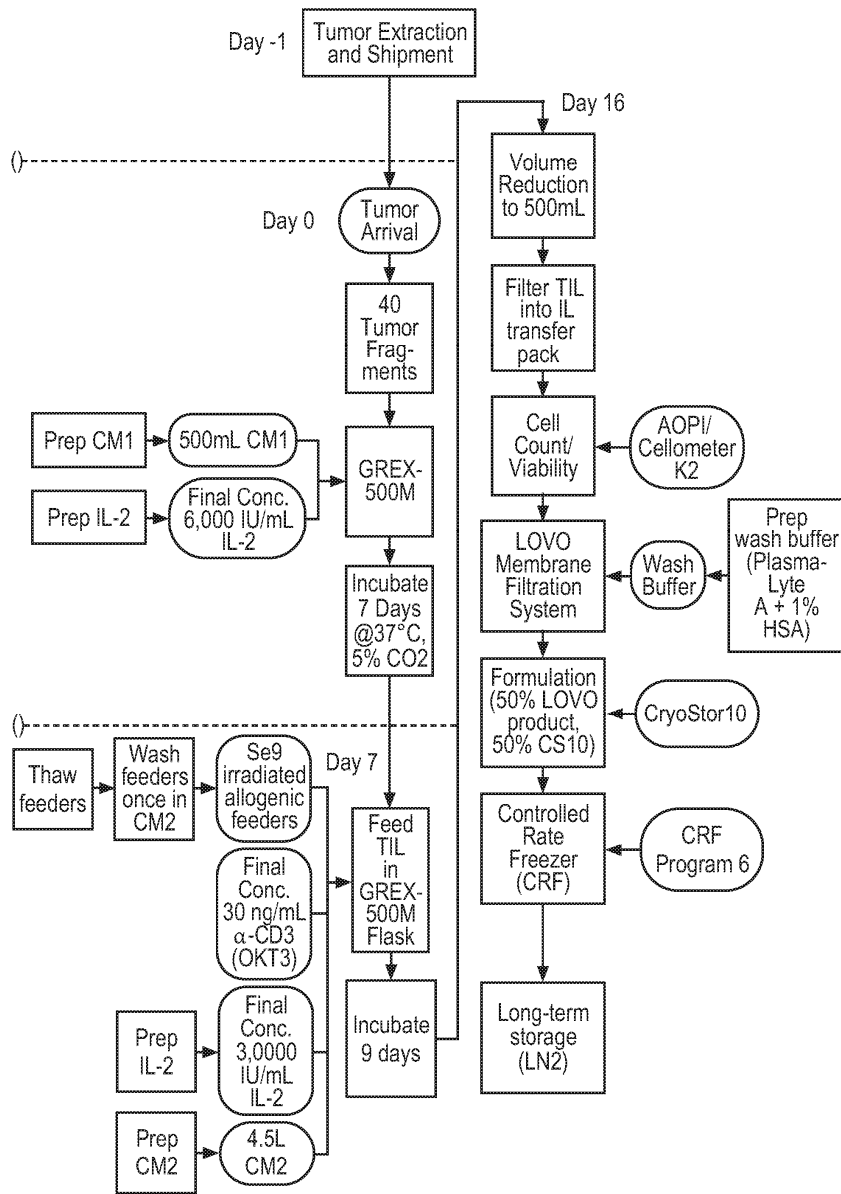
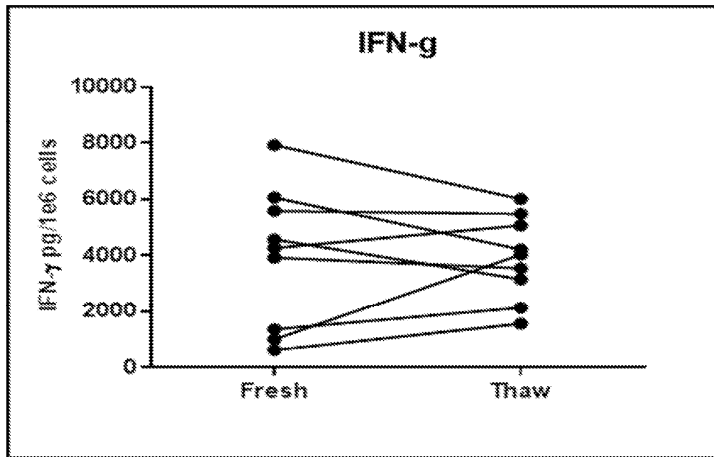


Figure 6

Figure 7

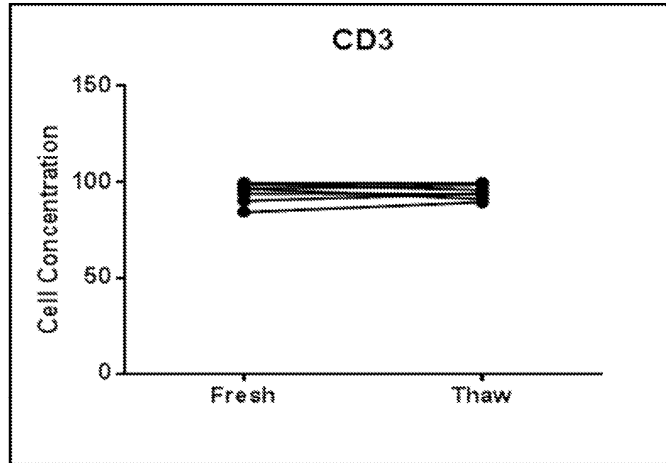
P value	0.9797
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.02626 df=8
Number of pairs	9



How effective was the pairing?  
Correlation coefficient (r)  
P value (one tailed)  
P value summary  
Was the pairing significantly effective?

Figure 8

P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.8479 df=7
Number of pairs	8

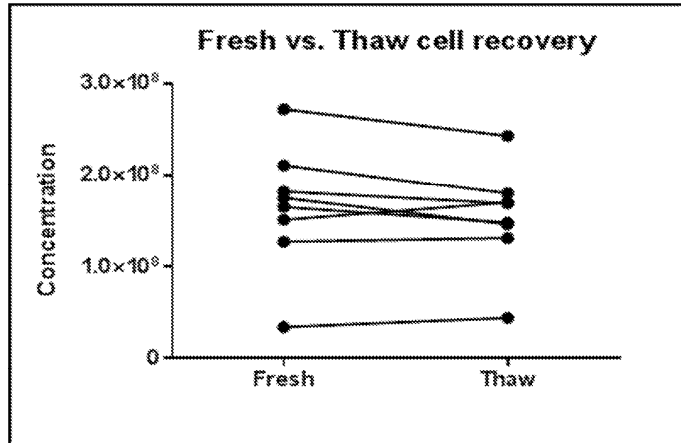


How effective was the pairing?	0.9711
Correlation coefficient (r)	< 0.0001
P value (one tailed)	****
P value summary	Yes
Was the pairing significantly effective?	Yes

**Figure 9**

P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.568 df=7
Number of pairs	

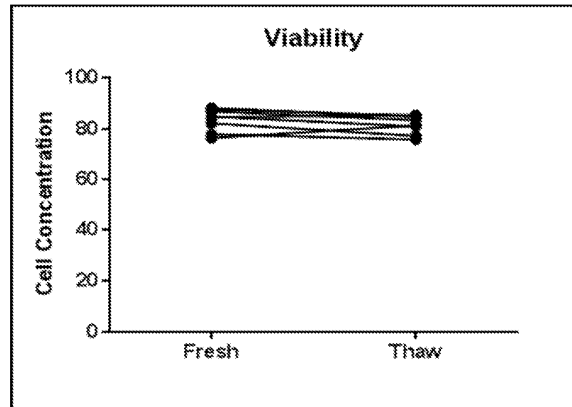
8



How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0.7448
P value (one tailed)	0.017
P value summary	*
Was the pairing significantly effective?	Yes

**Figure 10**

P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.596 df=7
Number of pairs	8



How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0.6932
P value (one tailed)	0.0283
P value summary	*
Was the pairing significantly effective?	Yes

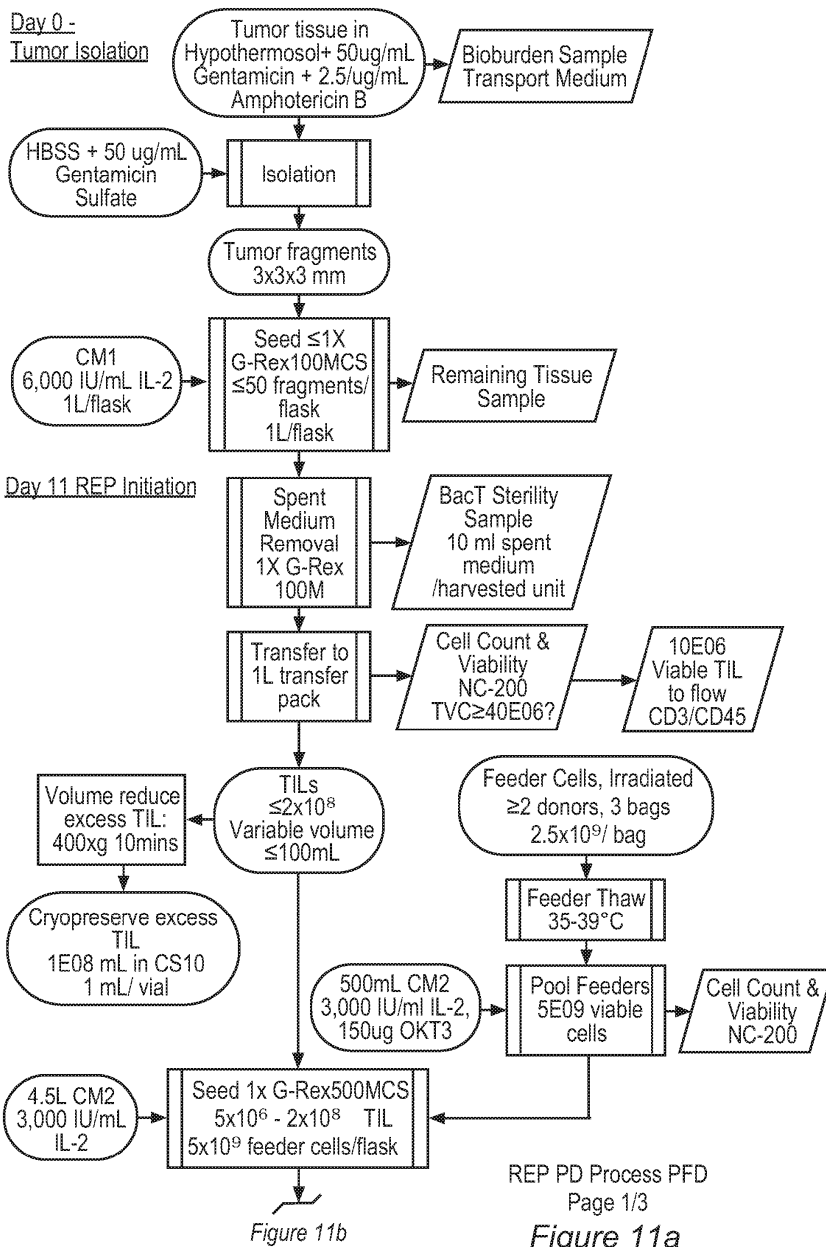


Figure 11b

Figure 11a

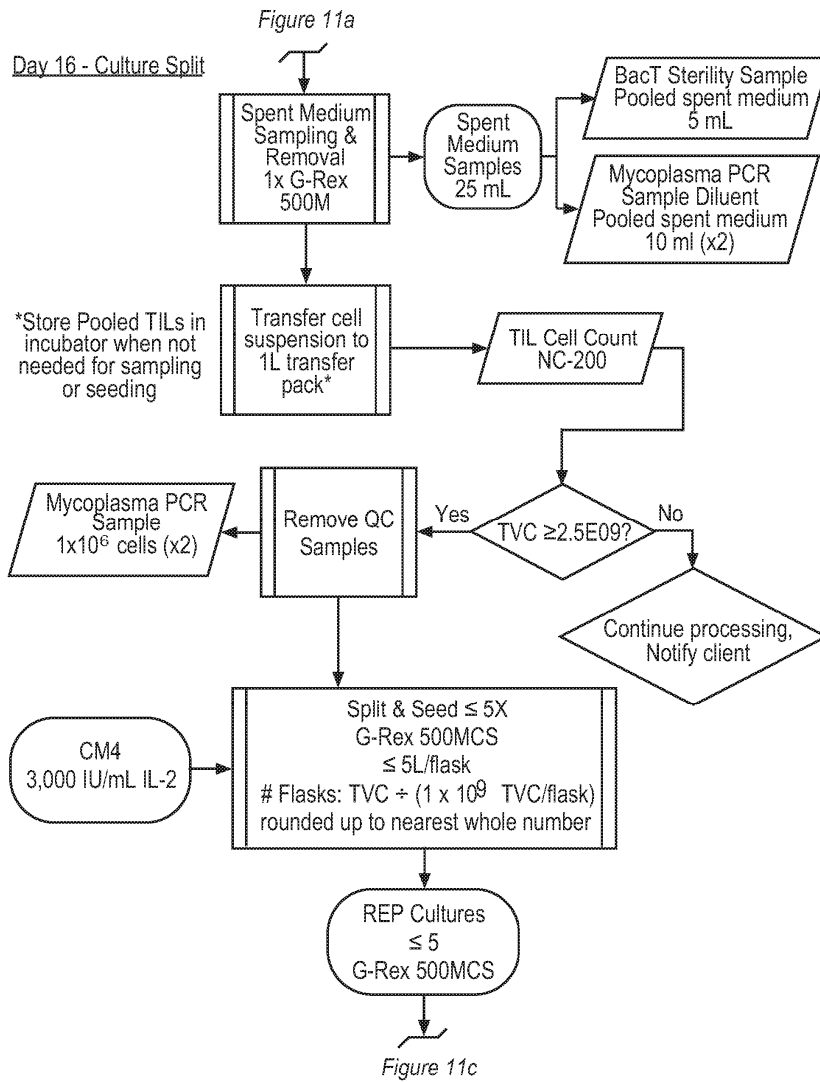


Figure 11b

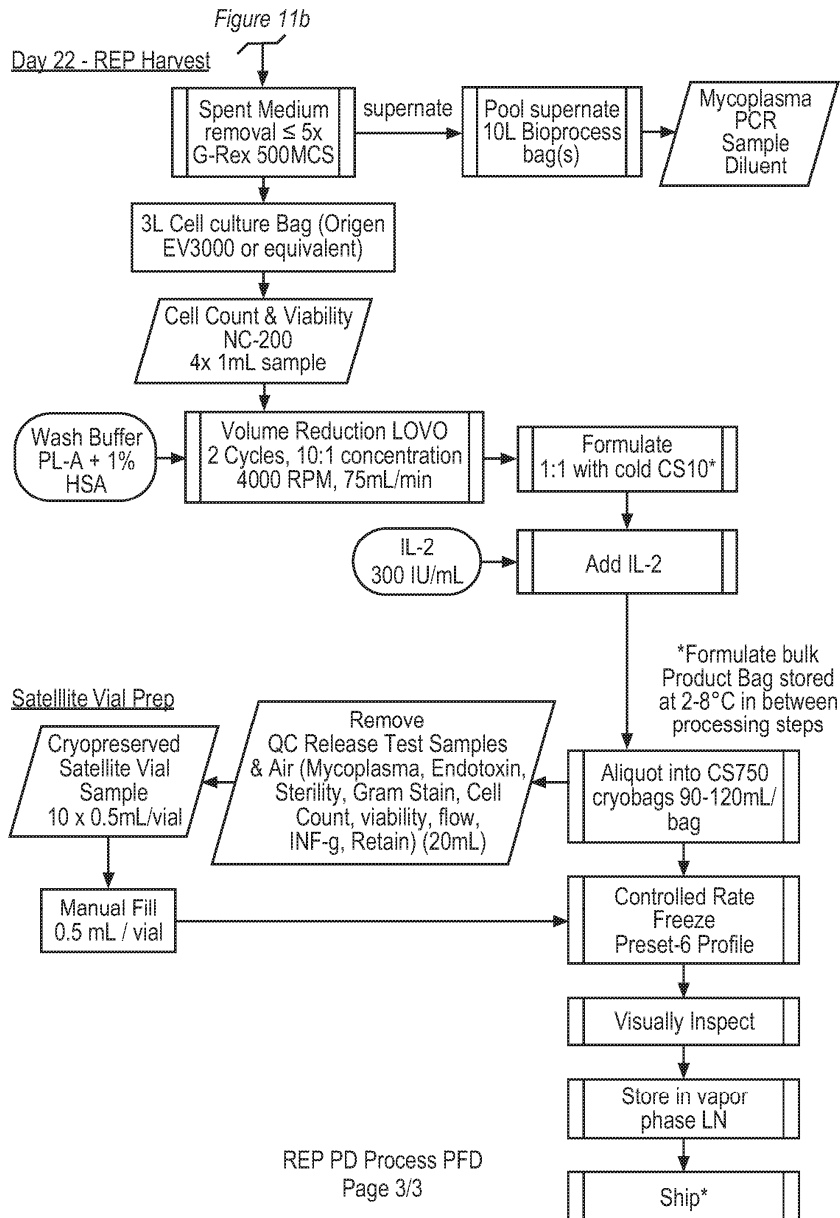


Figure 11c

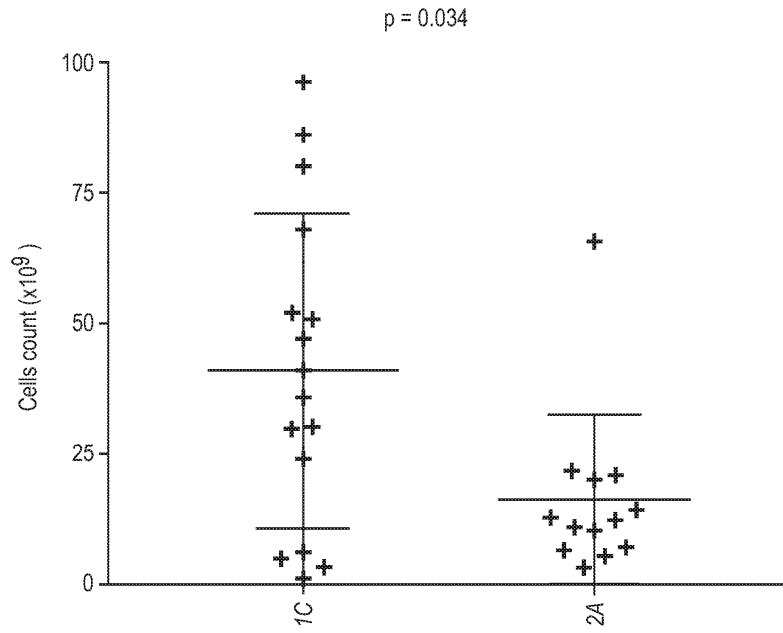


Figure 12

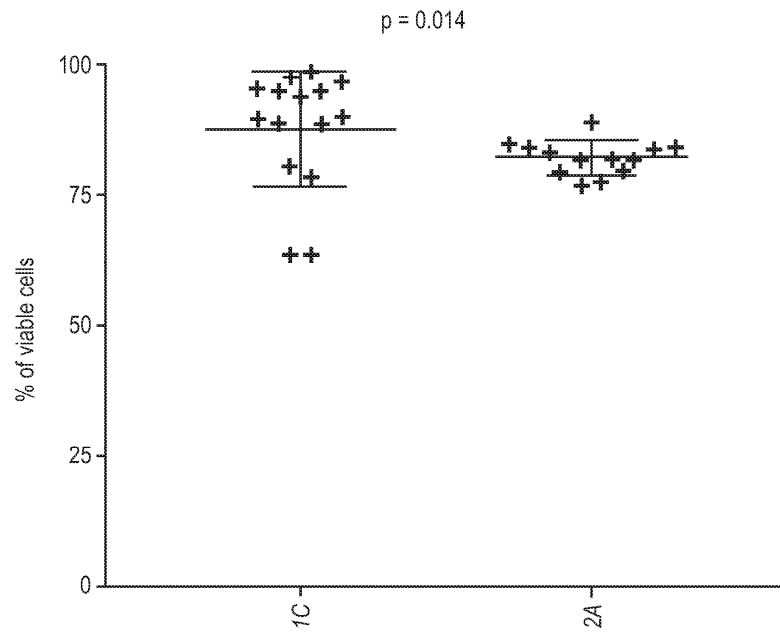


Figure 13

%CD45 CD3: 1C vs. 2A

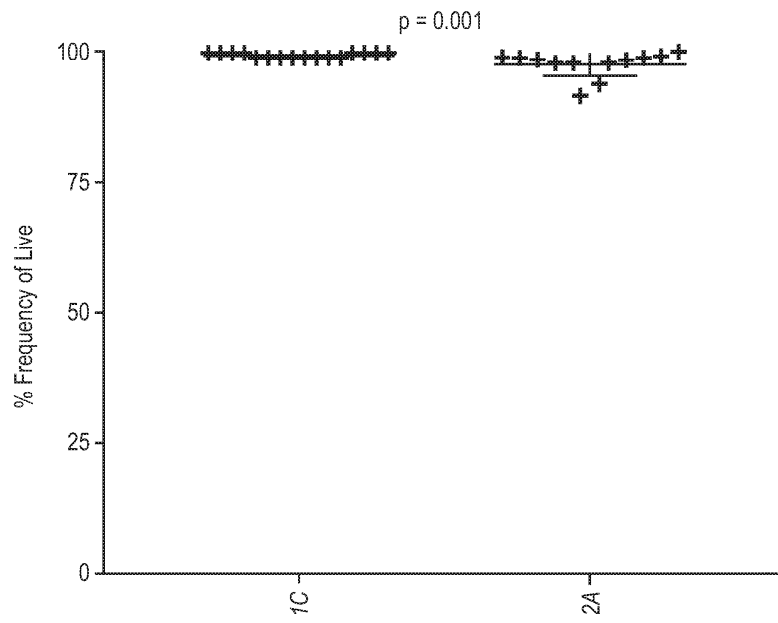


Figure 14

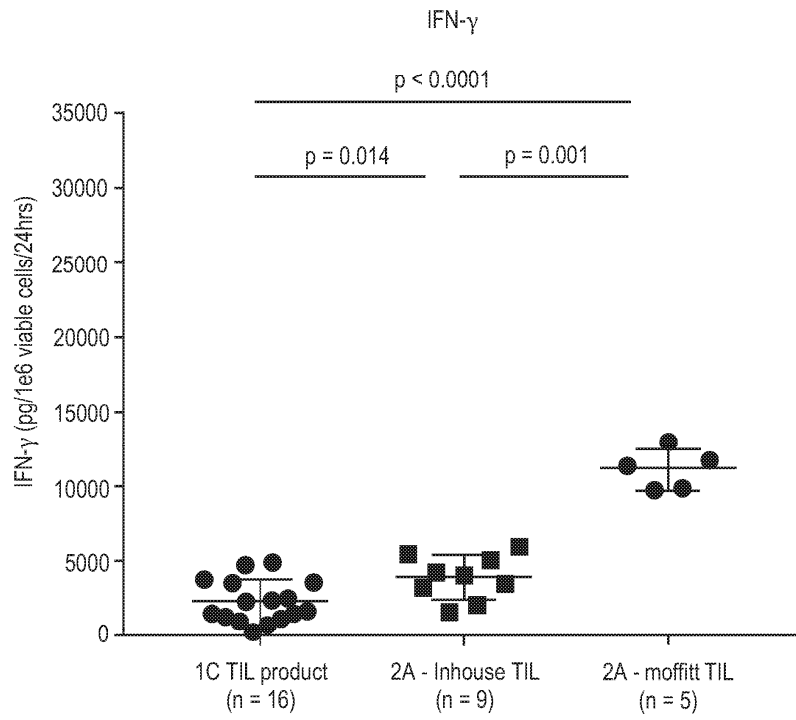


Figure 15

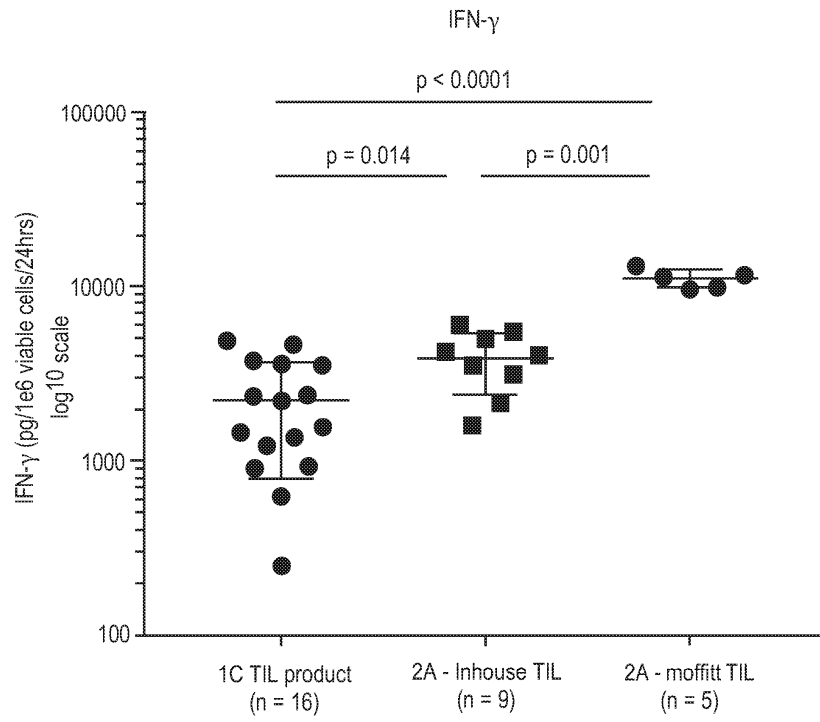


Figure 16

TCRa/b and NK: 1C vs. 2A

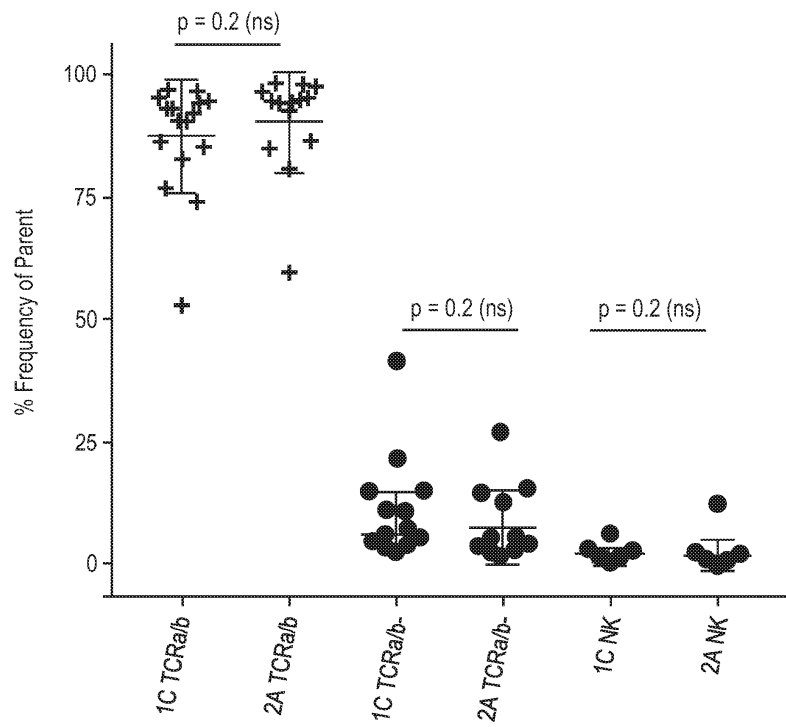


Figure 17

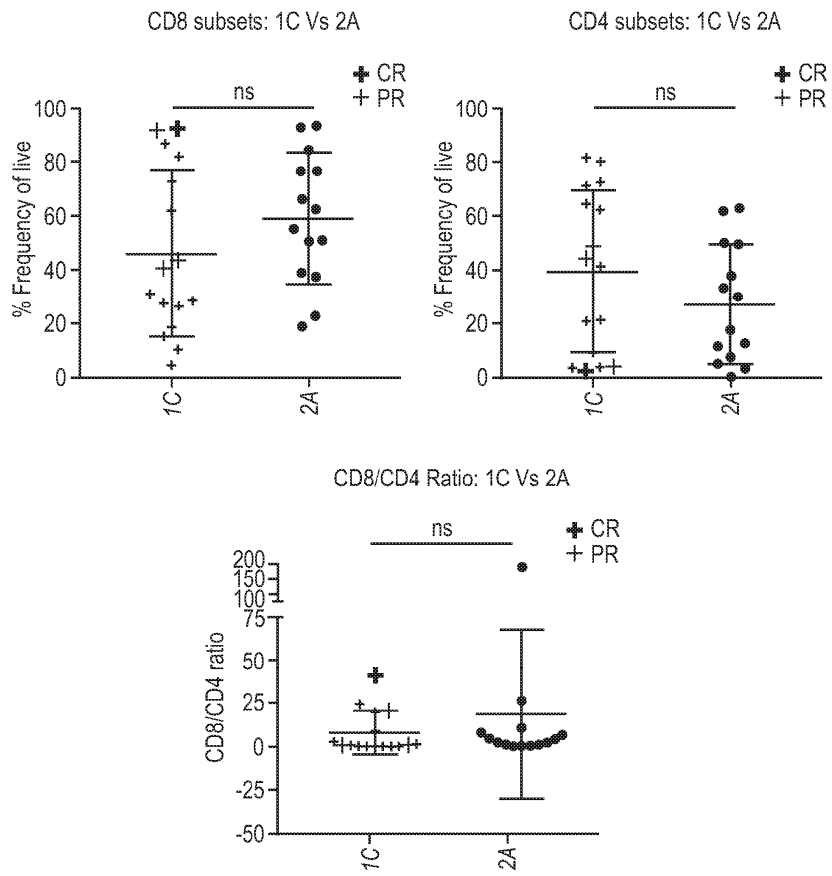


Figure 18

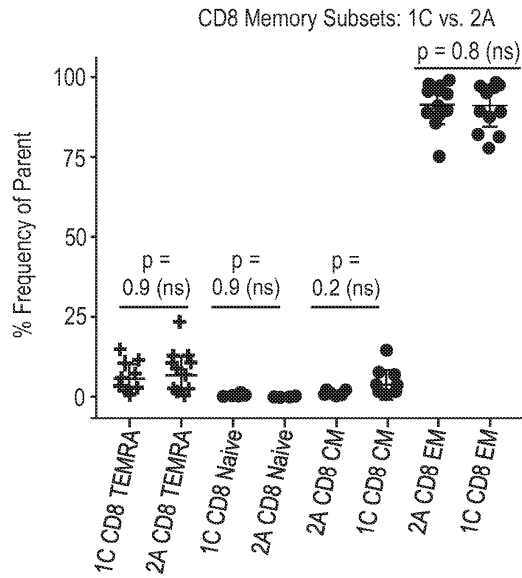
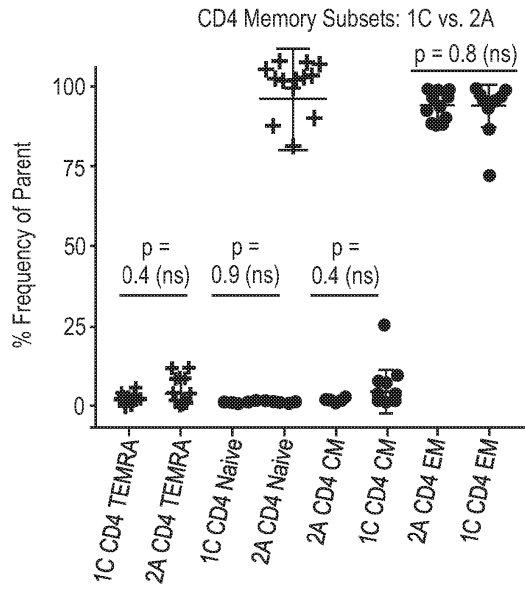


Figure 19

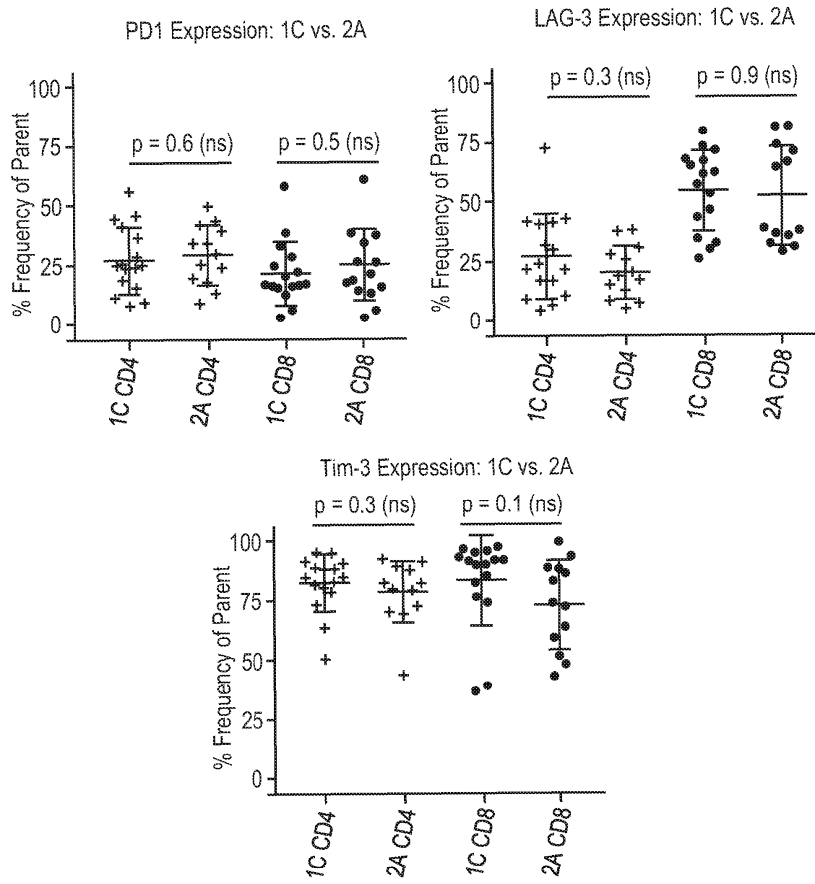


Figure 20

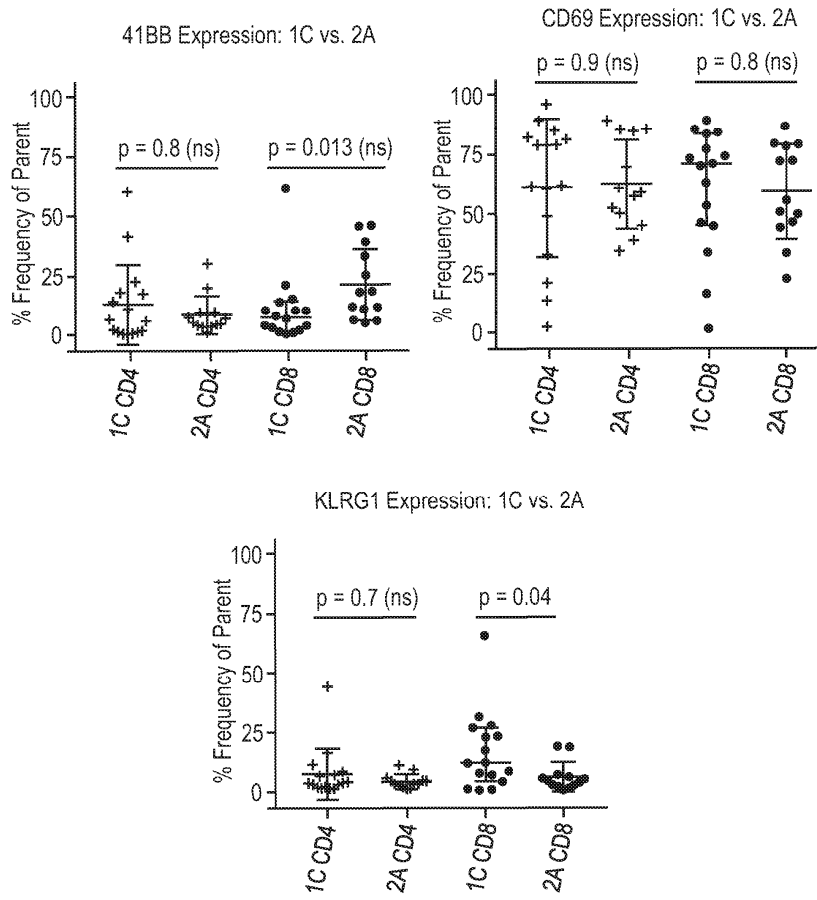


Figure 21

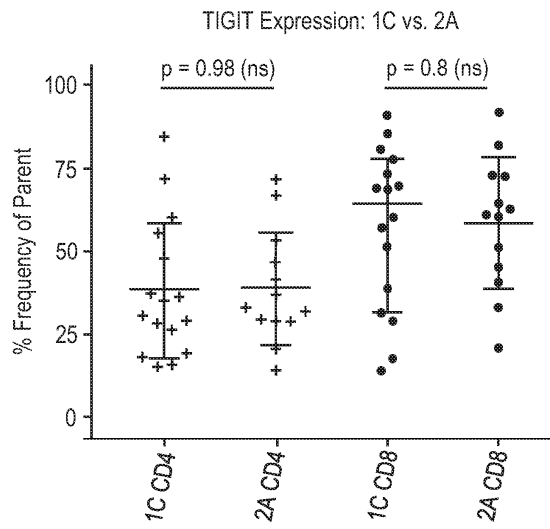


Figure 22

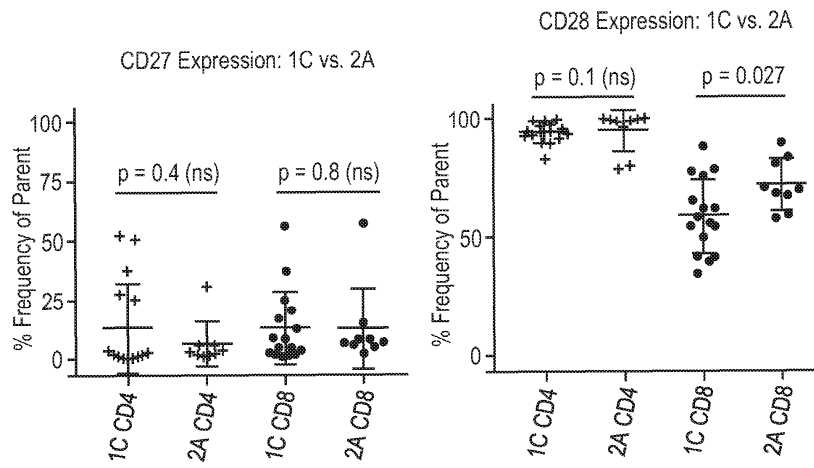


Figure 23

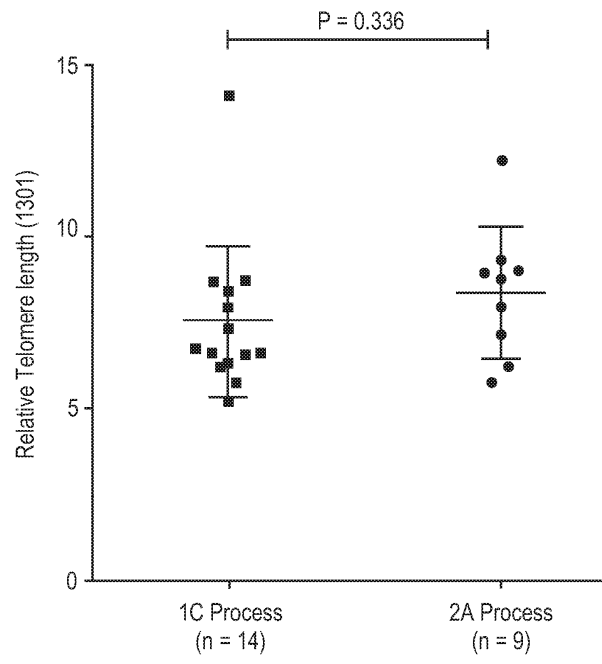


Figure 24

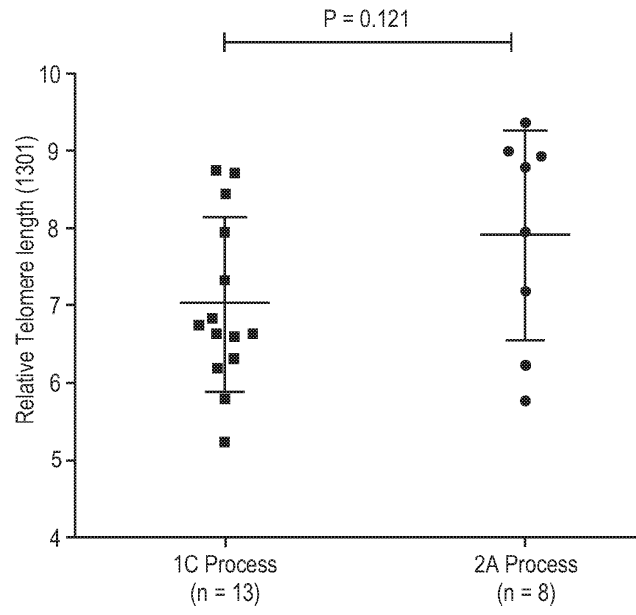
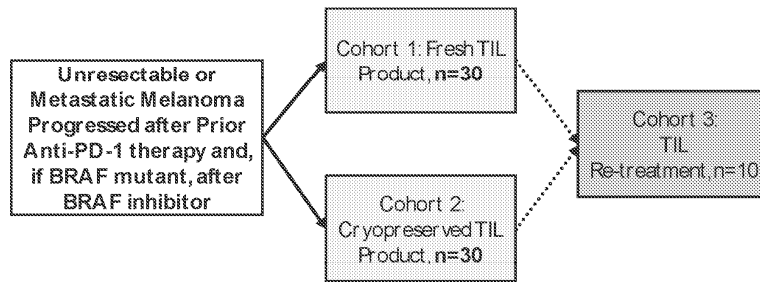


Figure 25

**Figure 26**



**Figure 27**

**Process 2A: about 22 days from Steps A - E**

**1. STEP A**

Obtain Patient Tumor Sample

**2. STEP B**

Fragmentation and First Expansion

3 days to 14 days

**3. STEP C**

First Expansion to Second Expansion Transition

No Storage and Closed System

**4. STEP D**

Second Expansion

IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells

Closed System

**5. STEP E**

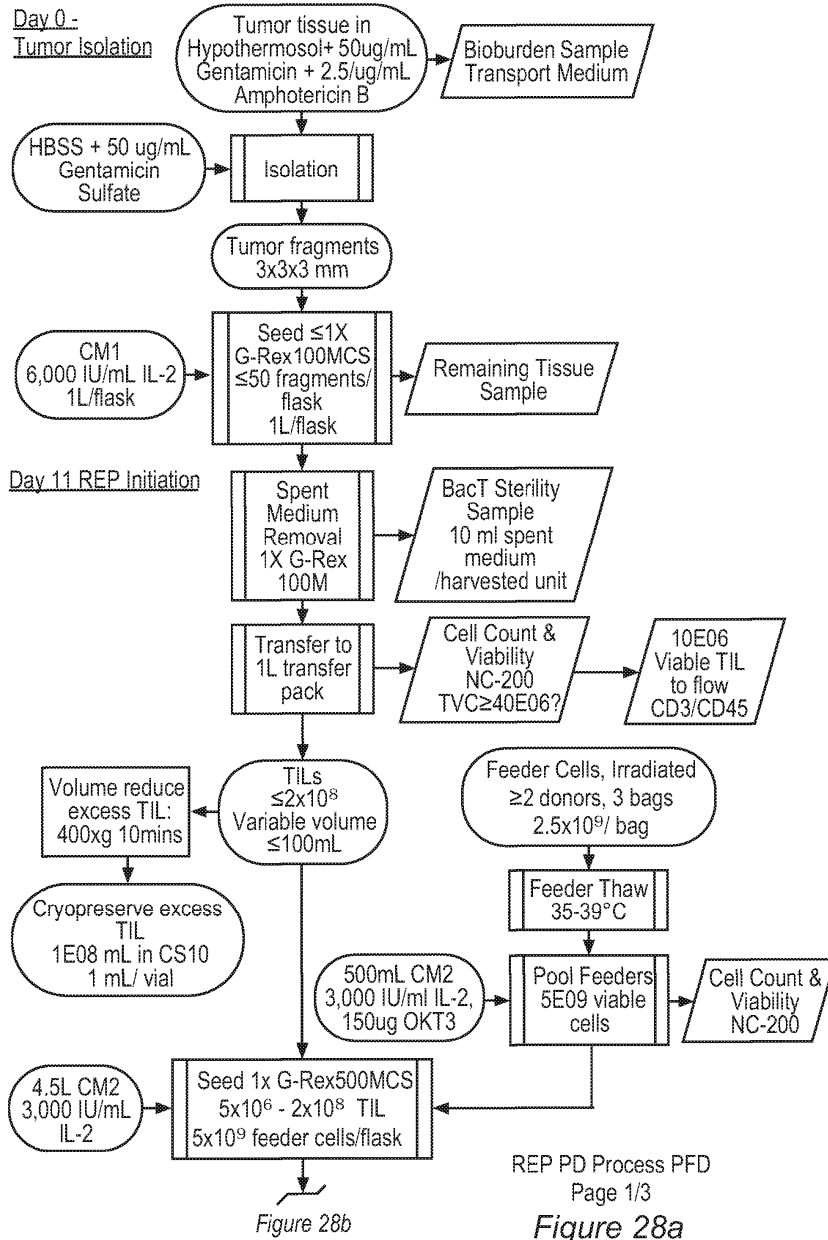
Harvest TILS from Step D

Closed System

**6. STEP F**

Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag

(optionally cryopreserve)



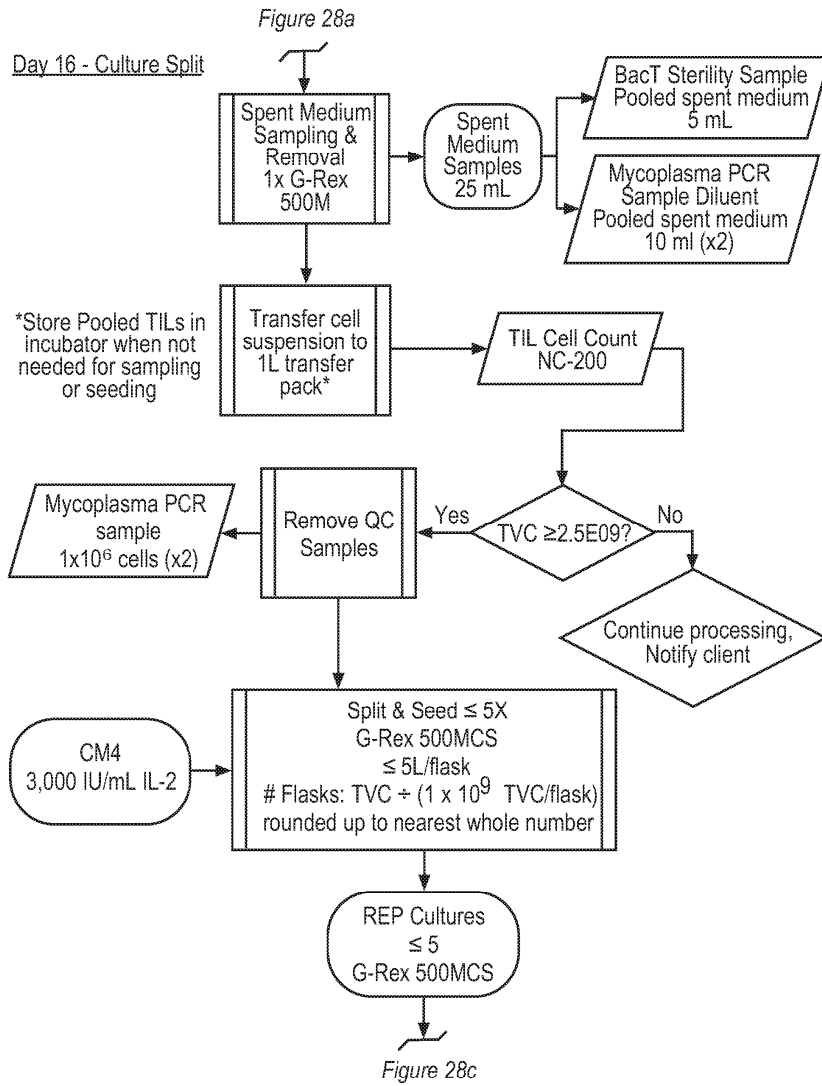
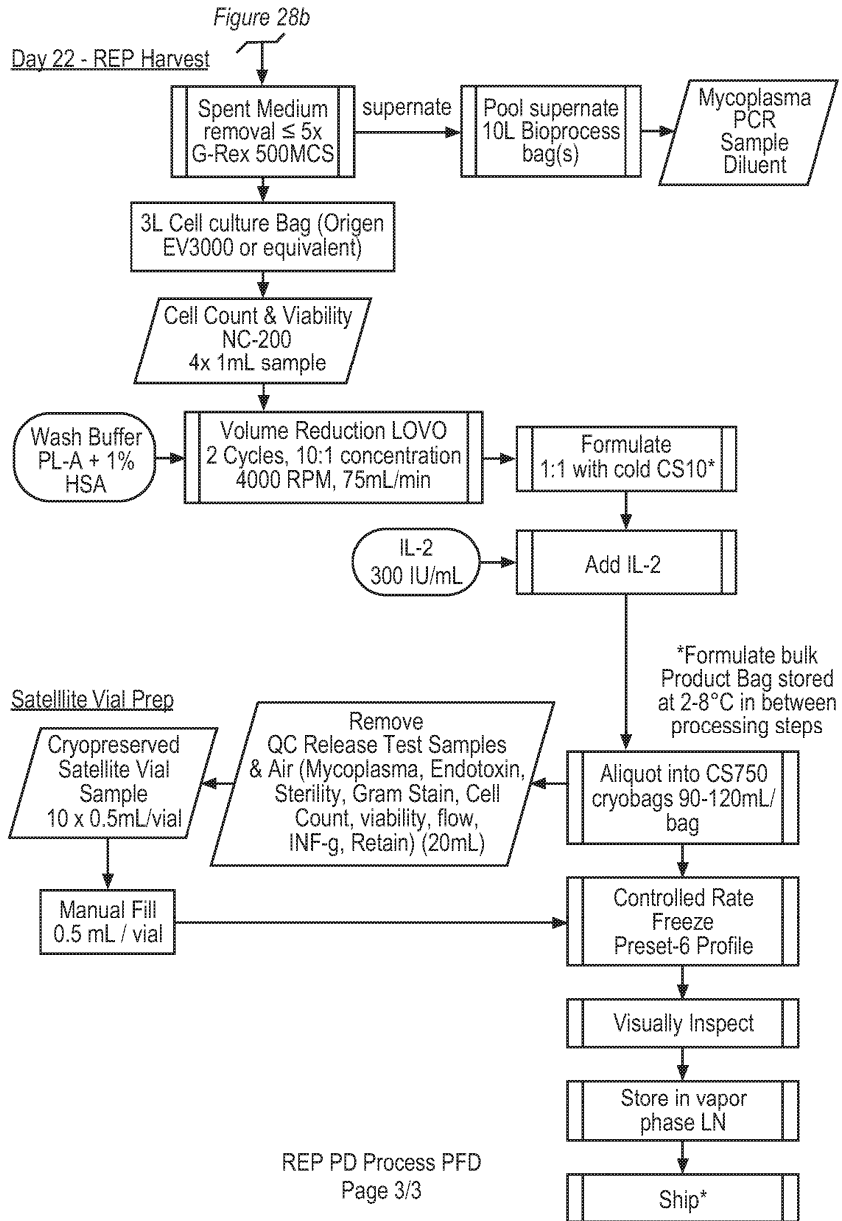


Figure 28b



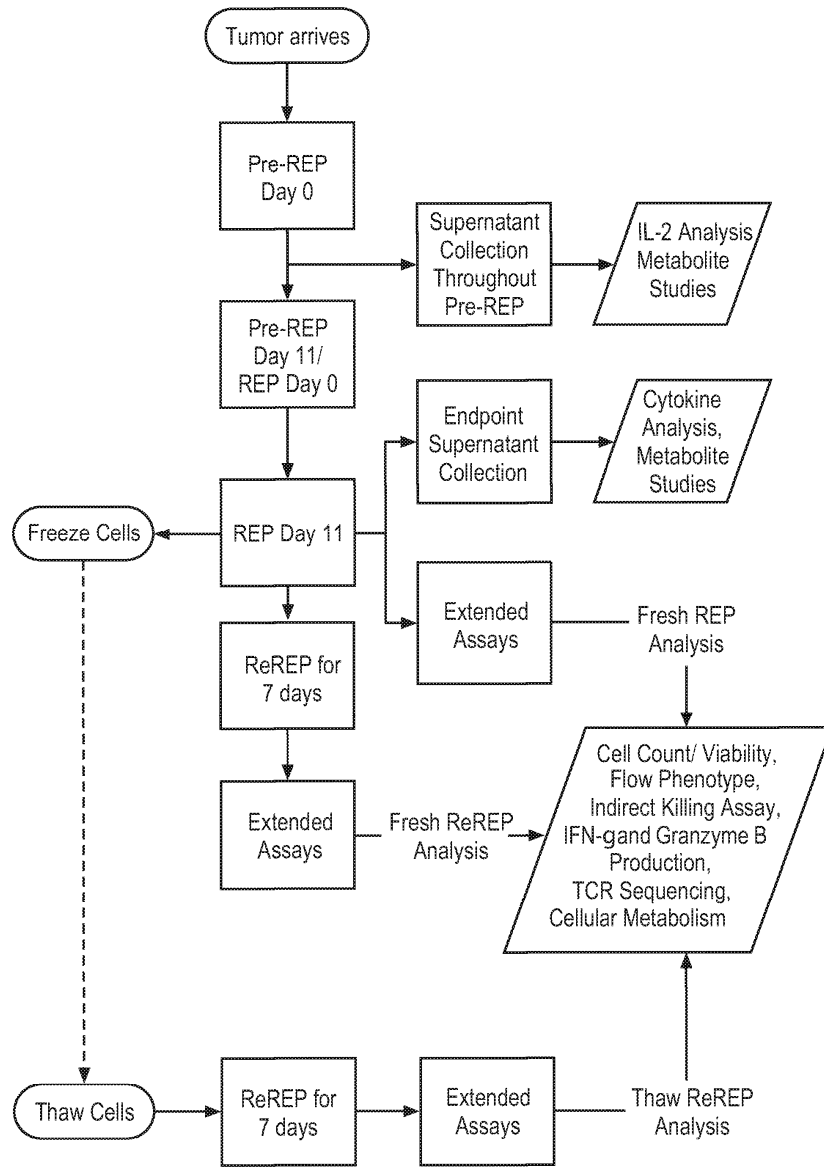


Figure 29

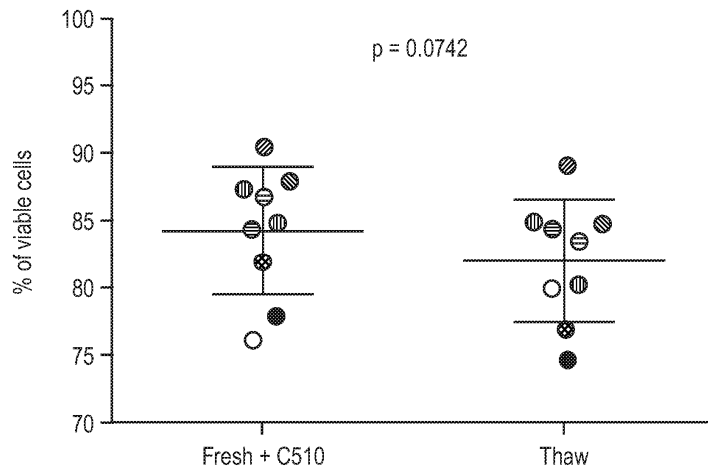


Figure 30

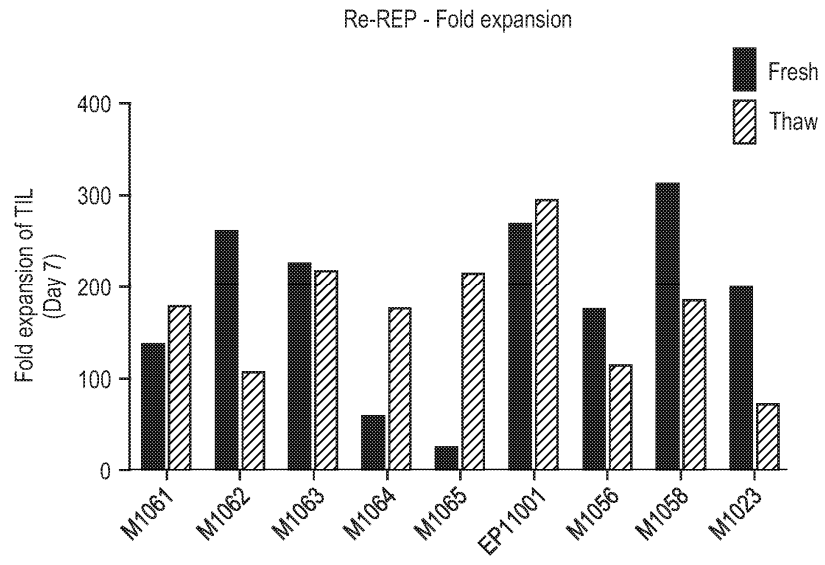


Figure 31

Normal Blood Values	
Glucose	0.7-1g/l
Glutamine	0.3-0.65mmol/l
Sodium	135-145mol/l
Potassium	3.5-5.0mmol/l
Lactic Acid	0.060-.16g/l
Ammonia	.023-.047mmol/l

*Figure 32*

37/136

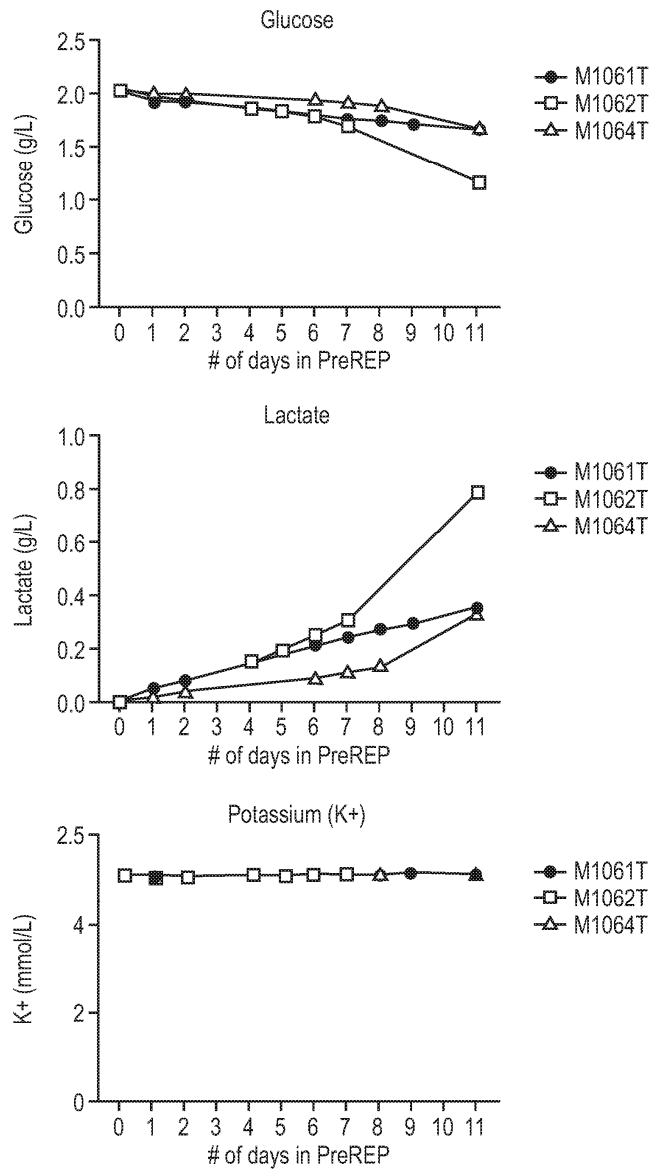


Figure 33a

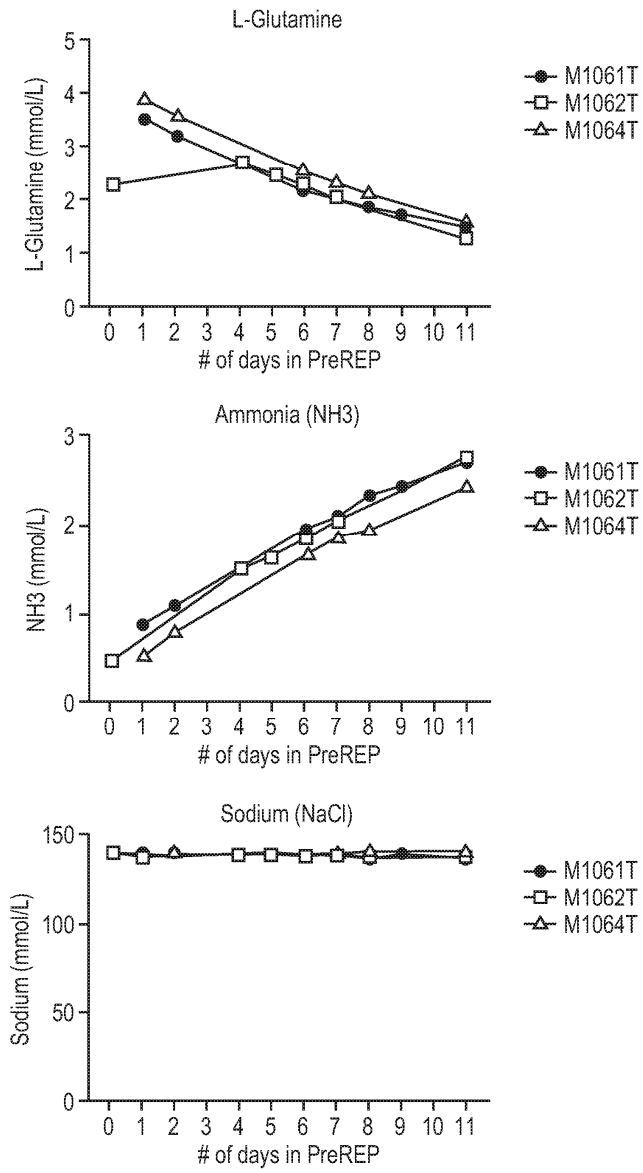


Figure 33b

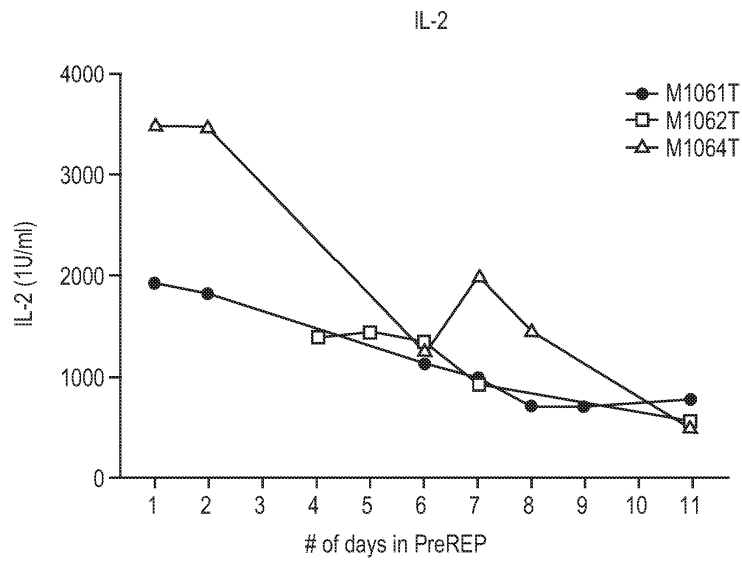


Figure 34

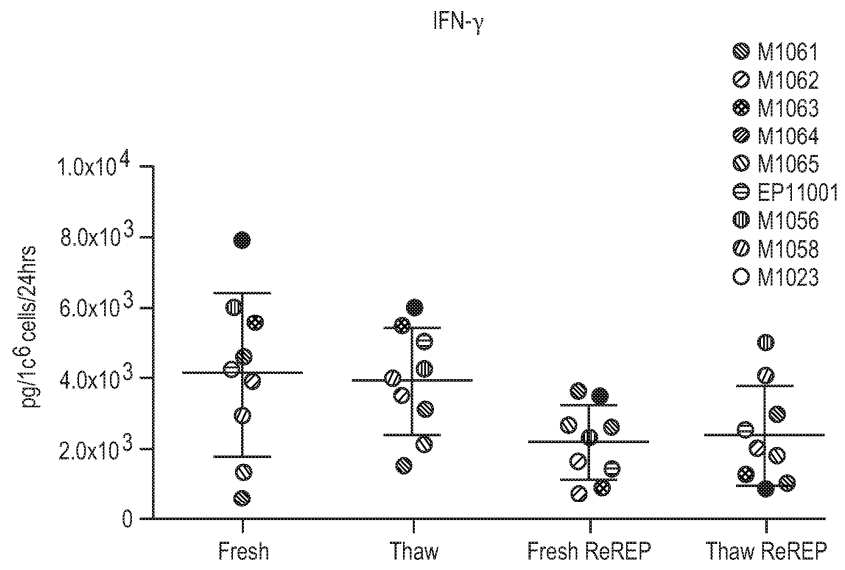


Figure 35

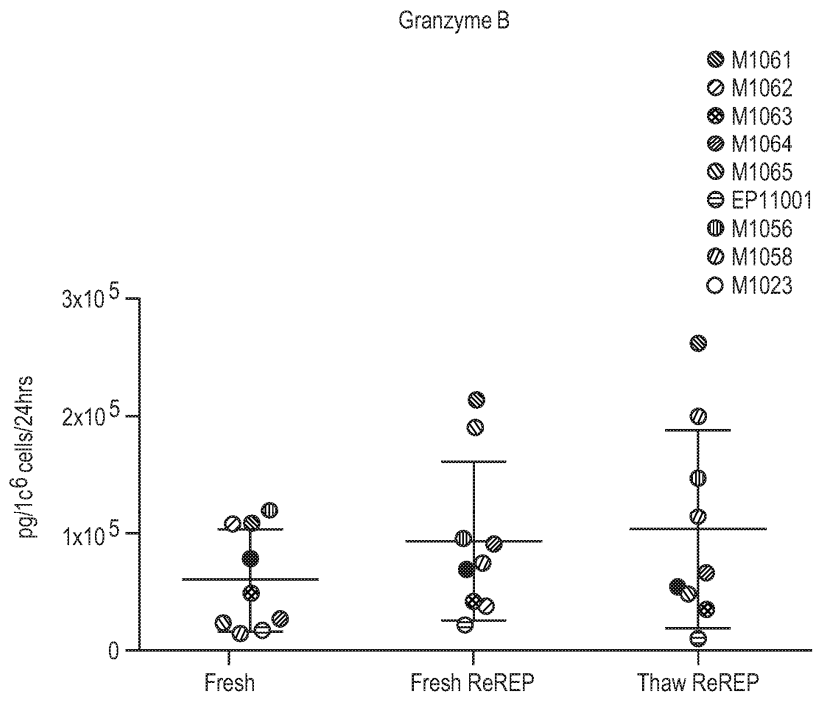


Figure 36

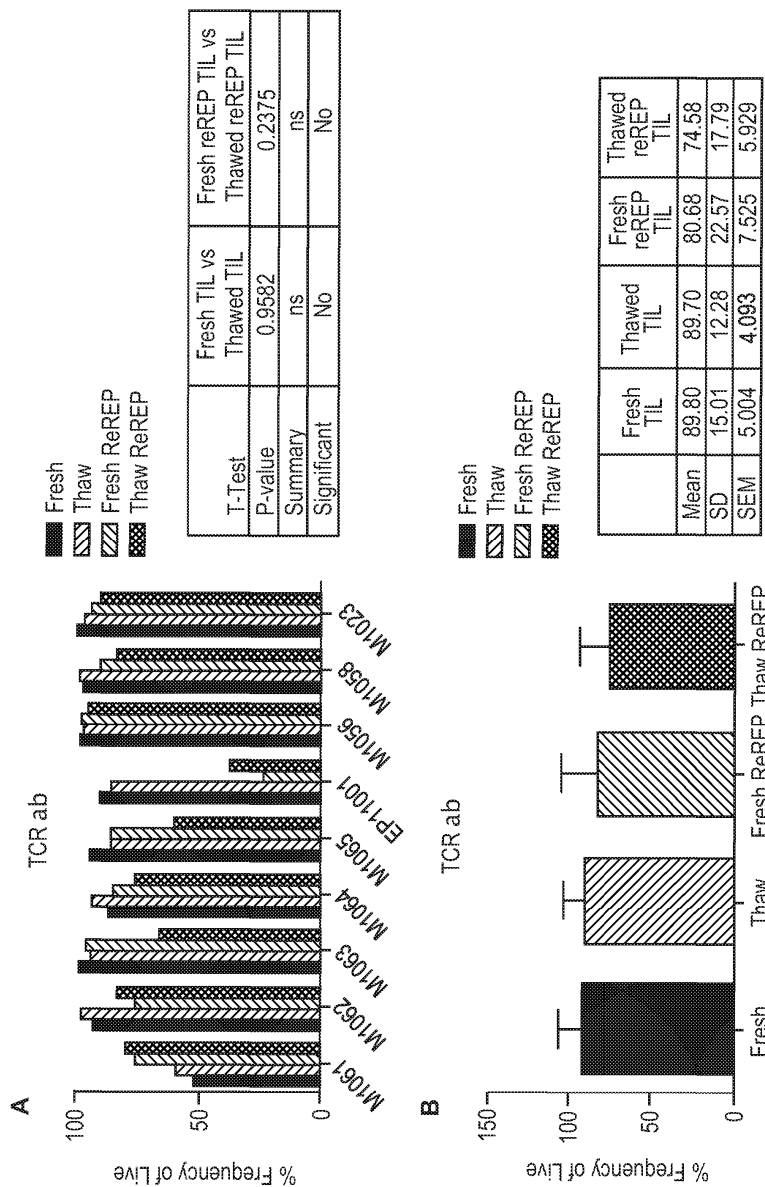


Figure 37

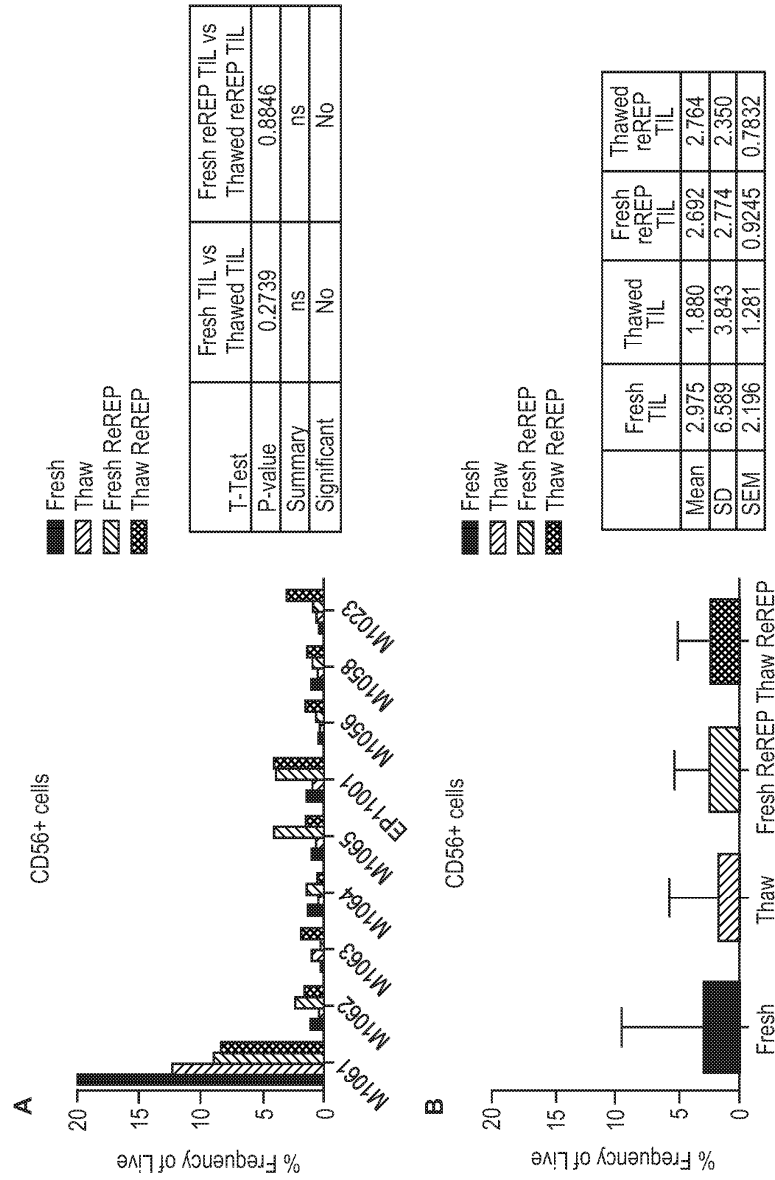


Figure 38

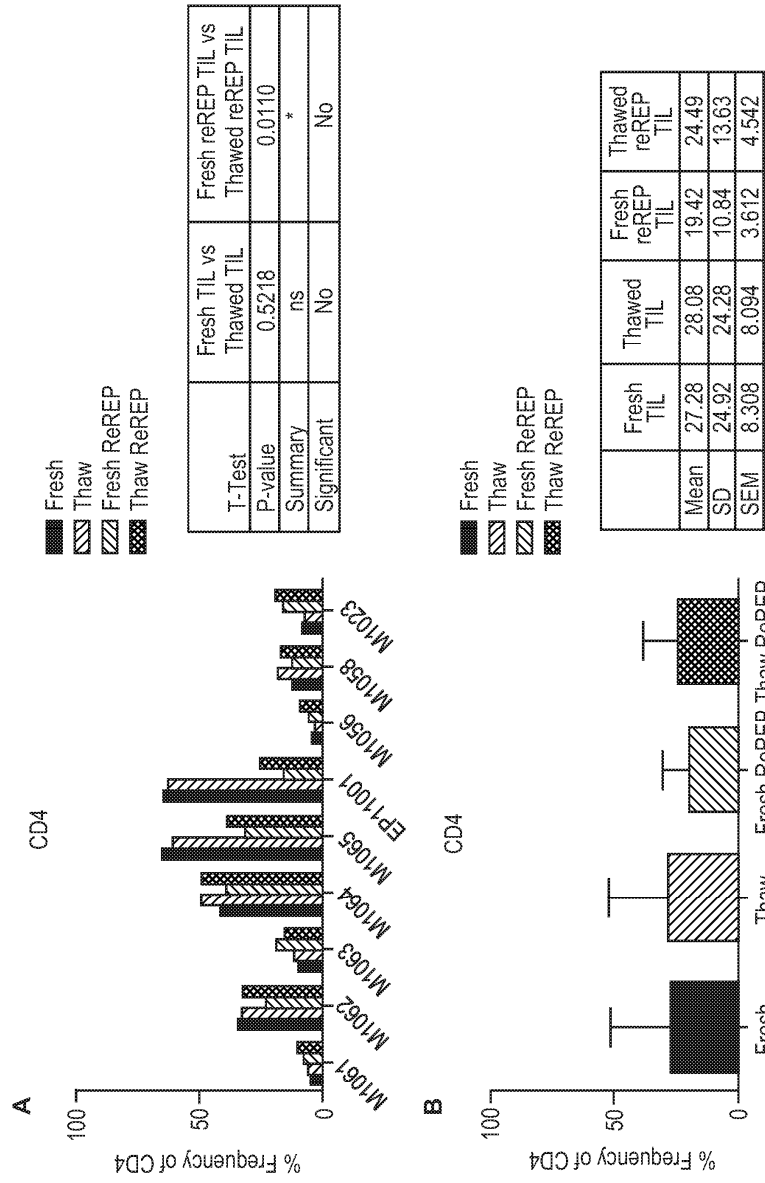


Figure 39

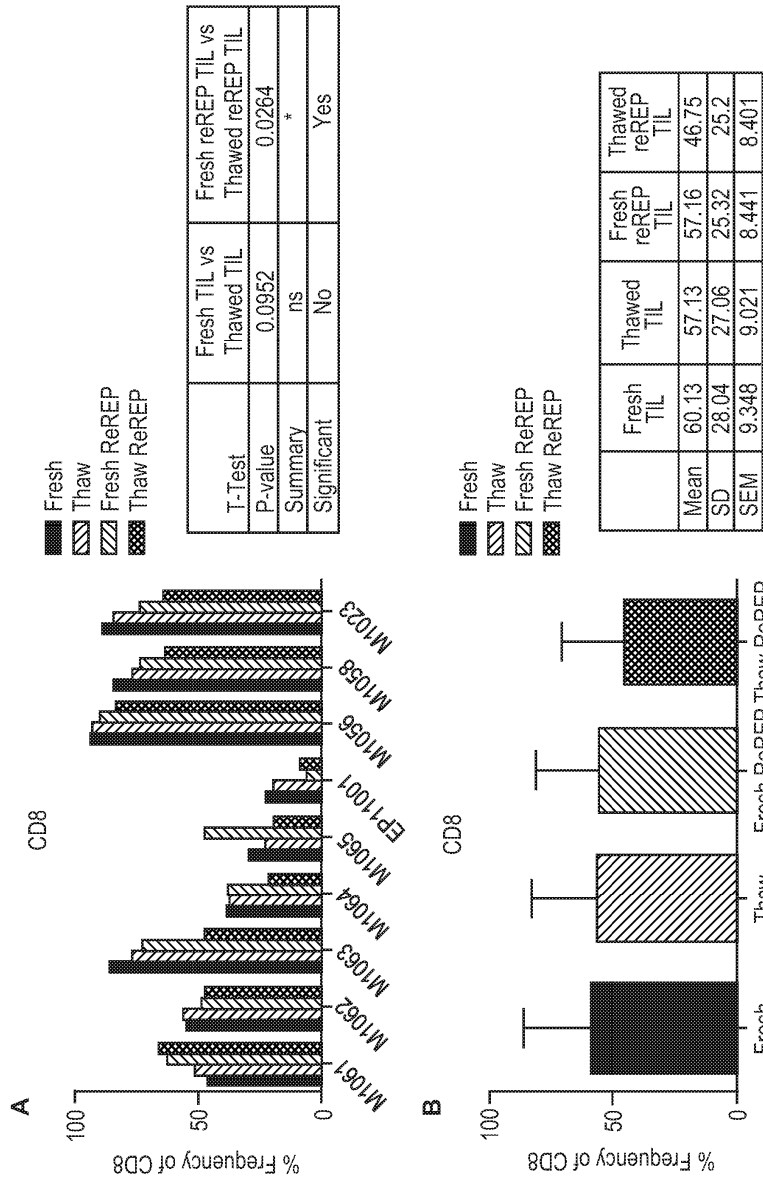


Figure 40

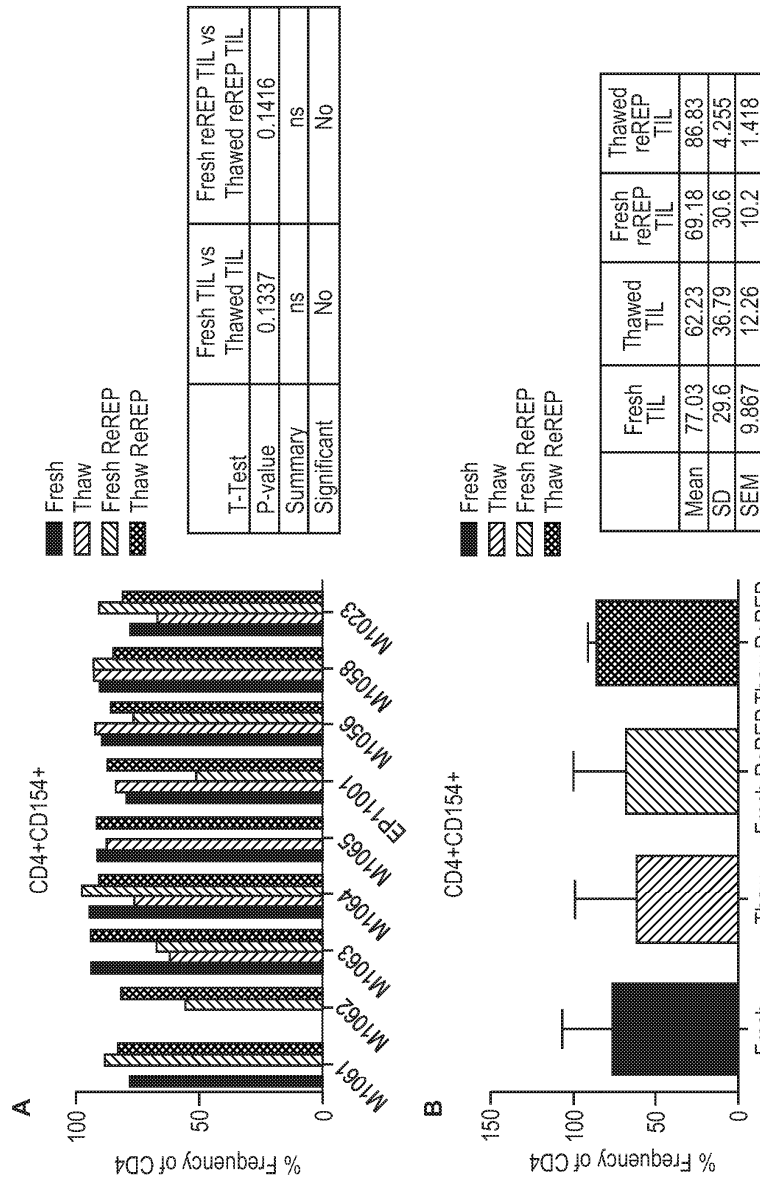


Figure 41

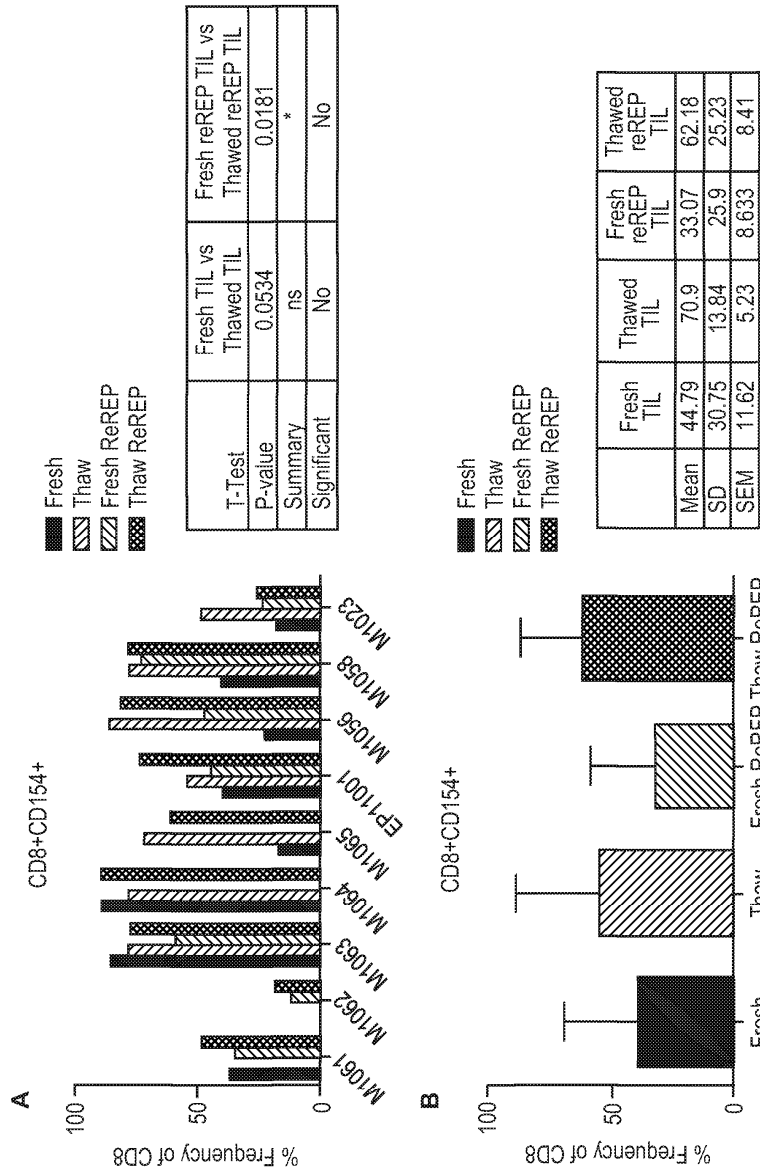


Figure 42

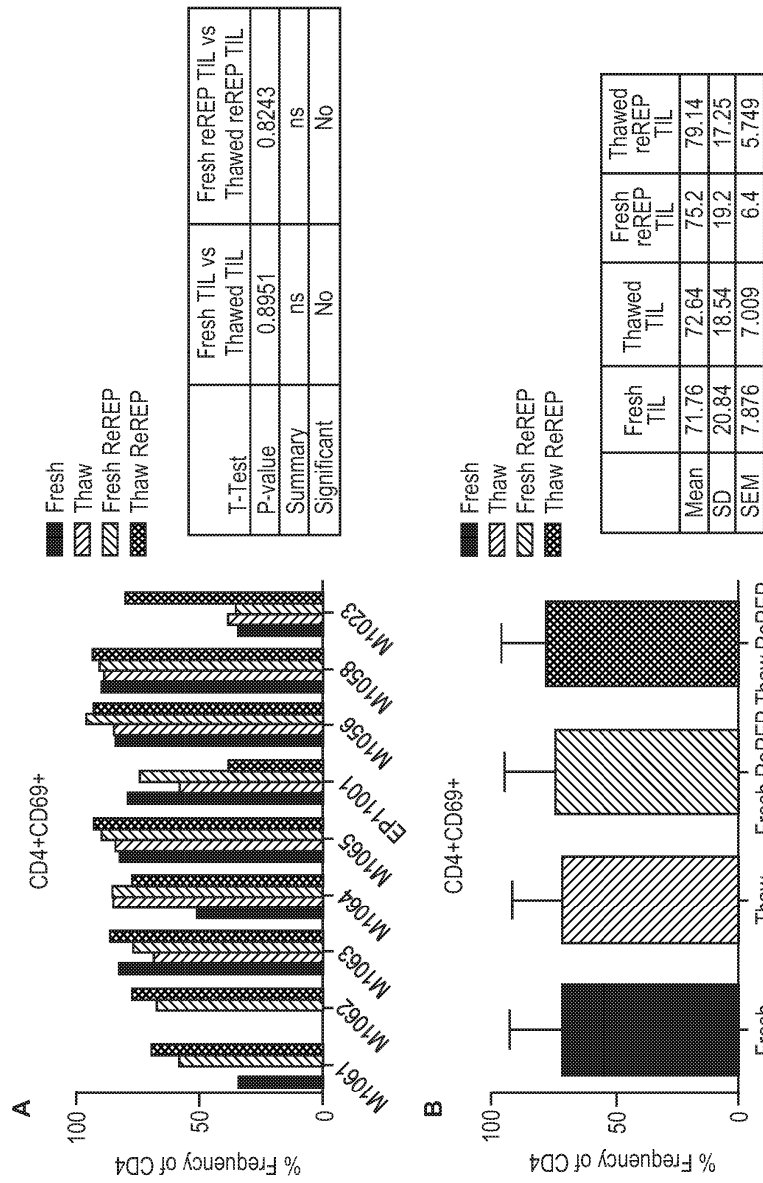


Figure 43

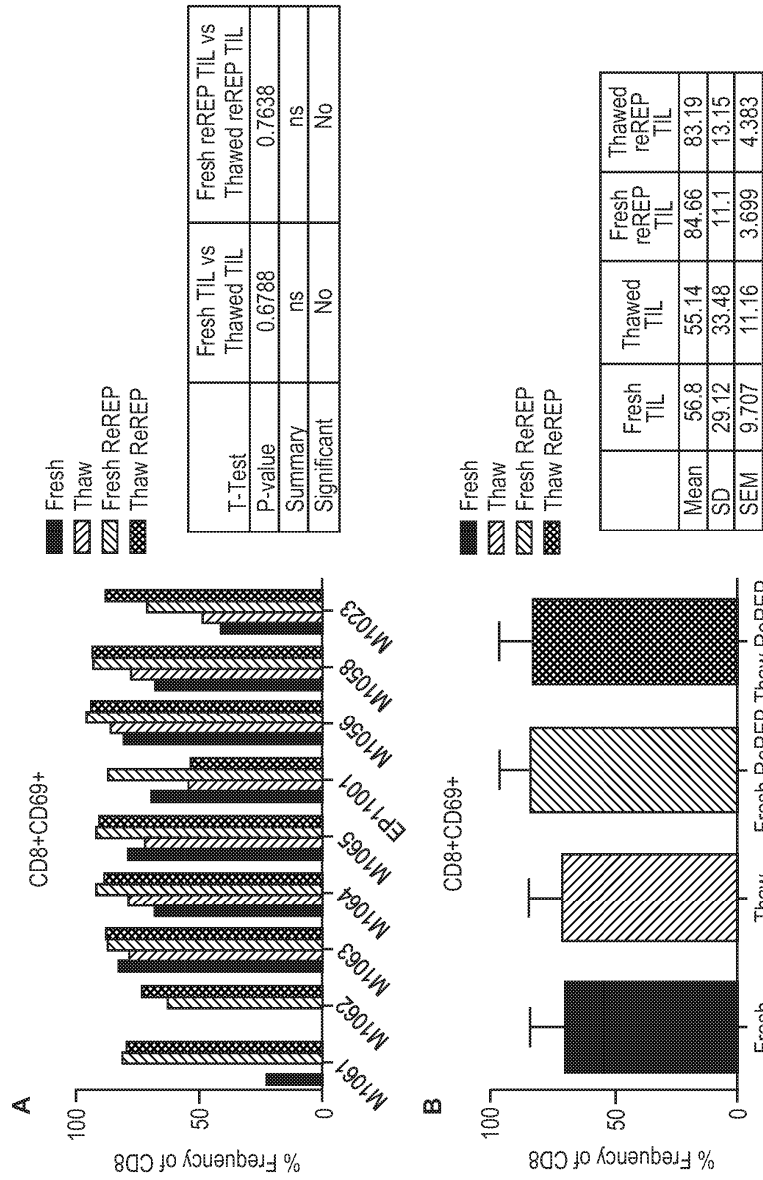


Figure 44

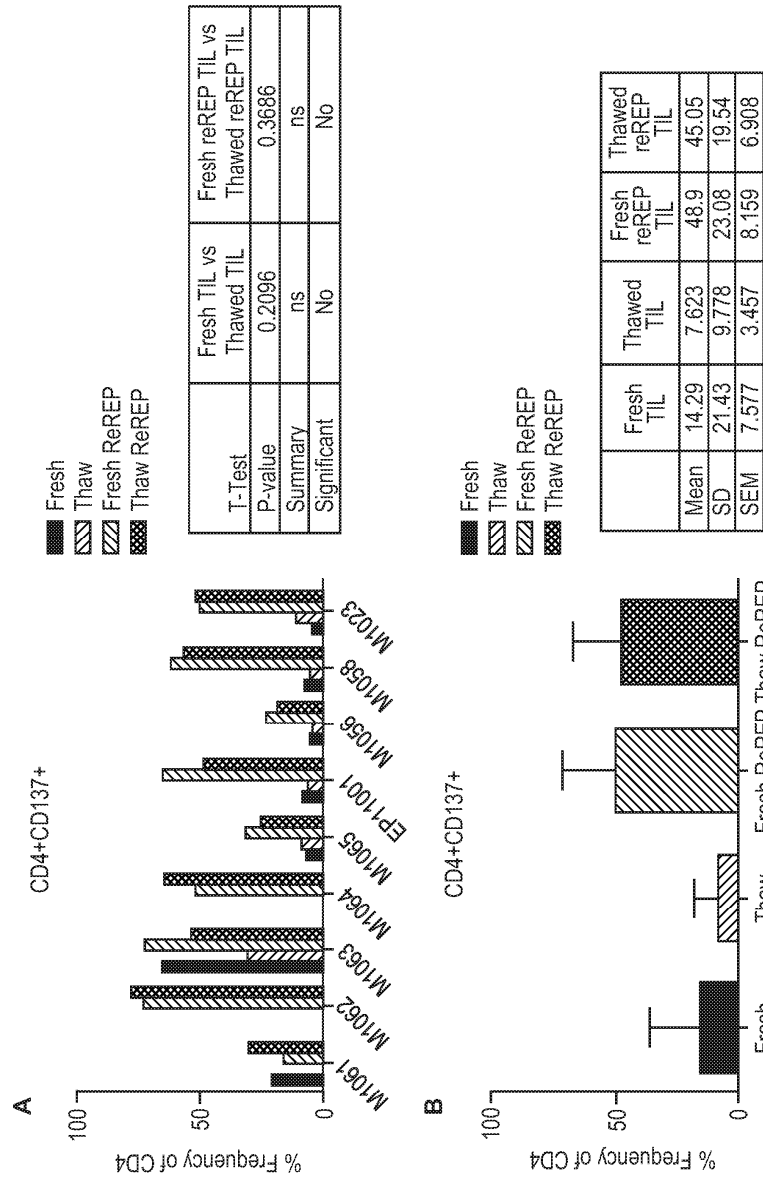


Figure 45

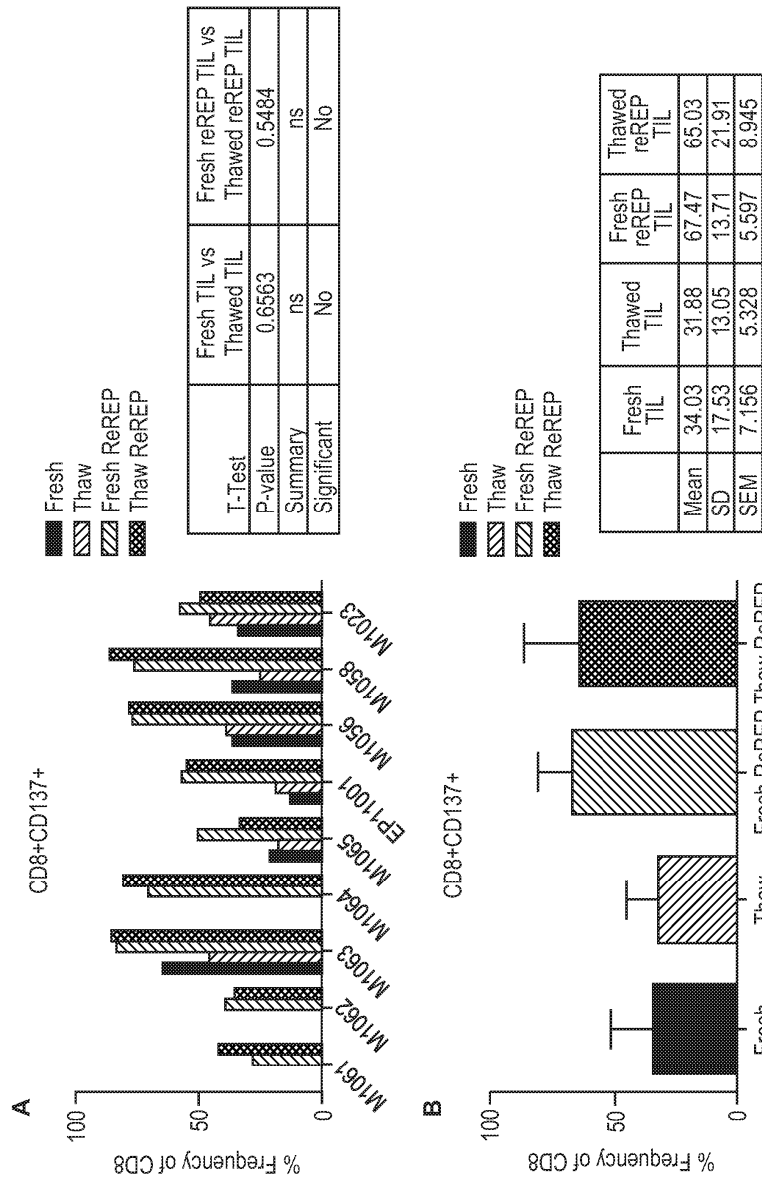


Figure 46

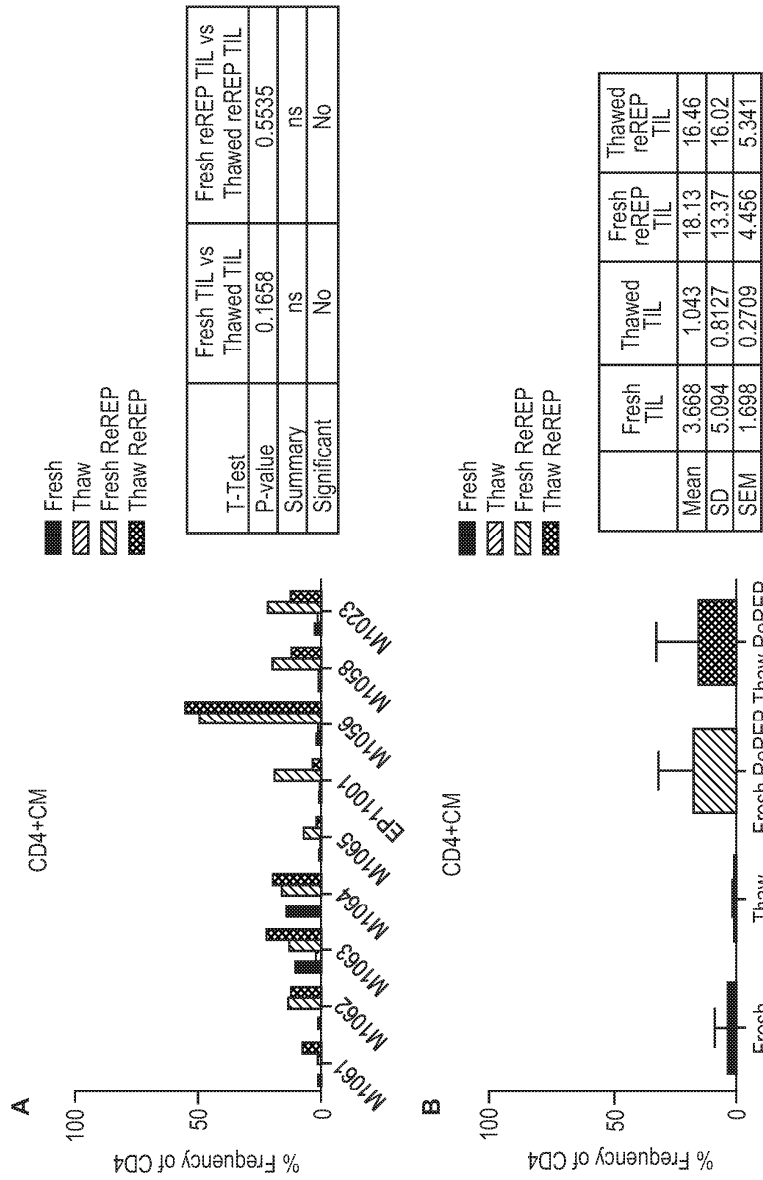


Figure 47

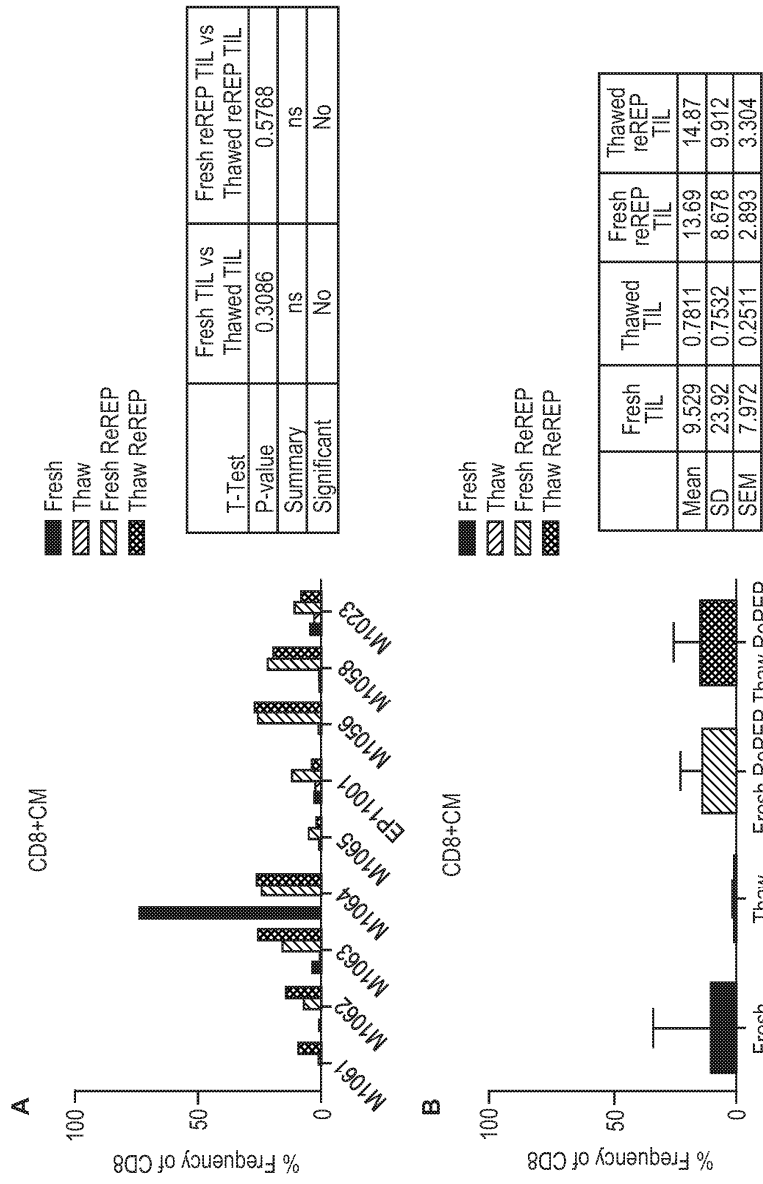


Figure 48

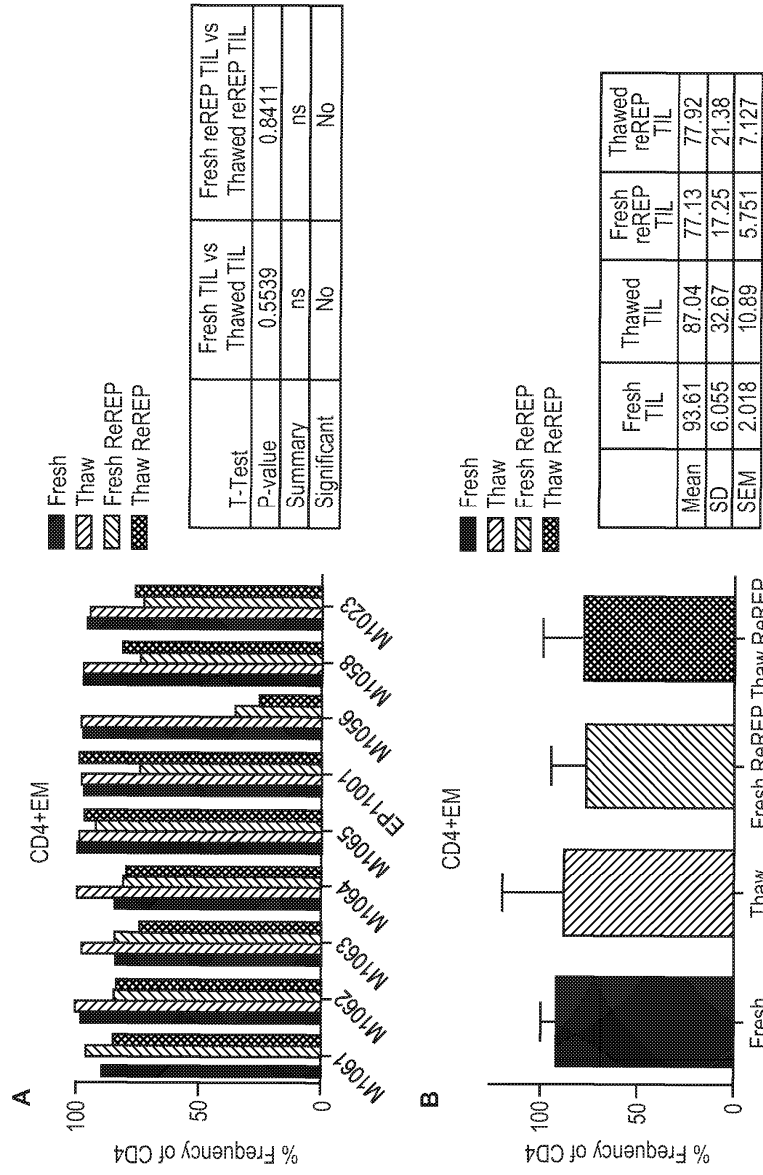


Figure 49

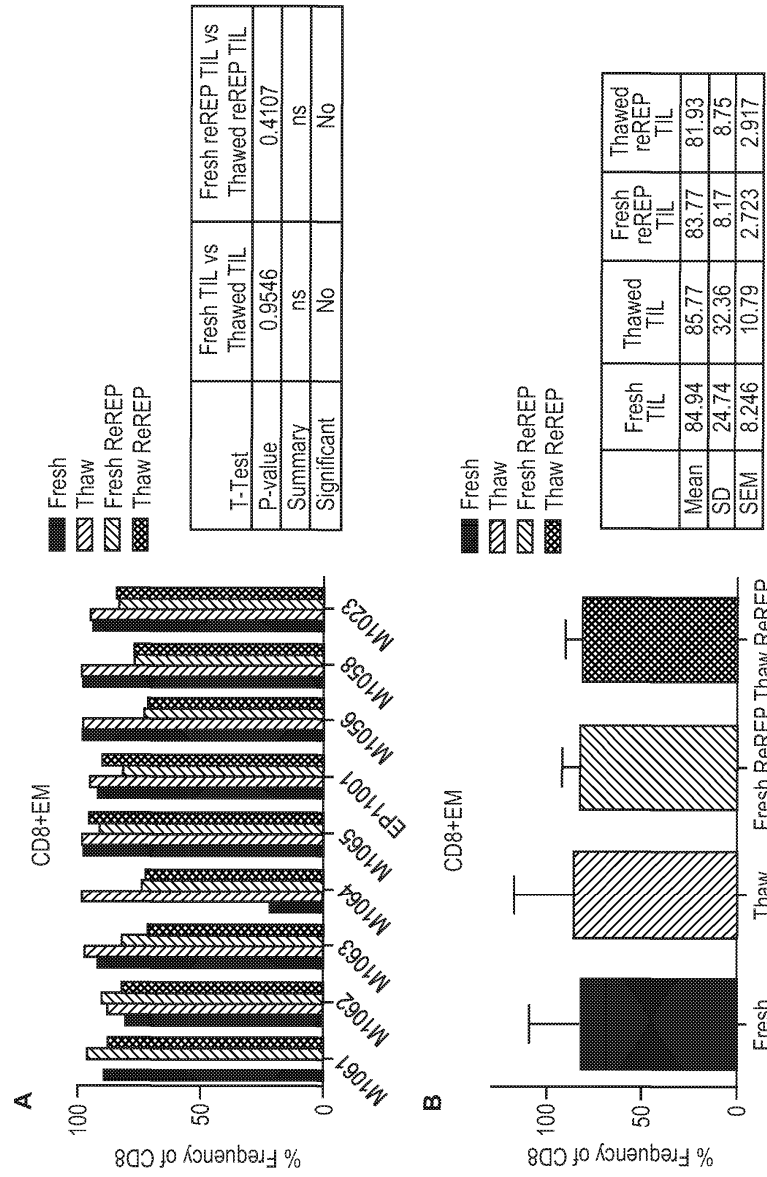


Figure 50

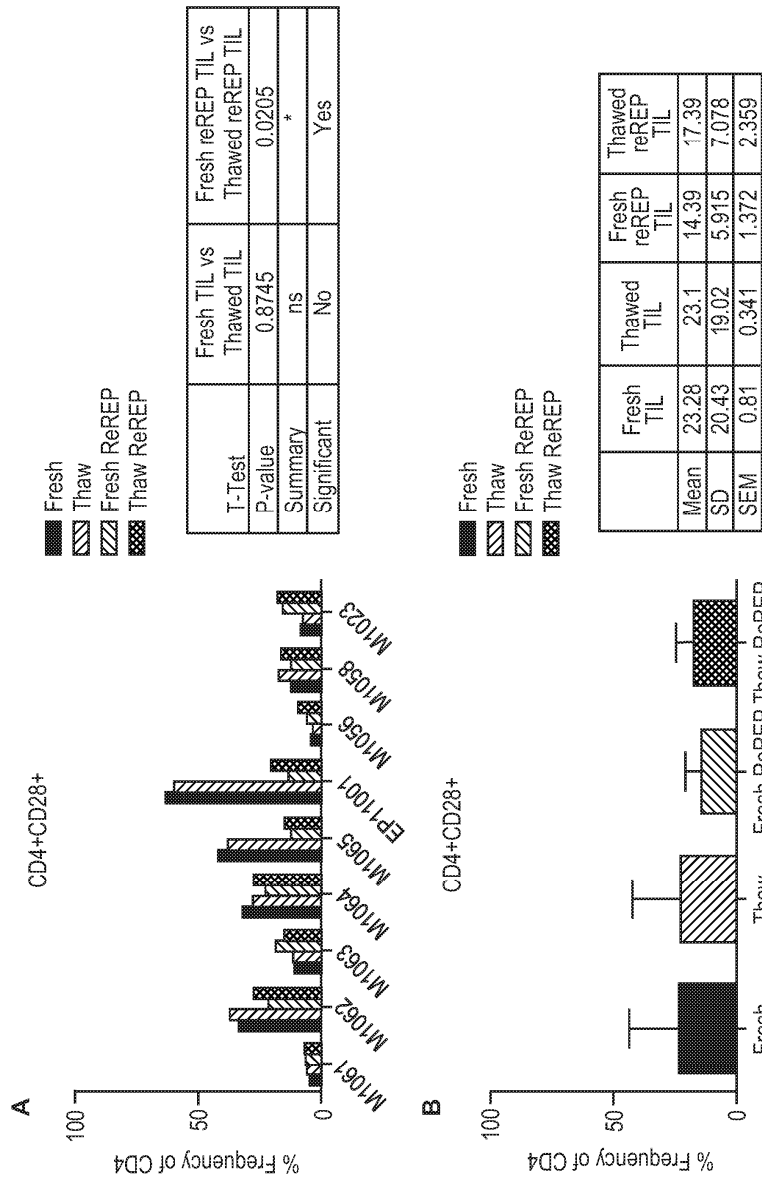


Figure 51

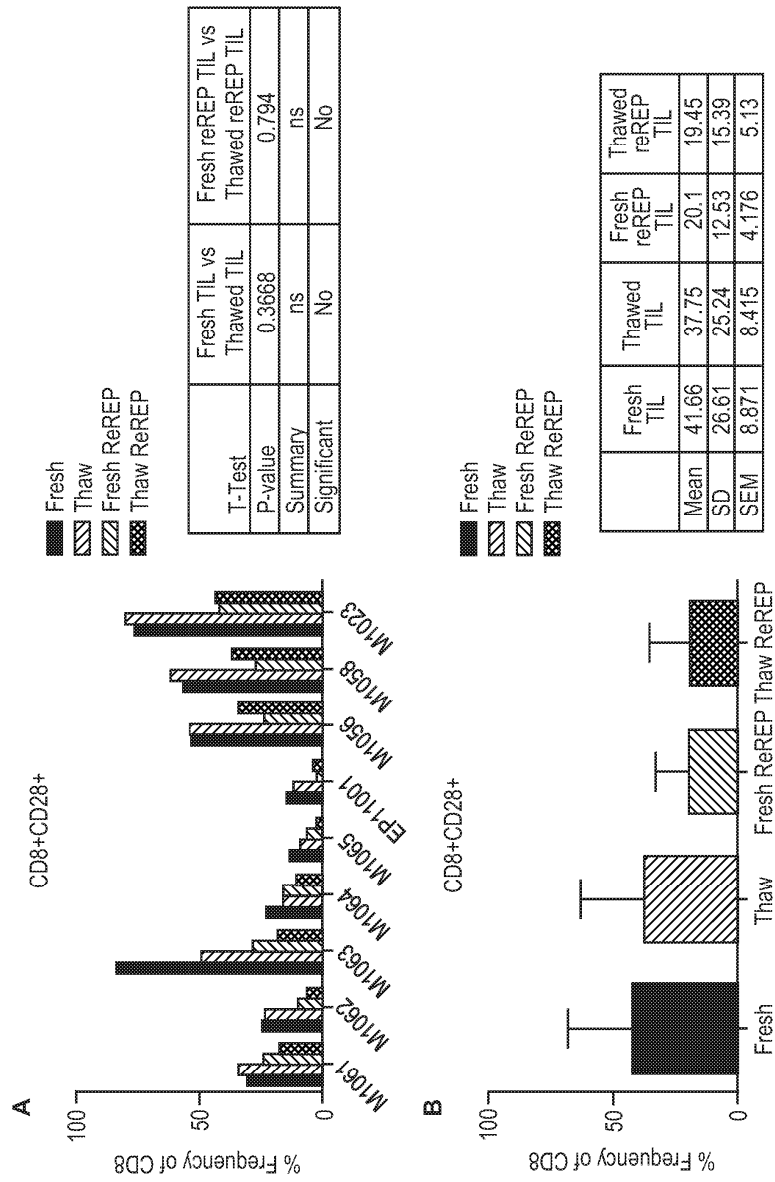


Figure 52

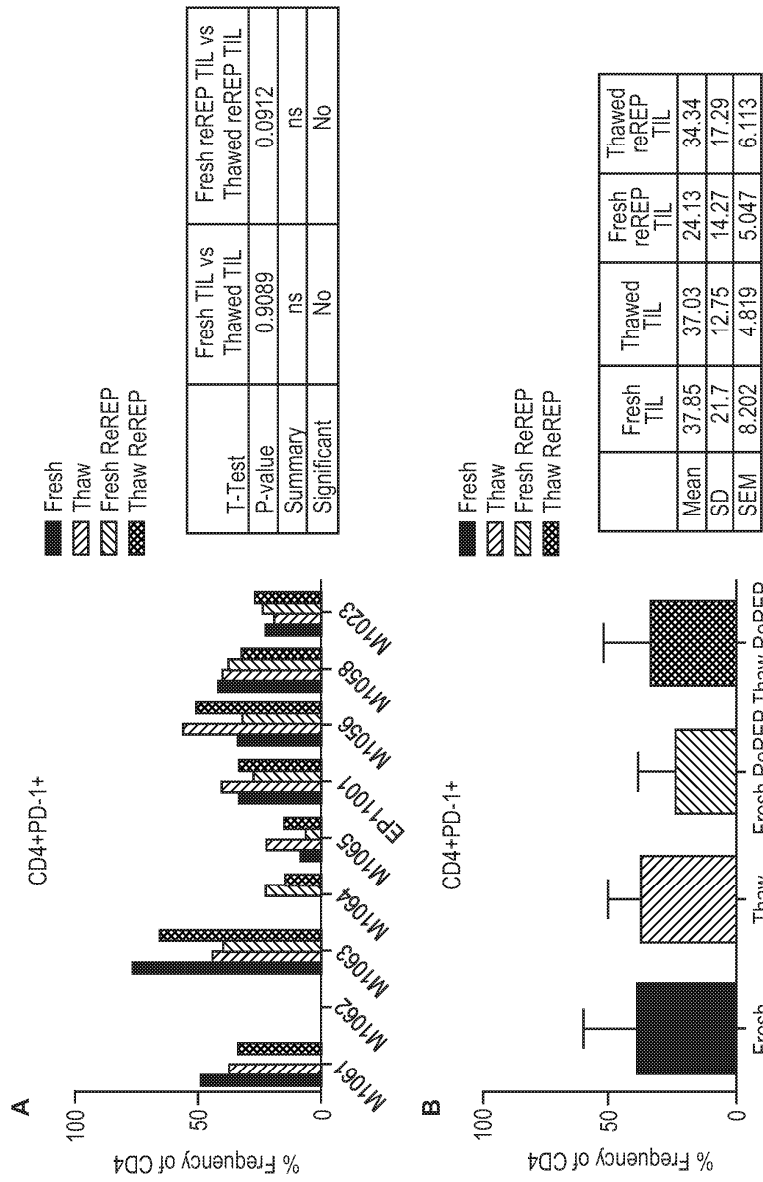


Figure 53

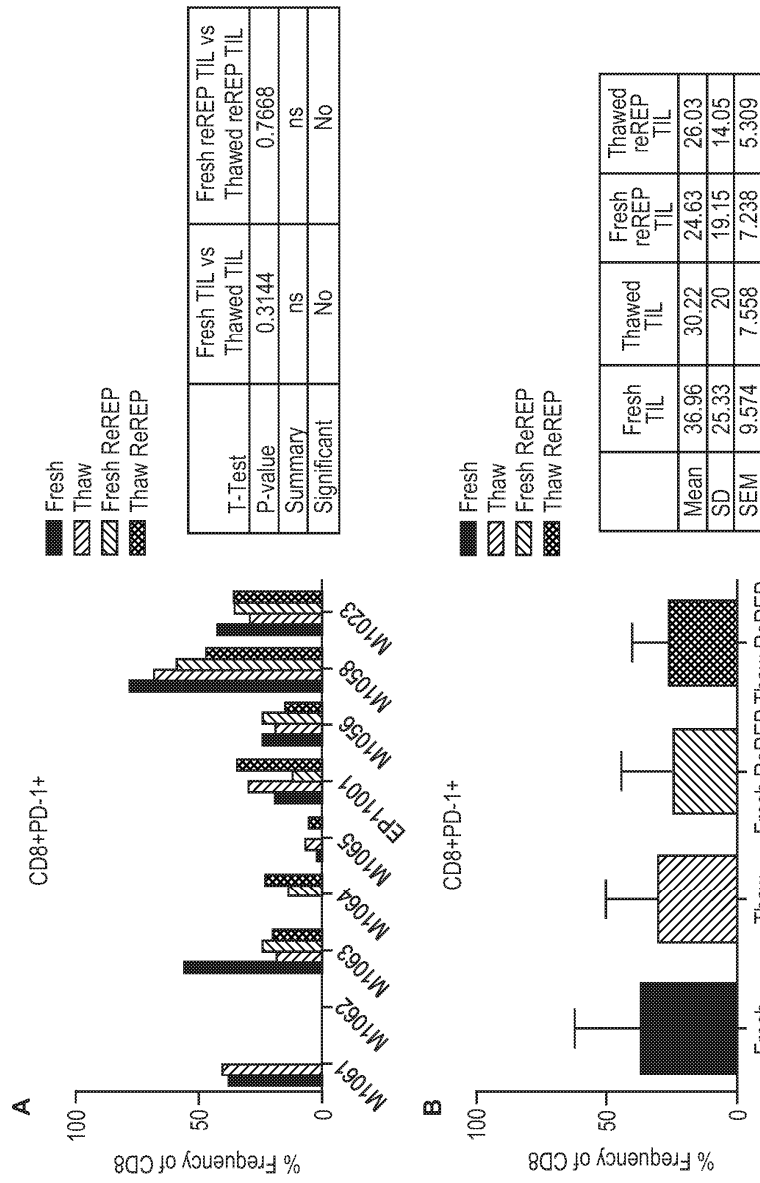


Figure 54

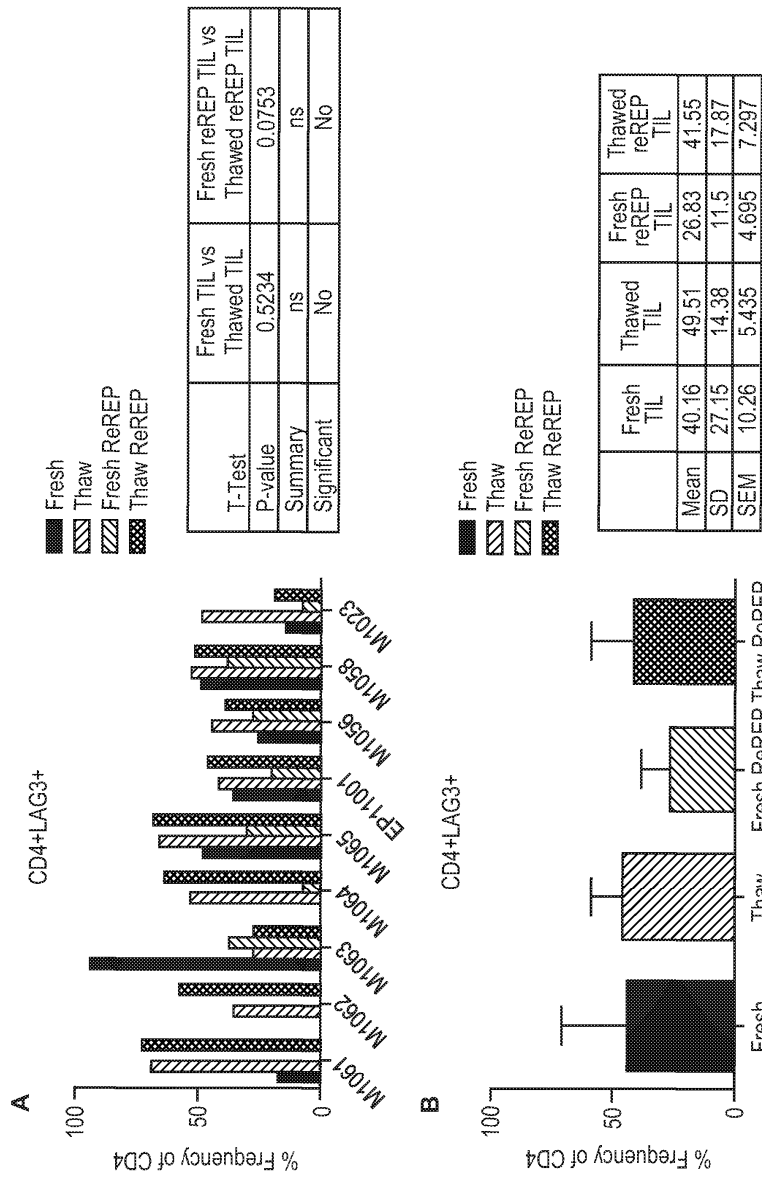


Figure 55

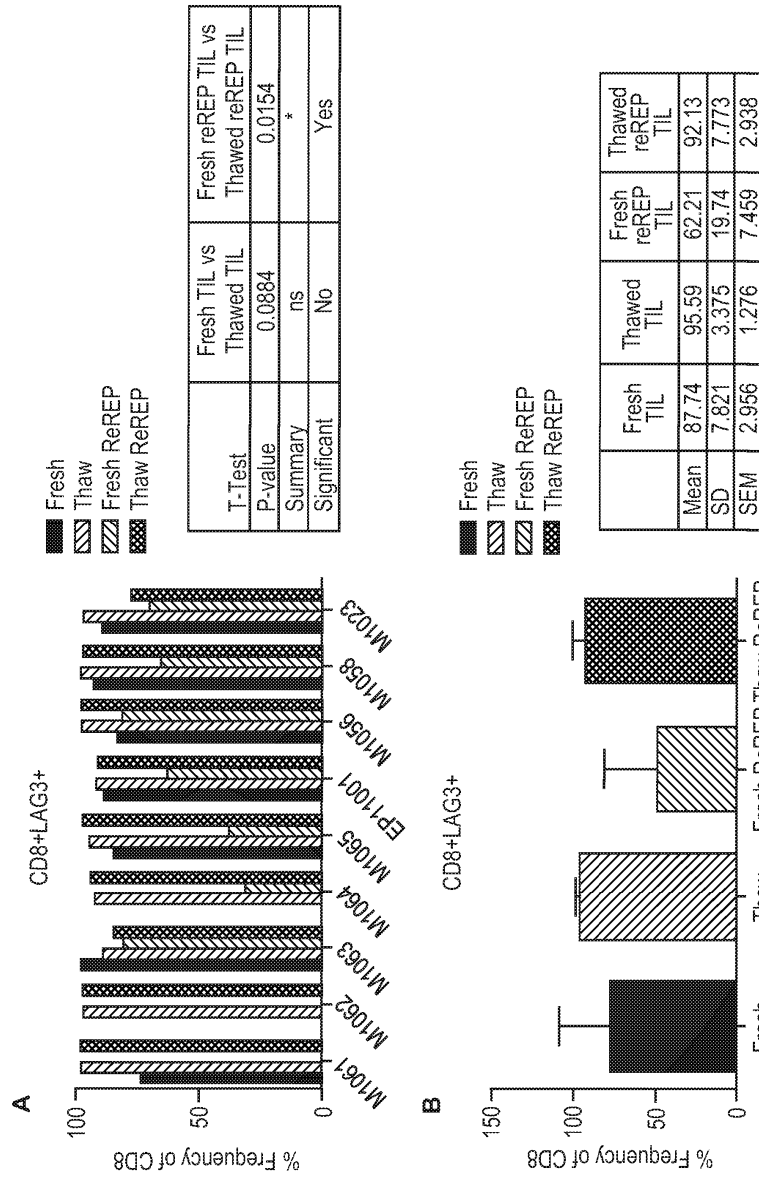


Figure 56

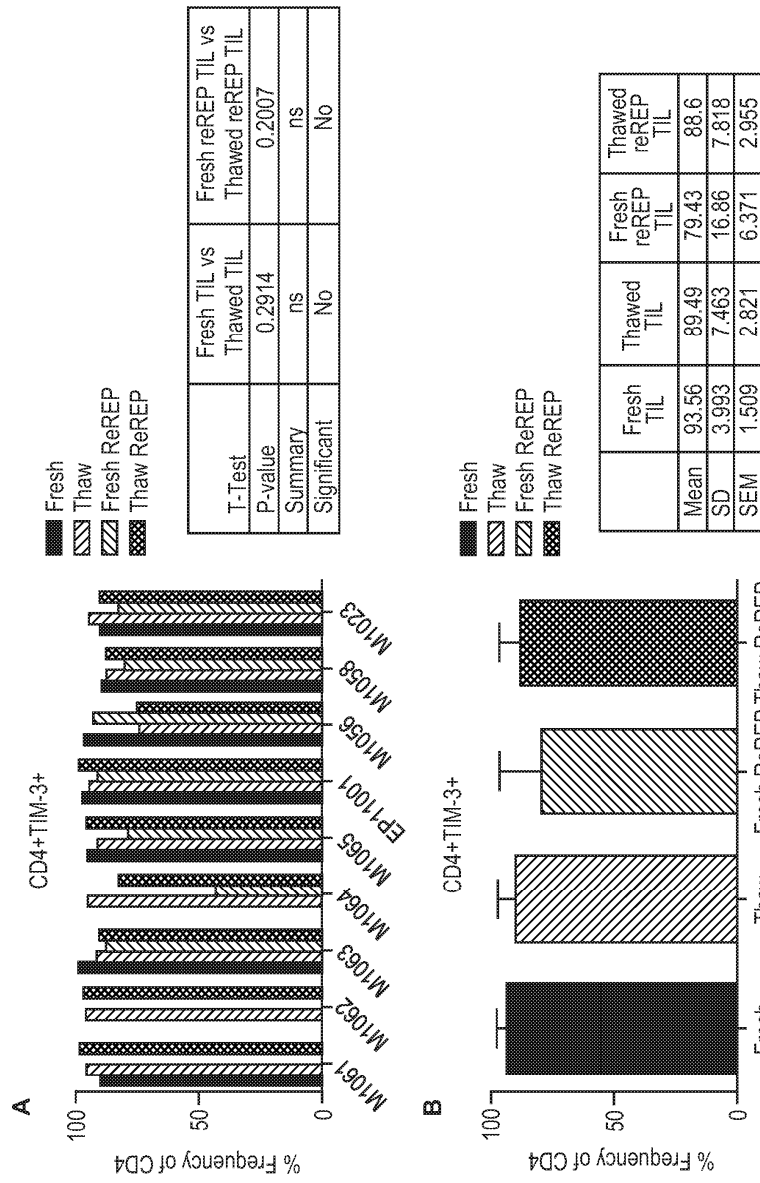


Figure 57

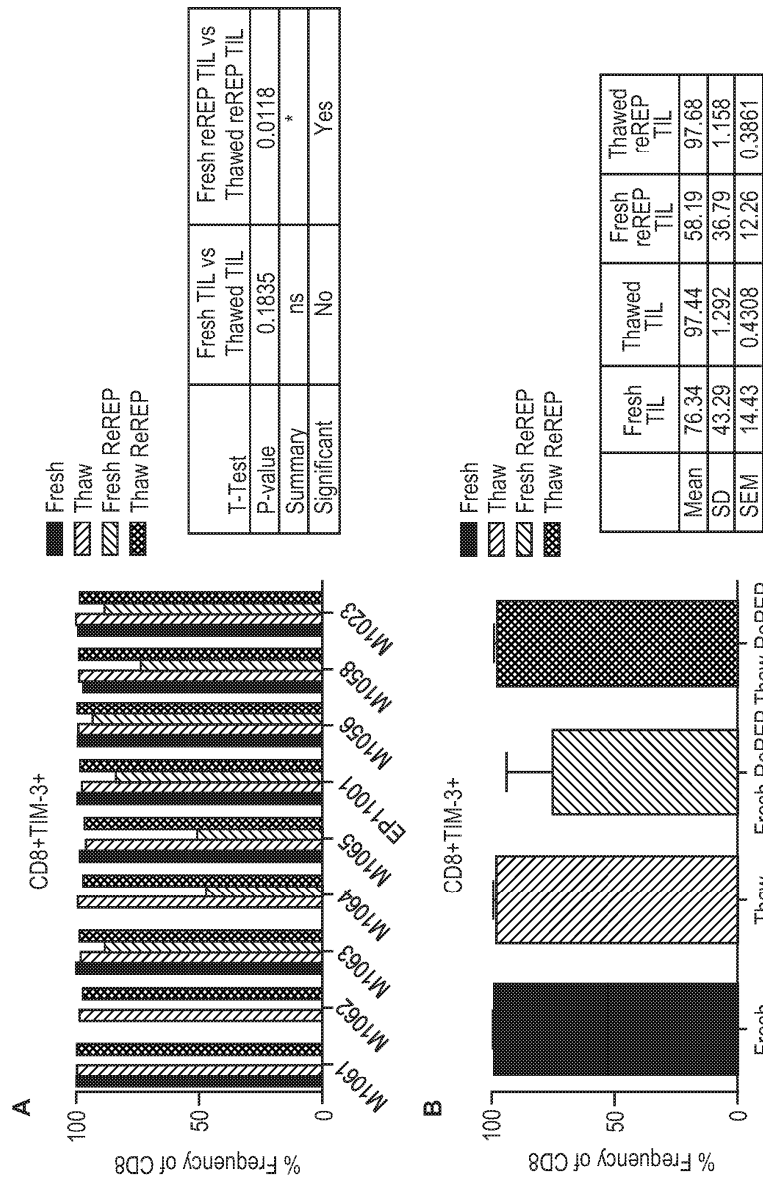


Figure 58

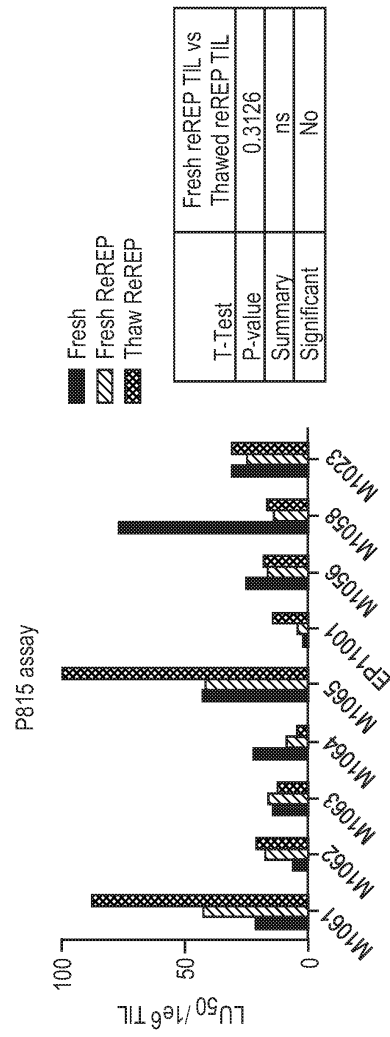


Figure 59

T-Test	Fresh reREP TIL vs Thawed reREP TIL
P-value	0.3126
Summary	ns
Significant	No

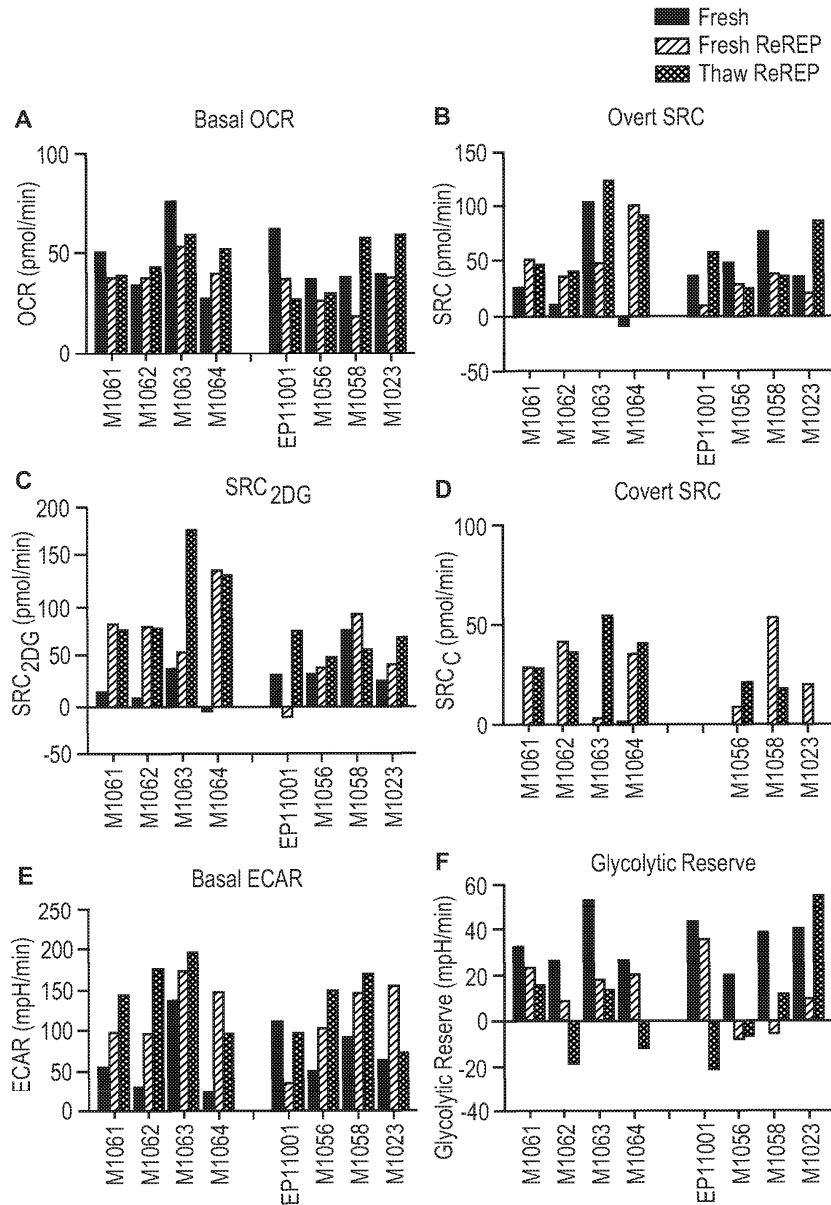


Figure 60

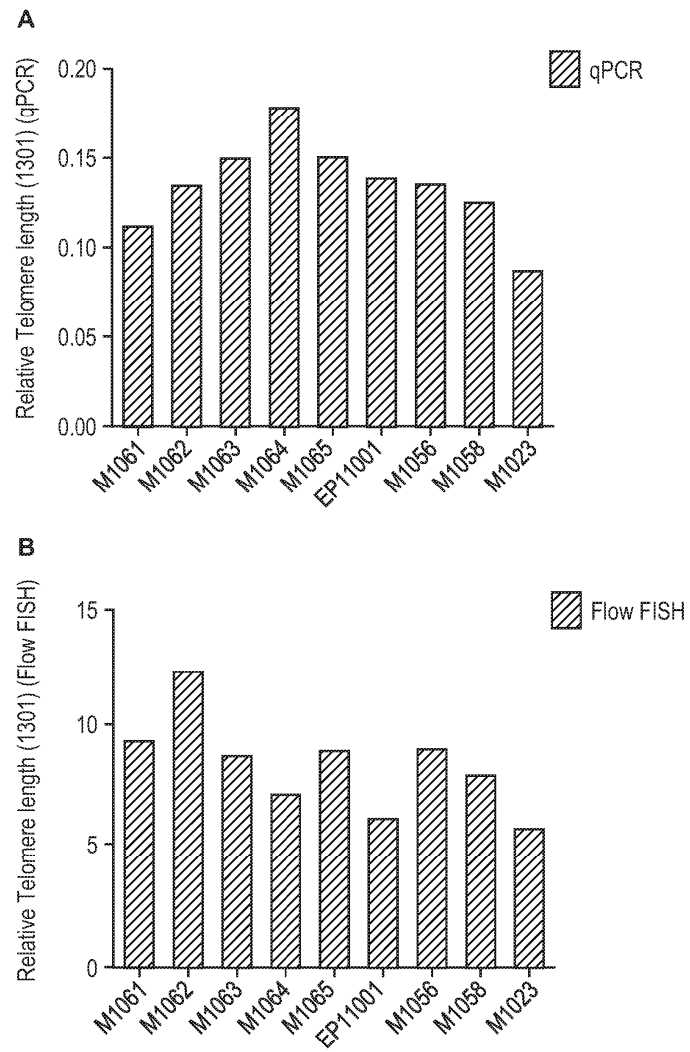
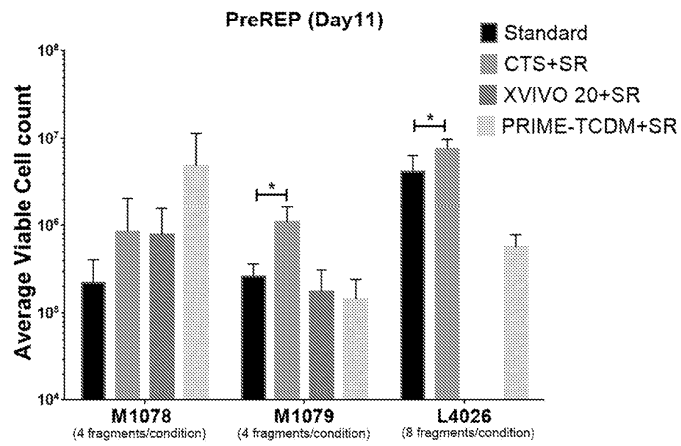


Figure 61

Figure 62

A)



B)

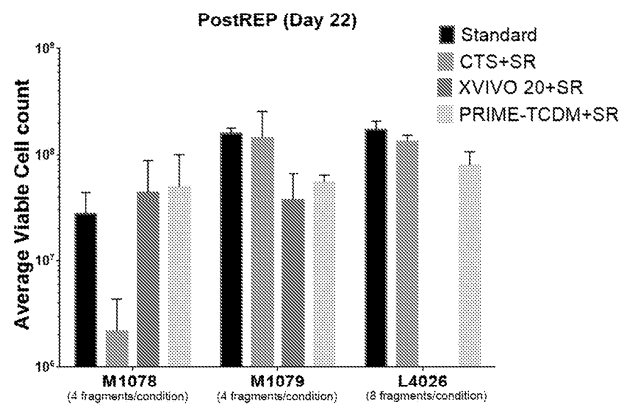
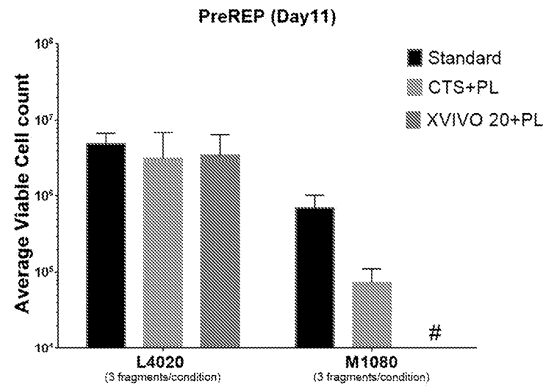


Figure 63

A)



B)

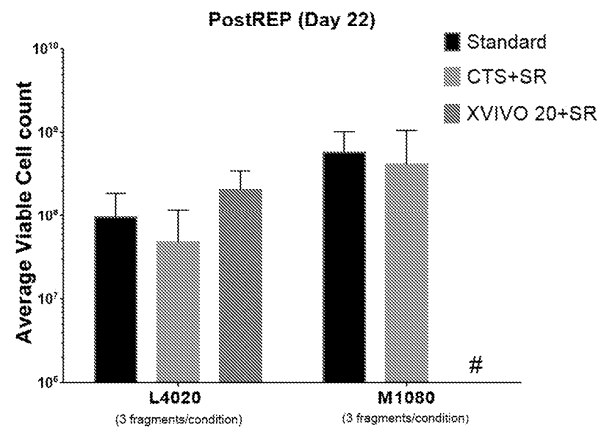


Figure 64A

A)

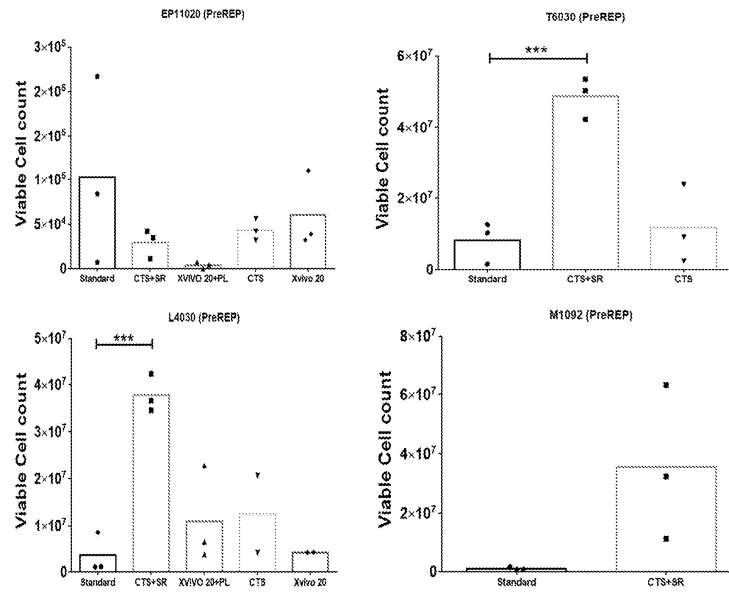


Figure 64B

B)

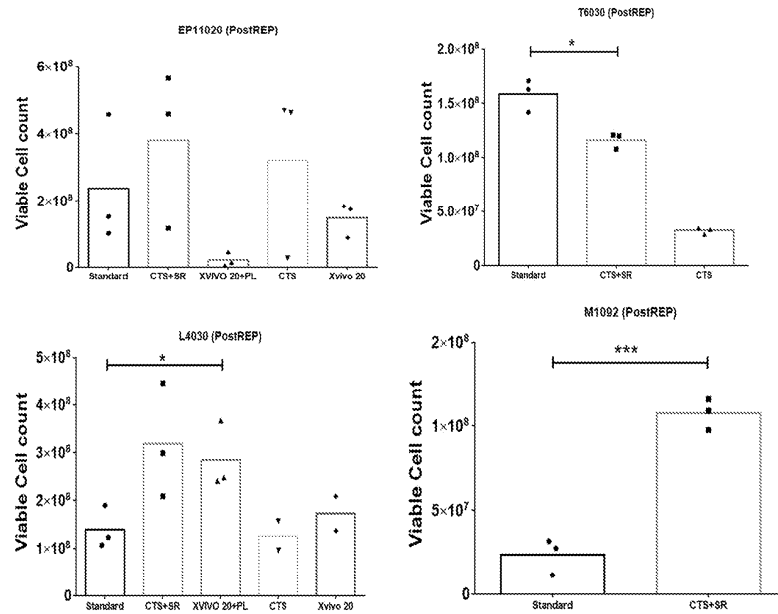


Figure 65A &amp; 65B

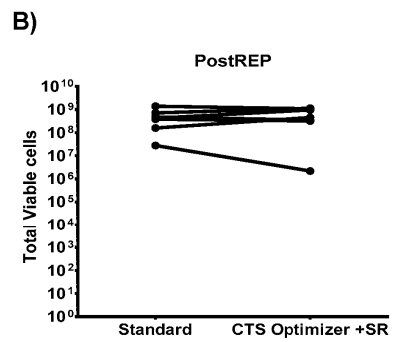
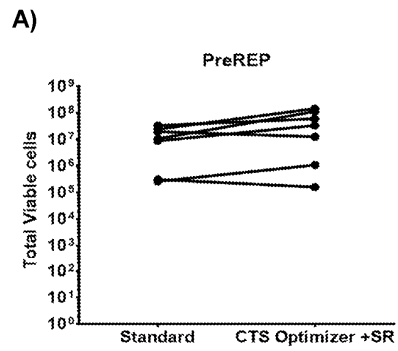


Figure 65C

C)

	Pre-REP Cell count		Post-REP Cell count	
	Standard	CTS Optimizer +SR	Standard	CTS Optimizer +SR
M1078	8.82E+07	3.38E+08	3.46E+09	2.73E+08
M1079	2.60E+06	1.09E+07	1.99E+10	5.61E+10
M1080				
L4020	1.98E+08	1.27E+08	4.75E+10	3.99E+10
L4026	1.68E+08	3.02E+08	8.63E+10	6.69E+10
L4030	7.05E+07	7.48E+08	2.63E+10	5.96E+10
EP11020	2.04E+06	1.06E+06	4.44E+10	7.14E+10
T6030	1.61E+08	9.64E+08	2.98E+10	2.18E+10
M1092	2.00E+07	7.05E+08	4.41E+09	2.02E+10

Figure 66

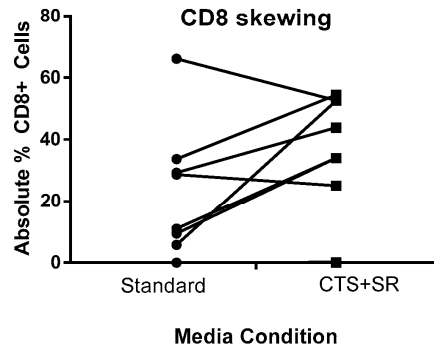
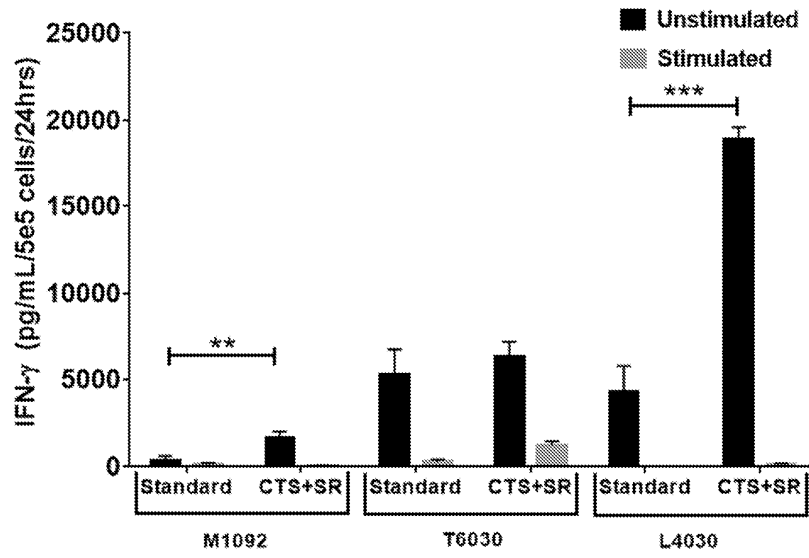


Figure 67



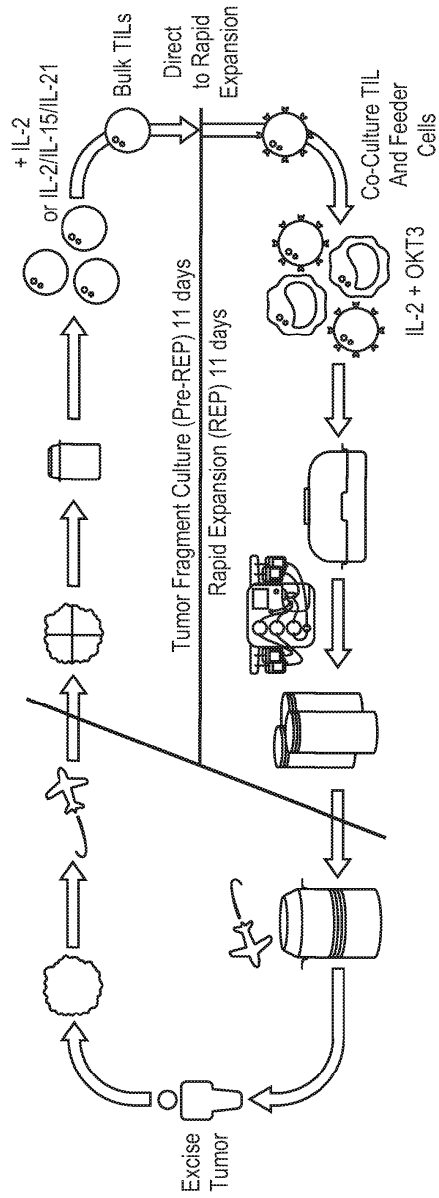


Figure 68

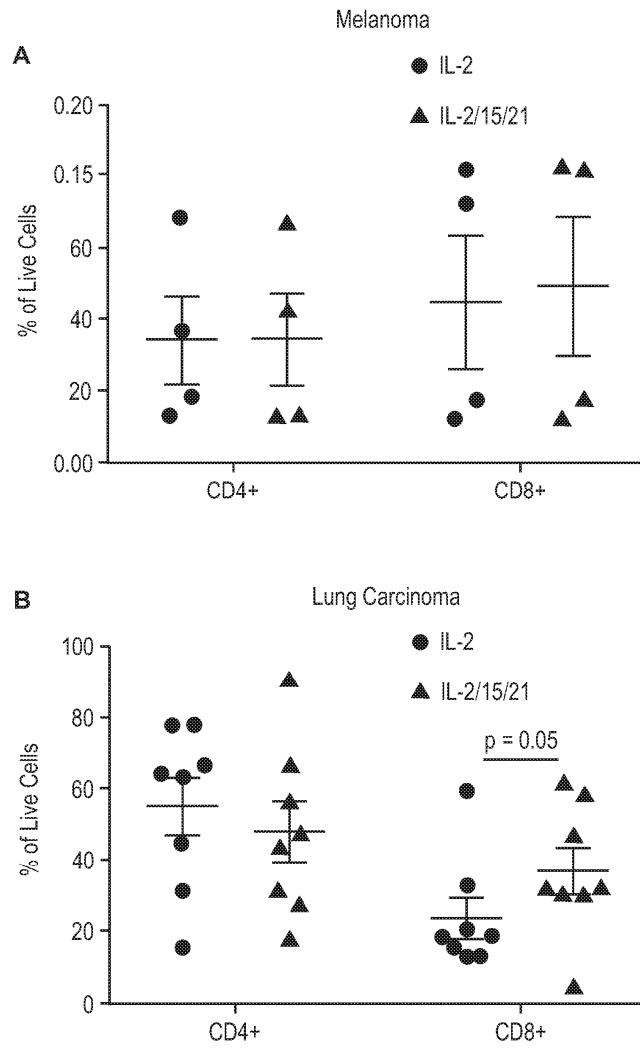


Figure 69

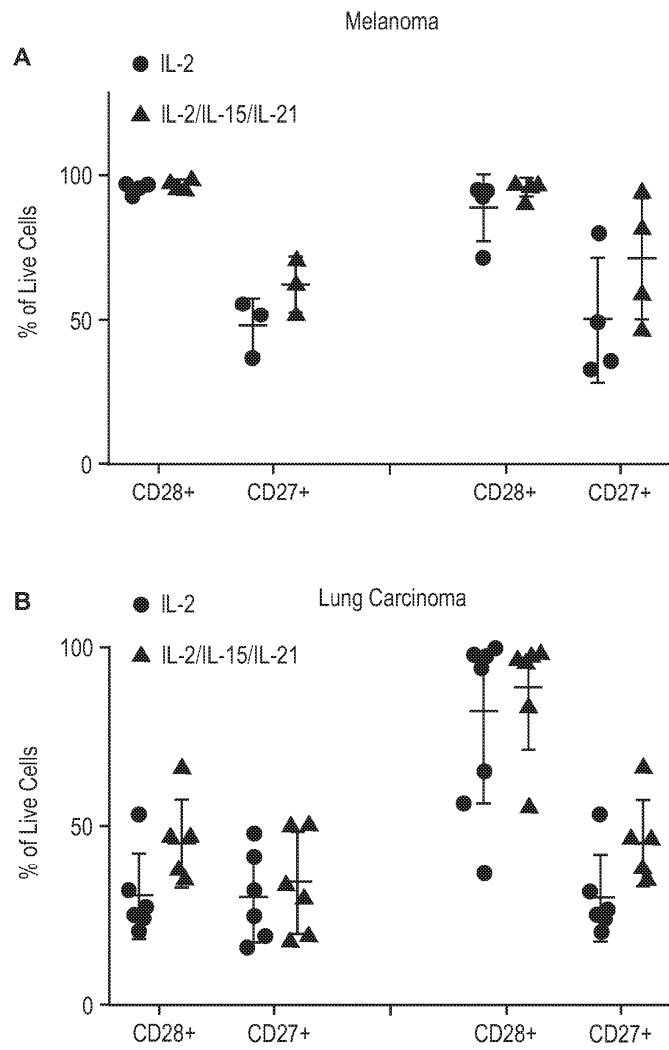


Figure 70

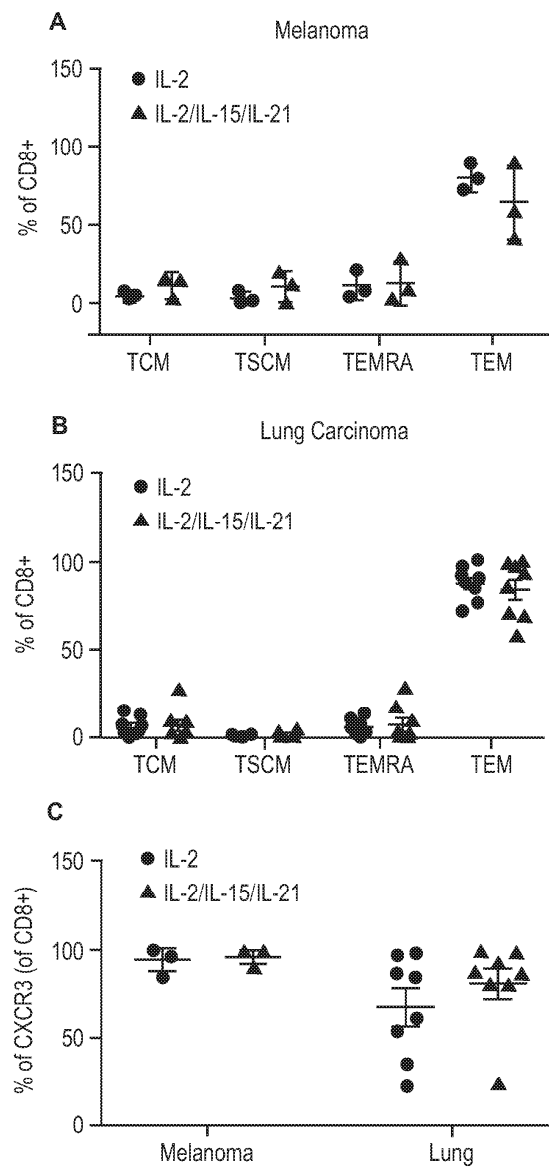


Figure 71

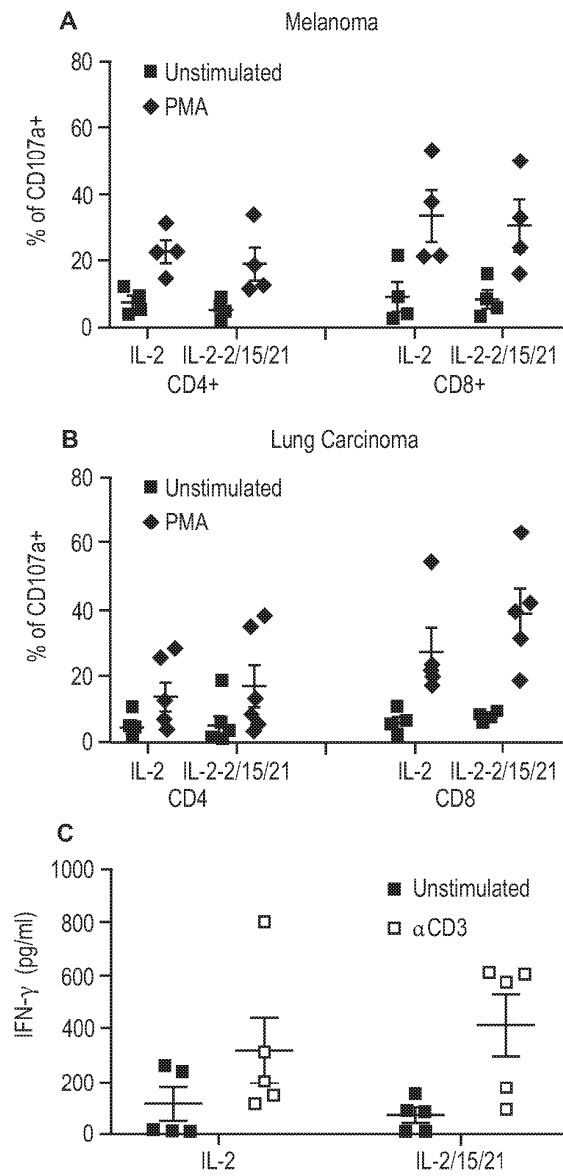


Figure 72

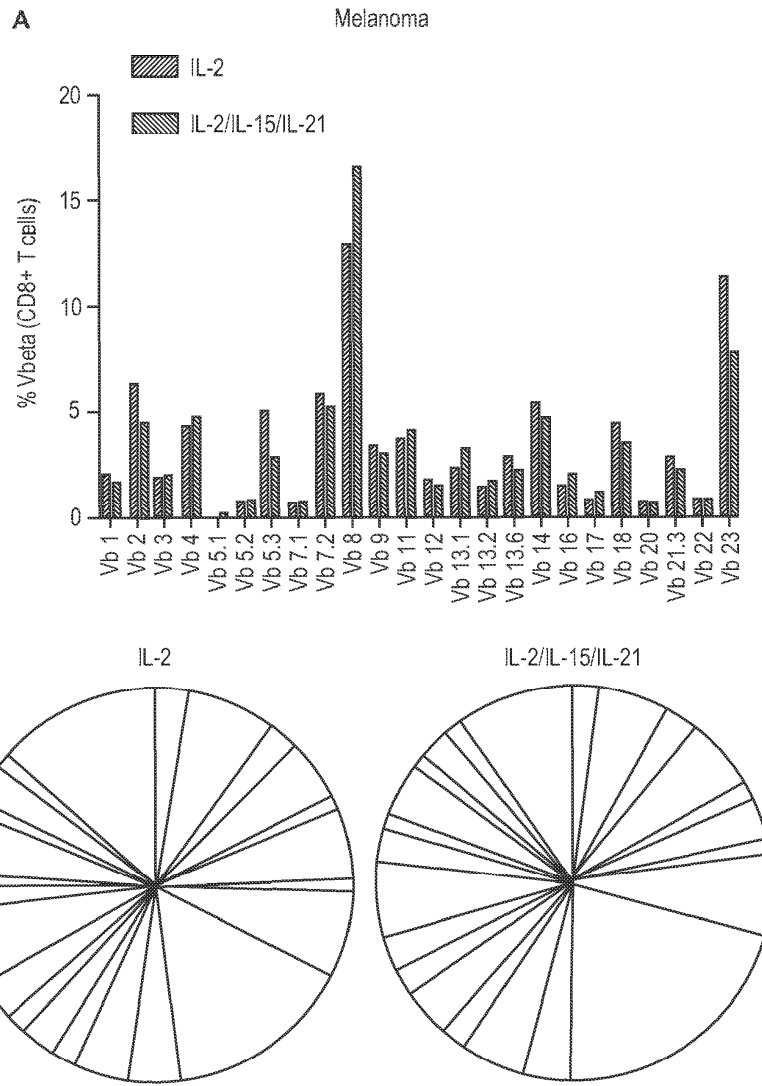


Figure 73A

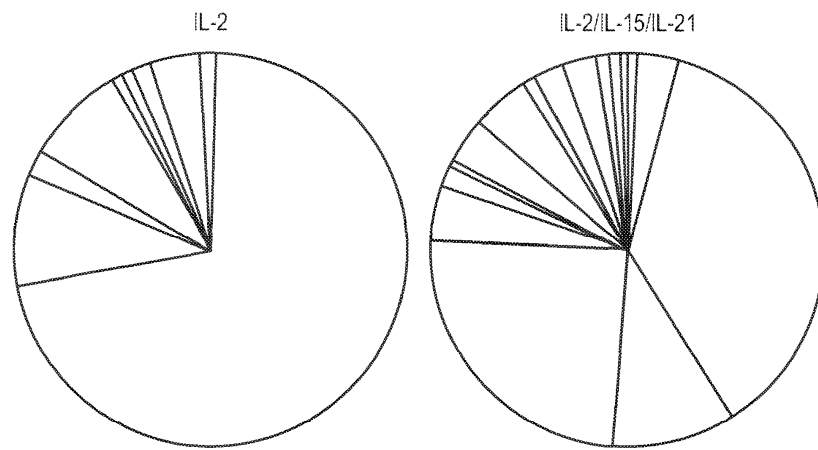
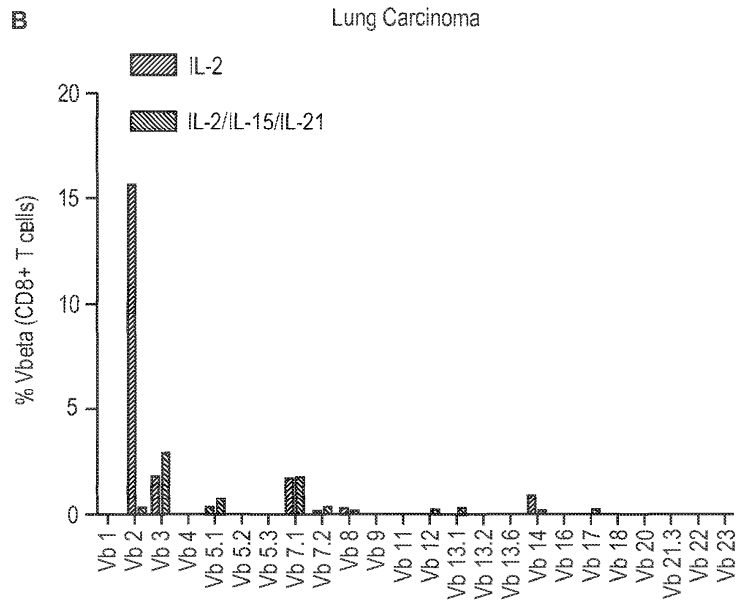


Figure 73B

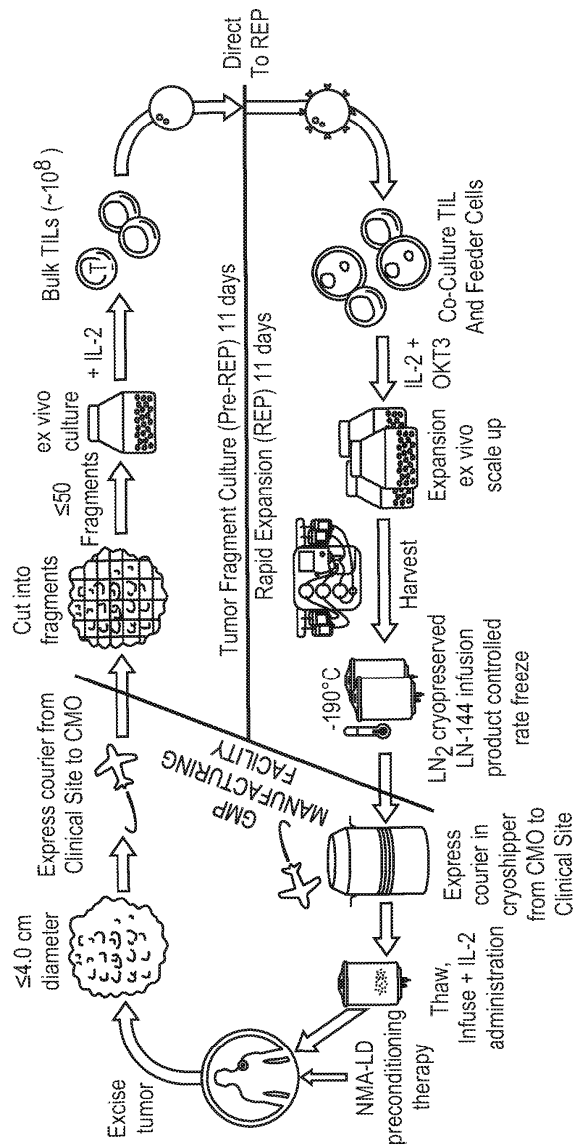


Figure 74

Figure 75

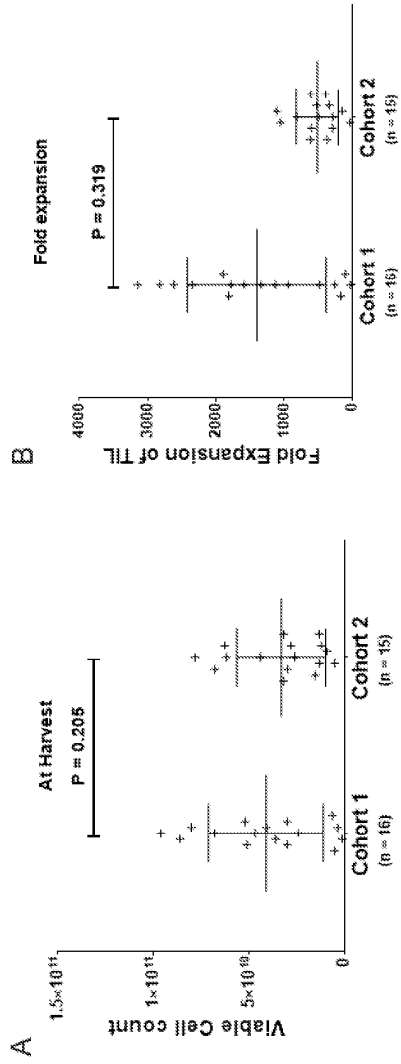


Figure 76

%CD45 CD3: Gen 1 vs. Gen 2

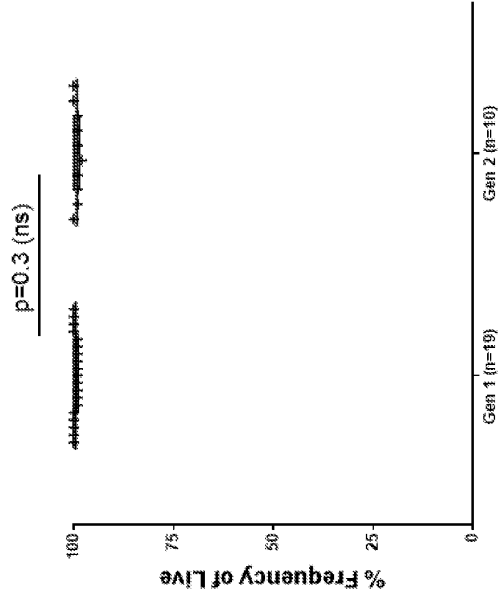


Figure 77

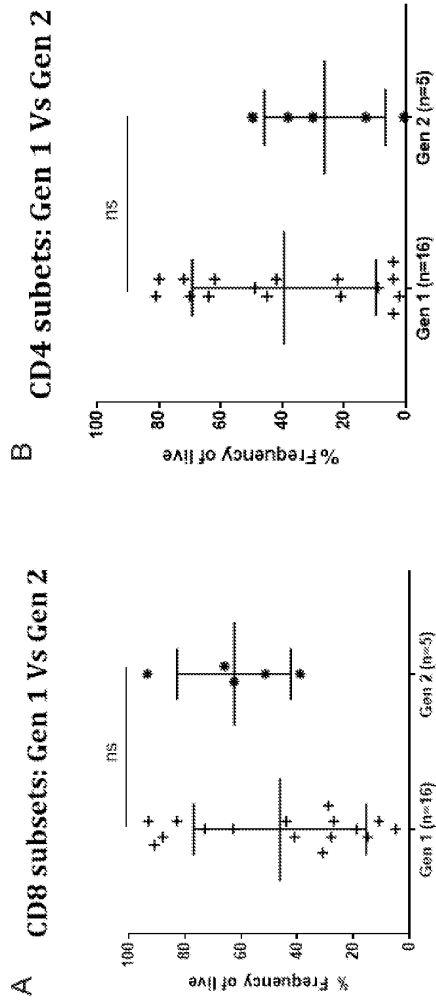


Figure 78

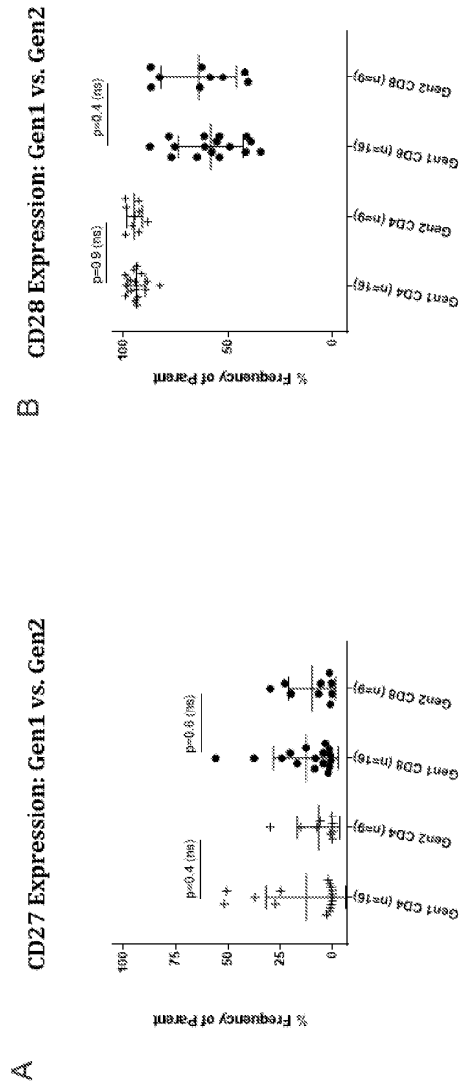


Figure 79

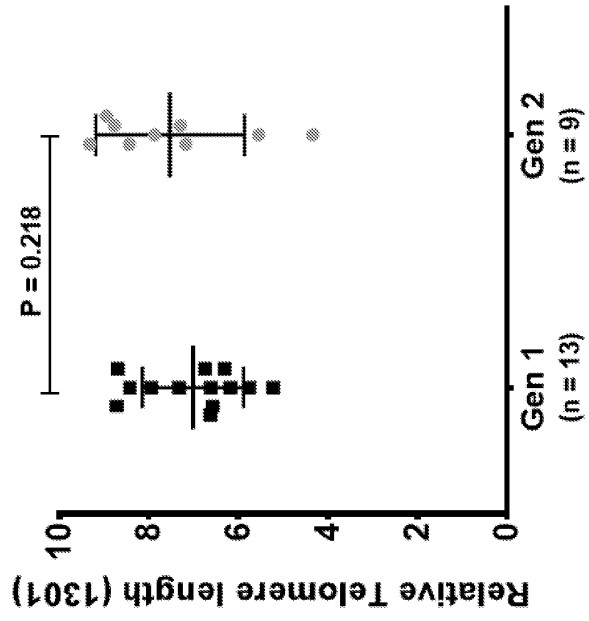


Figure 80

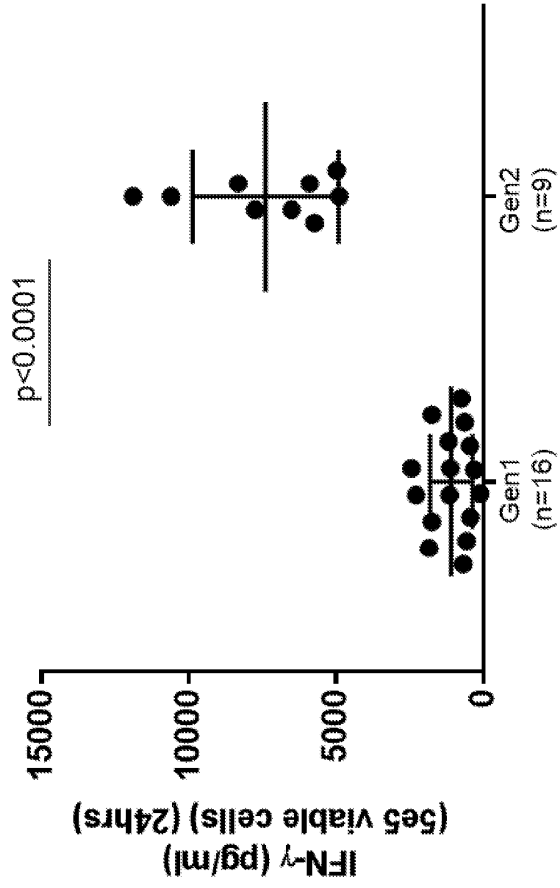
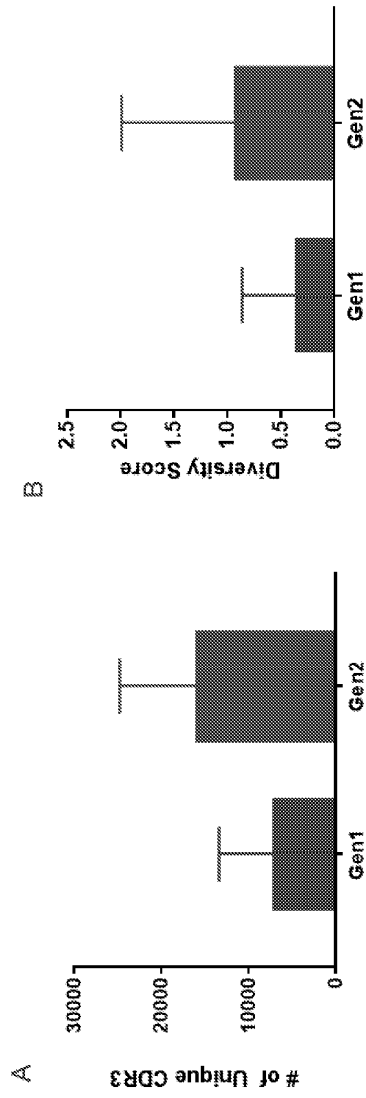


Figure 81



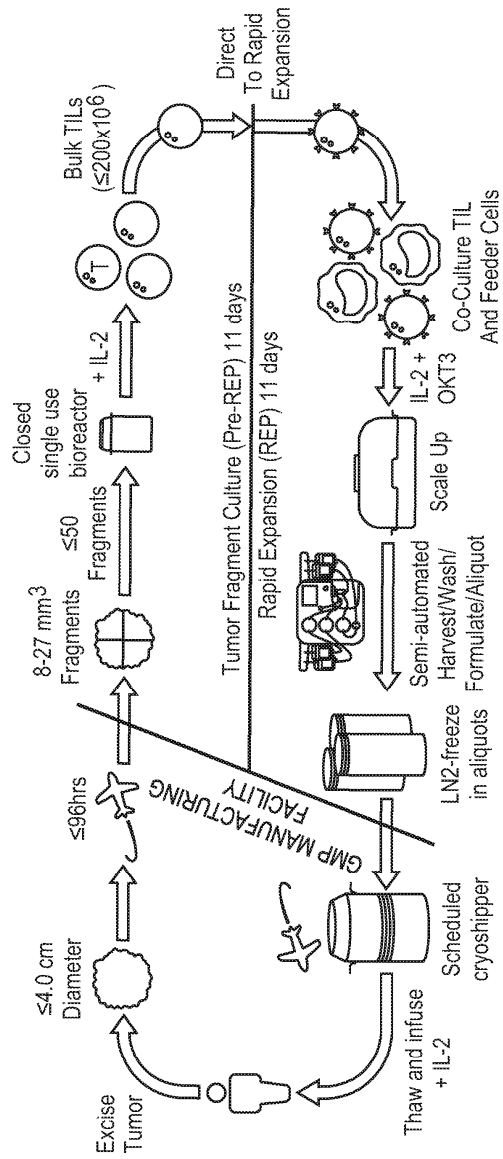


Figure 82

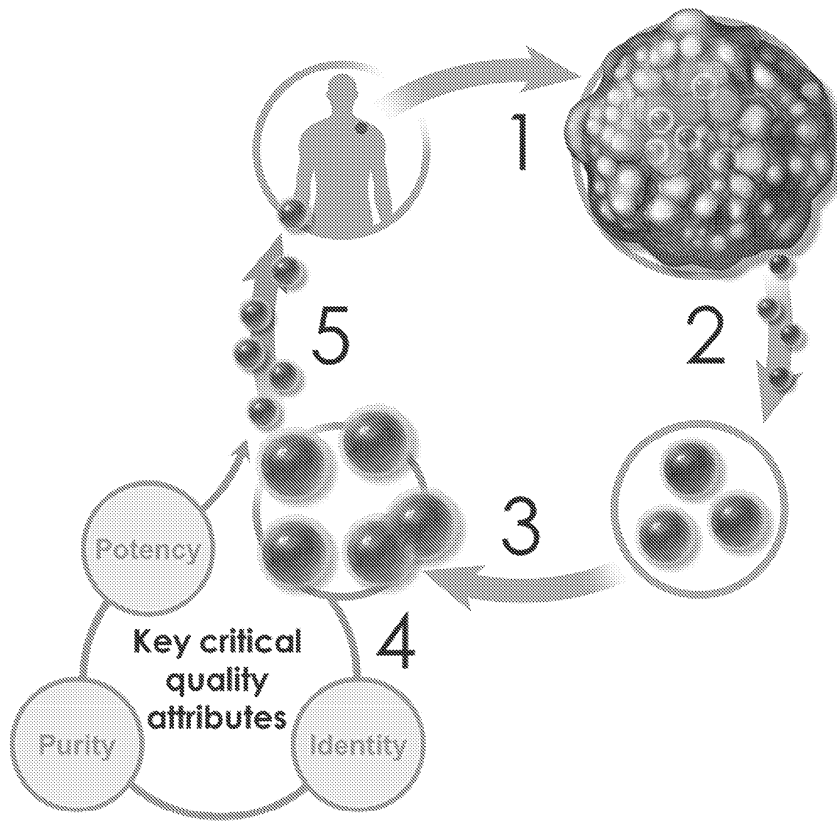
**Figure 83**

<b>Process 1C: 43-55 Days for Steps A - E</b>	<b>Process 2A: about 22 days from Steps A - E</b>
<p><b>1. <u>STEP A</u></b> Obtain Patient Tumor Sample</p>	<p><b>2. <u>STEP A</u></b> Obtain Patient Tumor Sample</p>
<p><b>3. <u>STEP B</u></b> Fragmentation and First Expansion 11 days to 21 days</p>	<p><b>3. <u>STEP B</u></b> Fragmentation and First Expansion 3 days to 14 days</p>
<p><b>3. <u>STEP C</u></b> First Expansion to Second Expansion Transition Optional Storage until Selection</p>	<p><b>4. <u>STEP C</u></b> First Expansion to Second Expansion Transition No Storage and Closed System</p>
<p><b>5. <u>STEP D</u></b> Second Expansion IL-2, OKT-3, antigen-presenting feeder cells Optionally repeat one or more times</p>	<p><b>5. <u>STEP D</u></b> Second Expansion IL-2, OKT-3, and antigen-presenting feeder cells Closed System</p>
<p><b>6. <u>STEP E</u></b> Harvest TILS from Step D</p>	<p><b>7. <u>STEP E</u></b> Harvest TILS from Step D Closed System</p>
<p><b>6. <u>STEP F</u></b> Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag</p>	<p><b>8. <u>STEP F</u></b> Final Formulation and/or Transfer to Infusion Bag (optionally cryopreserve)</p>

Figure 84

Process Step	Process 1C Embodiment	Process 2A Embodiment	Advantages
<b>Pre-REP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4 fragments per 10 GREX-10 flasks</li> <li>11-21 day duration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>40 fragments per 1 GREX-100M flask</li> <li>11 day duration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increased tumor fragments per flask</li> <li>Shortened culture time</li> <li>Reduced number of steps</li> <li>Amenable to closed system</li> </ul>
<b>Pre-REP to REP Transition</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pre-REP TIL are frozen until phenotyped for selection then thawed to proceed to the REP (~day 30)</li> <li>REP requires <math>&gt;40 \times 10^6</math> TIL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pre-REP TIL directly move to REP on day 11</li> <li>REP requires 25-<math>200 \times 10^6</math> TIL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Shortened pre-REP-to-REP process</li> <li>Reduced number of steps</li> <li>Eliminated phenotyping selection</li> <li>Amenable to closed system</li> </ul>
<b>REP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6 GREX-100M flasks on REP day 0</li> <li><math>5 \times 10^6</math> TIL and <math>5 \times 10^8</math> PBMC feeders per flask on REP day 0</li> <li>Split to 18-36 flasks on REP day 7</li> <li>14 day duration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 GREX-500M flask on day 11</li> <li><math>25-200 \times 10^6</math> TIL and <math>5 \times 10^9</math> PBMC feeders on day 11</li> <li>Split to <math>\leq 6</math> GREX-500M flasks on day 16</li> <li>11 day duration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduced number of steps</li> <li>Shorter REP duration</li> <li>Closed system transfer of TIL between flasks</li> <li>Closed system media exchanges</li> </ul>
<b>Harvest</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>TIL harvested via centrifugation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>TIL harvested via LOVO automated cell washing system'</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduced number of steps</li> <li>Automated cell washing</li> <li>Closed system</li> <li>Reduced loss of product during wash</li> </ul>
<b>Final Formulation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fresh product in Hypothermosol</li> <li>Single infusion bag</li> <li>Limited shipping stability</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cyropreserved product in PlasmaLyte-A + 1% HSA and CS10 stored in LN<sub>2</sub></li> <li>Multiple aliquots</li> <li>Longer shipping stability</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Shipping flexibility</li> <li>Flexible patient scheduling</li> <li>More timely release testing</li> </ul>
<b>Overall Estimated Process Time</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>43-55 days</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>22 days</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Faster turnaround to patient</li> </ul>

Figure 85



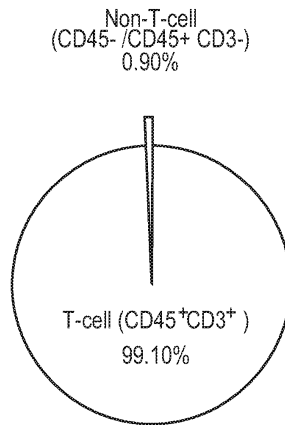


Figure 86A

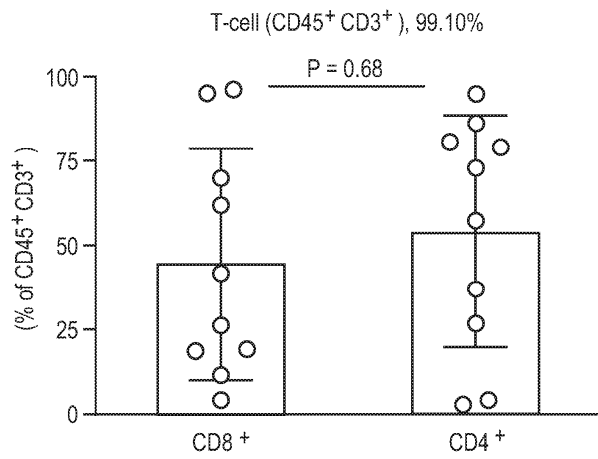


Figure 86B

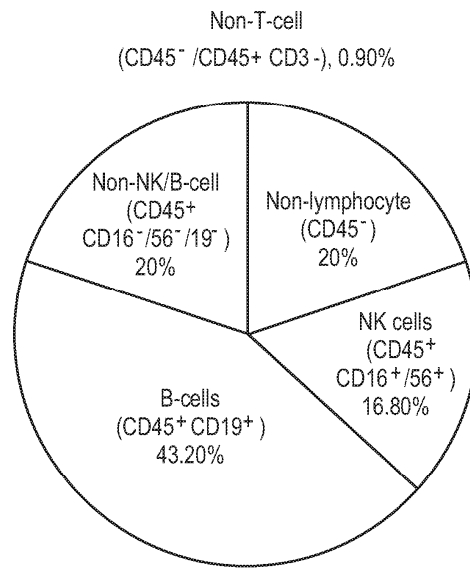


Figure 86C

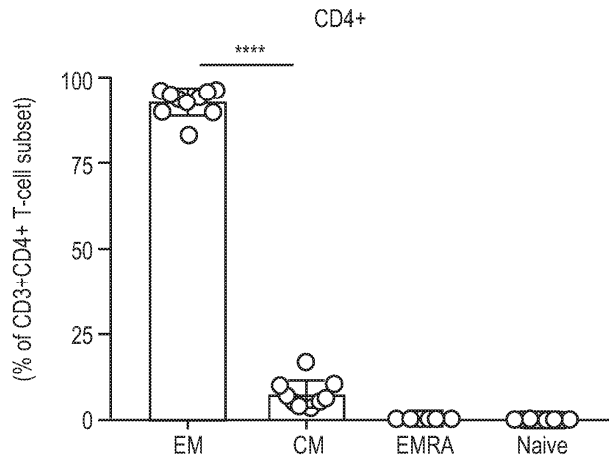


Figure 87A

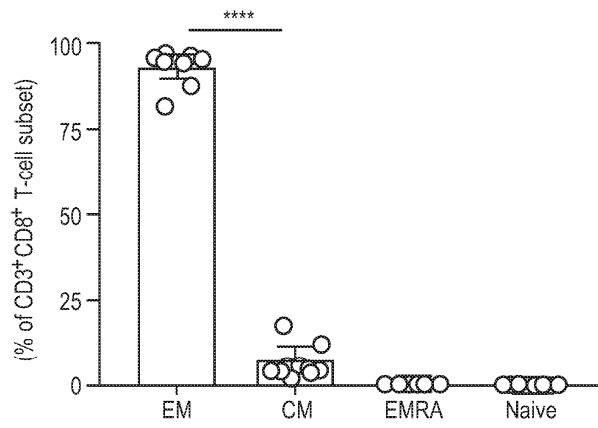


Figure 87B

97/136

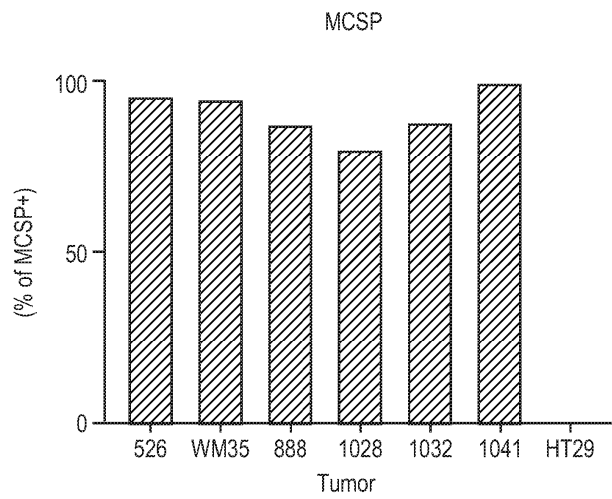


Figure 88A

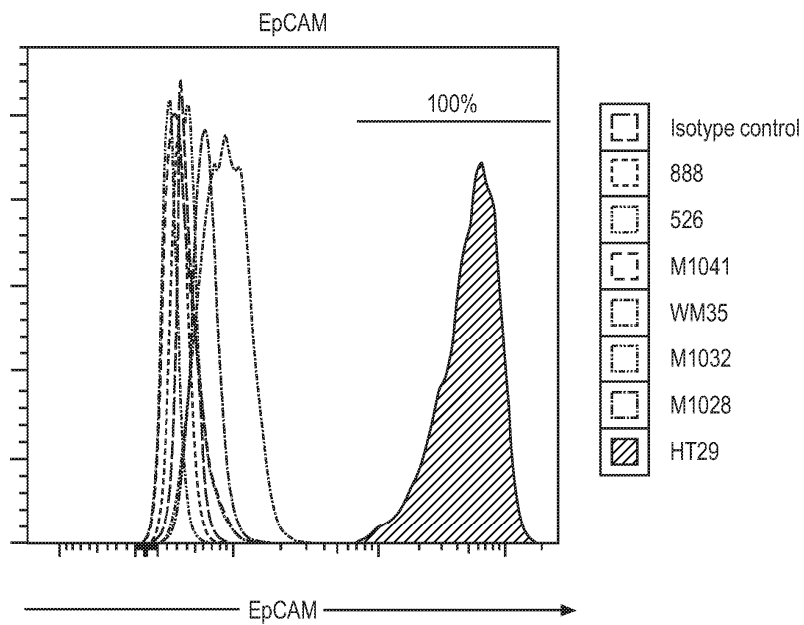


Figure 88B

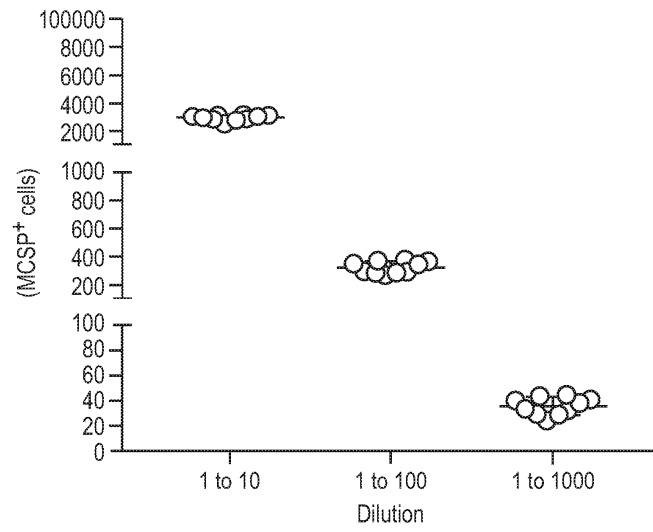


Figure 89A

DILUTION	AV	SD	UPPER LIMIT (AV + 3SD)	LOWER LIMIT (AV - 3SD)
1 to 10	2976	203	3585	2367
1 to 100	322	39	440	204
1 to 1000	36	7	56	16

Figure 89B

DILUTION	RANGE (UPPER- LOWER)	EXP#1 (AV)	EXP#2 (AV)	EXP#3 (AV)
1 to 10	3585-2367	2814	3282	2367
1 to 100	440-204	227	320	239
1 to 1000	56-16	27	25	32

Figure 90A

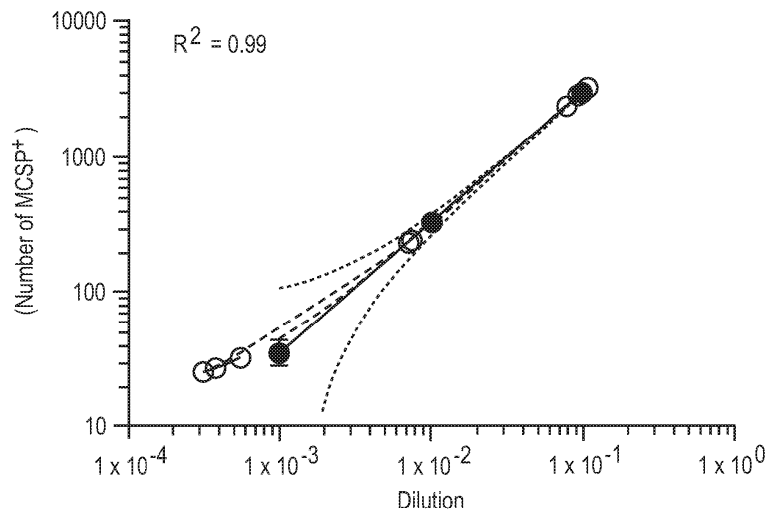


Figure 90B

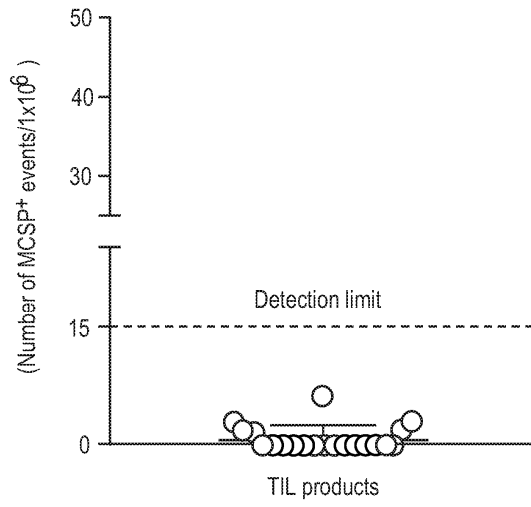
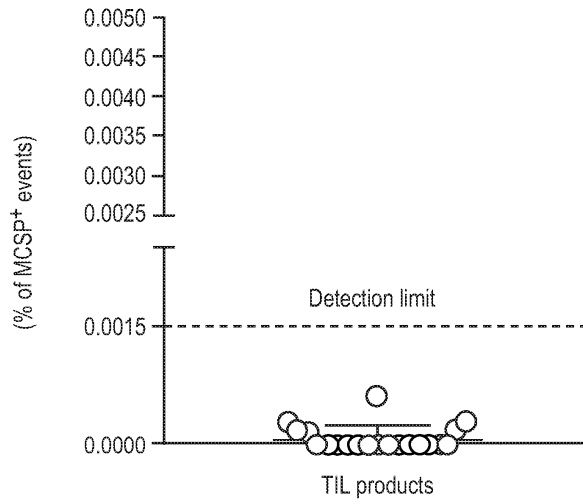


Figure 91A



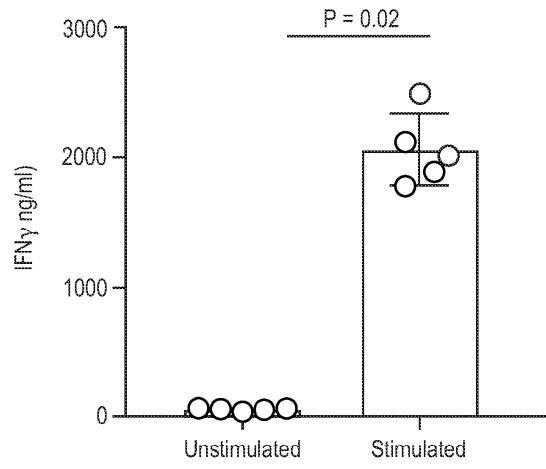


Figure 92

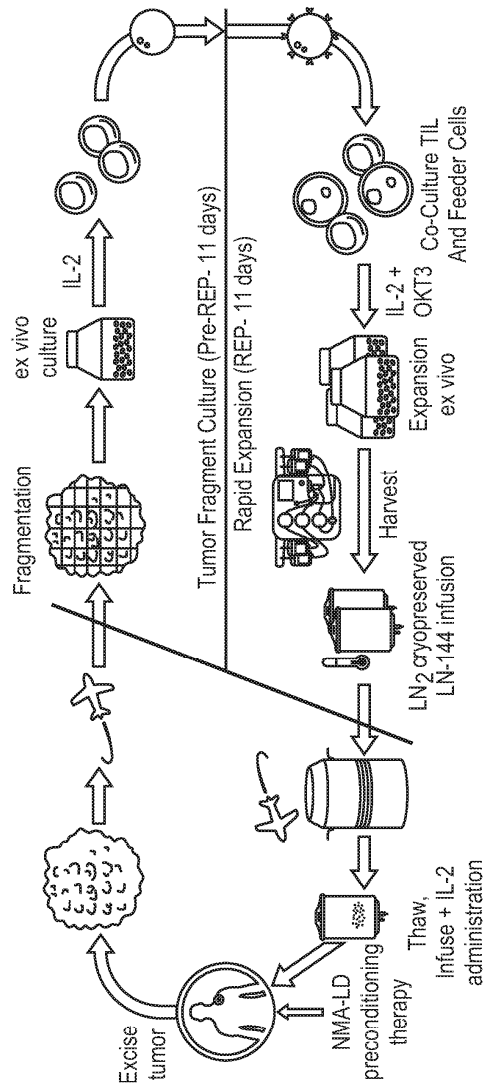


Figure 93

**Figure 94**

PROCESS STEP	GEN 1	GEN 2	IMPACT
<b>Fragment Culture</b>	≤21 days, multiple bioreactors, multiple operator interventions	≤11 days, single closed bioreactor, no intervention	Shortens culture, reduces interventions
<b>TIL selection</b>	IL-2 expanded TIL cryopreserved, tested, selection based on phenotype, thaw, rest, co-culture	Bulk TIL direct to co-culture	Reduces steps, eliminates testing, increases clonal diversity
<b>Harvest/ Wash</b>	Manual volume reduction and harvest.  Manual wash and concentration	Closed semi-automated volume reduction and harvest. Automated wash and concentration	Reduces operator interventions, reduces processing time, maintains functionally closed system
<b>Formulation</b>	Fresh hypothermic product (2- 8°C)	Cryopreserved product (≤ -150°C)	Allows for global trials through increased flexibility in shipping and patient scheduling
<b>Manufacturing Time</b>	38 day process time	22 day process time	Turnaround to patient, clean room throughput, lower cost of goods

Figure 95A

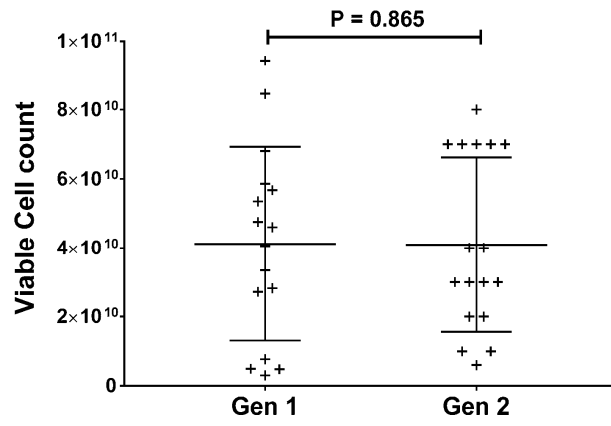


Figure 95B

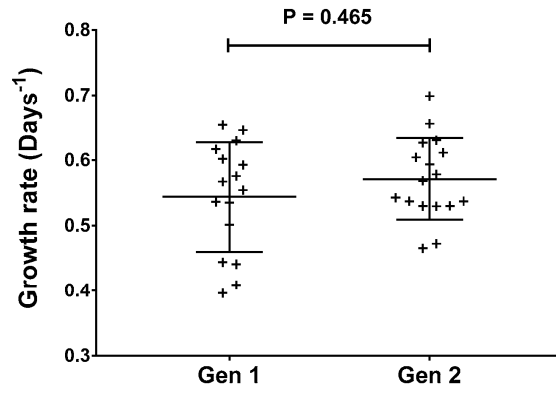




Figure 96B

CD27 Expression: Gen1 vs. Gen2

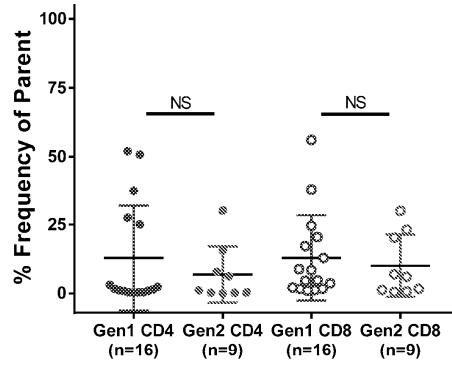


Figure 96C

CD28 Expression: Gen1 vs. Gen2

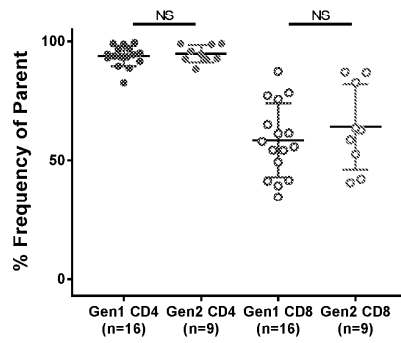


Figure 97

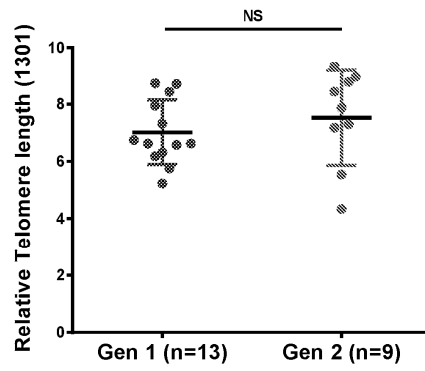


Figure 98

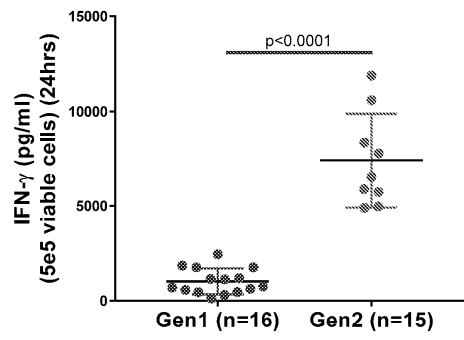


Figure 99A

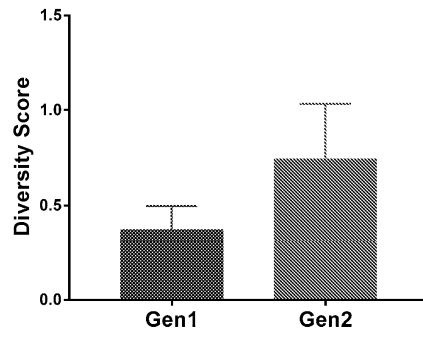
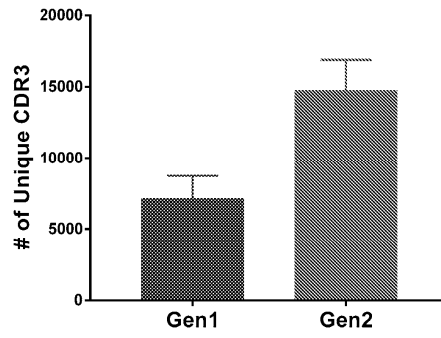
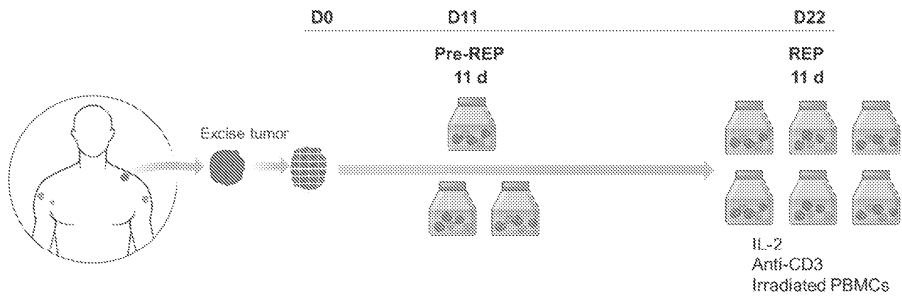


Figure 99B



**Figure 100**



**Figure 101**

Tumor Histology	# of studies demonstrating >20% enhancement of growth using IL-2/IL-15/IL-21 (compared to IL-2)
Melanoma	1/5 (20%)
Lung	3/8 (38%)
Colorectal	7/11 (63%)
Cervical	1/1 (100%)
Pancreatic	2/2 (100%)
Glioblastoma	1/1 (100%)
Triple Negative Breast	1/2 (50%)

Figure 102A

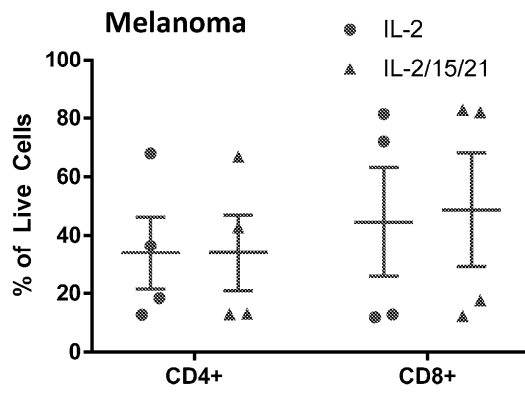


Figure 102B

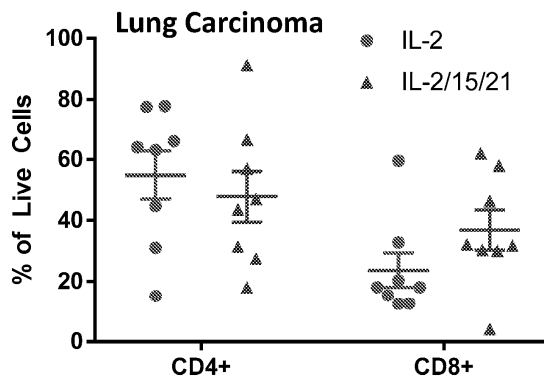


Figure 103A

Melanoma

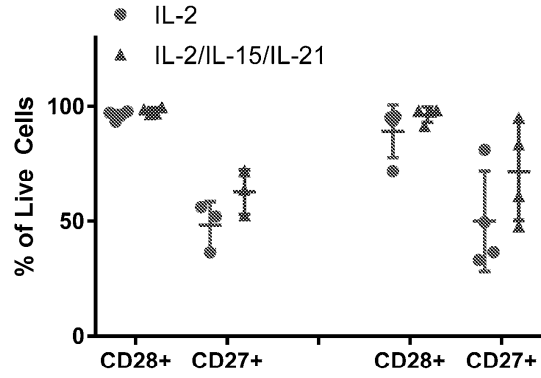


Figure 103B

Lung Carcinoma

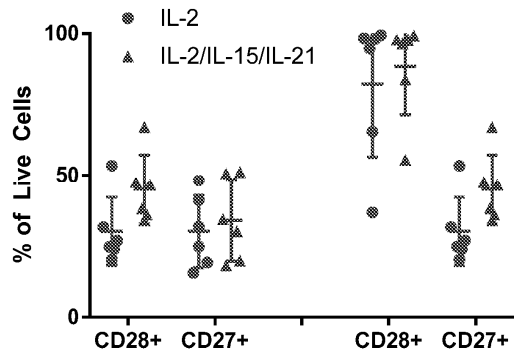


Figure 104A

Melanoma

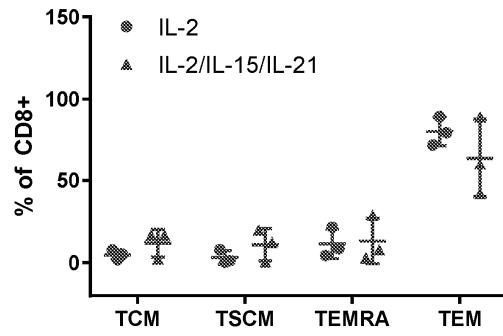
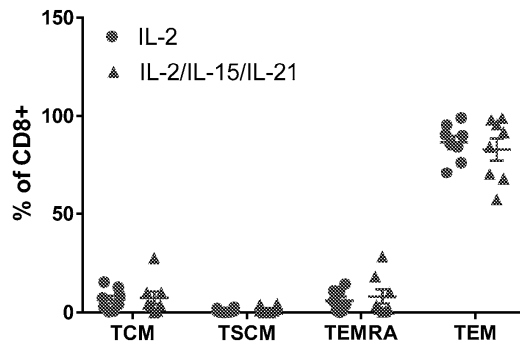


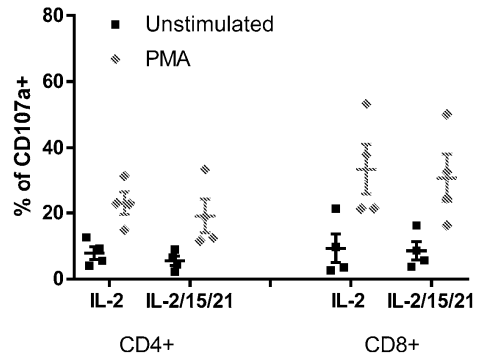
Figure 104B

Lung Carcinoma



**Figure 105A**

**Melanoma**



**Figure 105B**

**Lung Carcinoma**

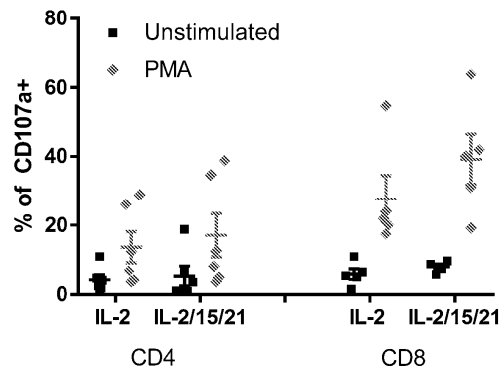


Figure 105C

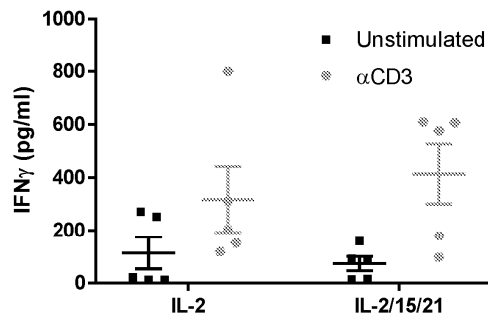


Figure 106A

Melanoma

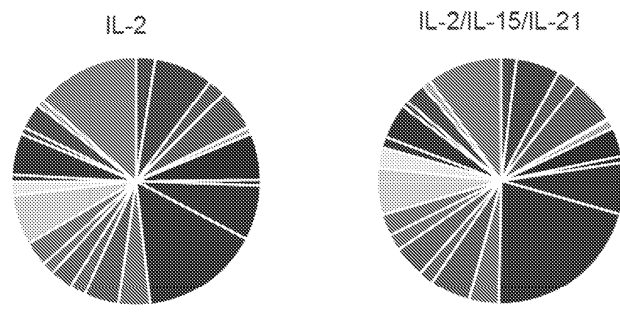
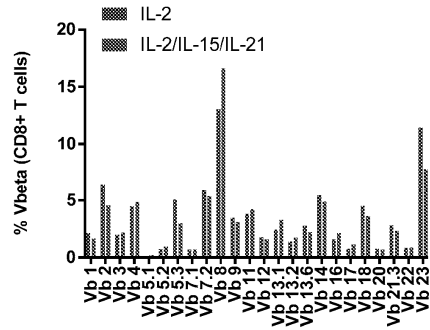
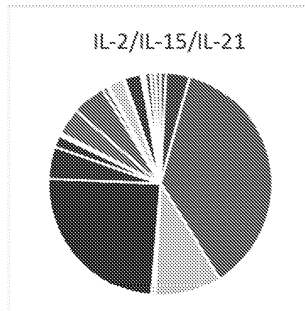
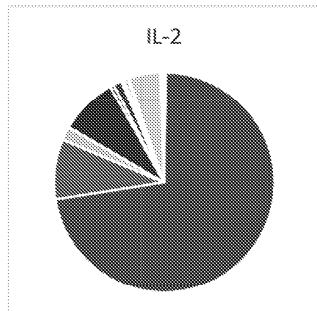
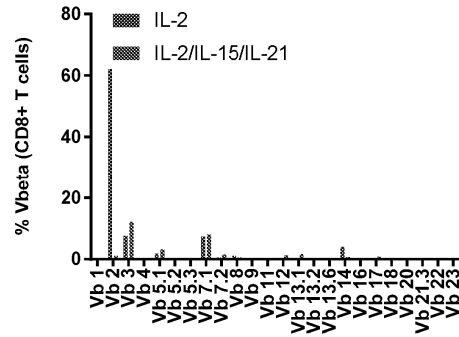


Figure 106B

Lung Carcinoma



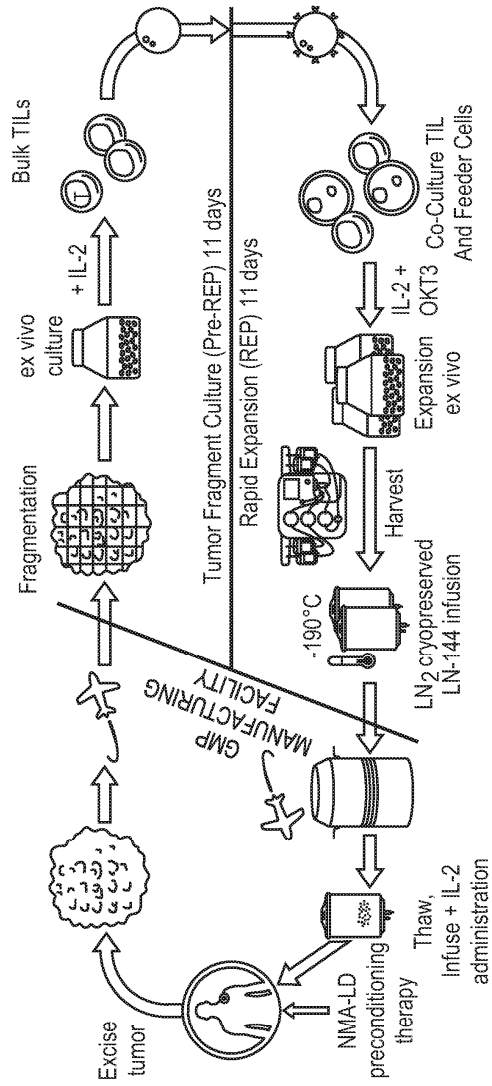
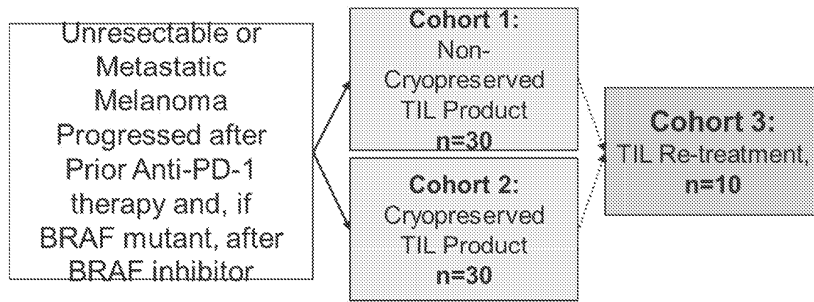


Figure 107

**Figure 108**



CHARACTERISTIC	Historical Cohort 1* N = 16, (%)	Cohort 2 N = 13, (%)
Gender, n (%)		
Male	7 (44)	5 (39)
Female	9 (56)	8 (62)
Age		
Median	55	54
Min, Max	41, 72	35, 66
Prior therapies, n (%)		
Mean # prior systemic therapies	3	4
Anti-CTLA-4	14 (88)	13 (100)
Anti-PD-1	21 (100)	13 (100)
Target Lesion Sum of Diameter (mm)		
Mean (SD)	104 (68)	141 (102)
Min, Max	15, 225	38, 342
CHARACTERISTIC		
	Historical Cohort 1* N = 16, (%)	Cohort 2 N = 13, (%)
Baseline ECOG score, n (%)		
0	9 (56)	8 (62)
1	7 (44)	5 (39)
BRAF Status, n (%)		
Mutated	9 (56)	6 (46)
Wild Type	7 (44)	7 (54)
Baseline LDH (U/L [SD])		
1-2 times ULN	7 (44)	7 (54)
Min, Max	1 (6)	2 (15)
Number of Target & Non-Target Lesions (at Base Line)		
>3	12(75)	10(77)
Mean	5.6	5.5

Figure 109

PREFERRED TERM	Historical Cohort 1 (N = 16)			Cohort 2 (N = 13)		
	Any Grade n (%)	Grade 3/4 n (%)	Grade 5 n (%)	Any Grade n (%)	Grade 3/4 n (%)	Grade 5 n (%)
Number of patients reporting at least one Treatment-Emergent AE	14 (87.5)	14 (87.5)	0	12 (85.7)	11 (78.6)	0
Nausea	14 (87.5)	0	0	7 (53.8)	0	0
Platelet count decreased	12 (75.0)	12 (75.0)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
Anaemia	11 (68.8)	8 (50.0)	0	8 (61.5)	7 (53.8)	0
Neutrophil count decreased	11 (68.8)	11 (68.8)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
Febrile neutropenia	10 (62.5)	10 (62.5)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
White blood count decreased	10 (62.5)	10 (62.5)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
Chills	9 (56.3)	0	0	6 (46.2)	1 (7.7)	0
Diarrhoea	8 (50.0)	1 (6.3)	0	4 (30.8)	0	0
Fatigue	7 (43.8)	0	0	7 (53.8)	0	0
Vomiting	7 (43.8)	0	0	2 (15.4)	0	0
Constipation	6 (37.5)	0	0	3 (23.1)	0	0
Decreased appetite	5 (31.3)	0	0	4 (30.8)	0	0
Headache	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
Hypocalcaemia	5 (31.3)	0	0	1 (7.7)	0	0
Hypokalaemia	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
Hypophosphataemia	5 (31.3)	5 (31.3)	0	4 (23.1)	1 (7.7)	0
Hypotension	5 (31.3)	2 (12.5)	0	3 (23.1)	3 (7.7)	0
Lymphocyte count decreased	5 (31.3)	5 (31.3)	0	3 (23.1)	3 (23.1)	0
Nasal Congestion	5 (31.3)	0	0	0	0	0
Pyrexia	5 (31.3)	0	0	9 (69.2)	1 (7.7)	0
Cough	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
Oedema peripheral	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
Pruritus	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0

Notes: Adverse events are coded by MedDRA version 18.1.

Patients with multiple events for a given preferred term are counted only once using the maximum grade under each preferred term.

Events are sorted by decreasing frequency of preferred term under SOC per any grade.

Treatment-Emergent Adverse Events refer to all AEs starting on or after the first dose date of pre-treatment chemotherapy (Fludarabine and Cyclophosphamide) up to the last dose of IL2 + 30 days.

Figure 110

Figure 111

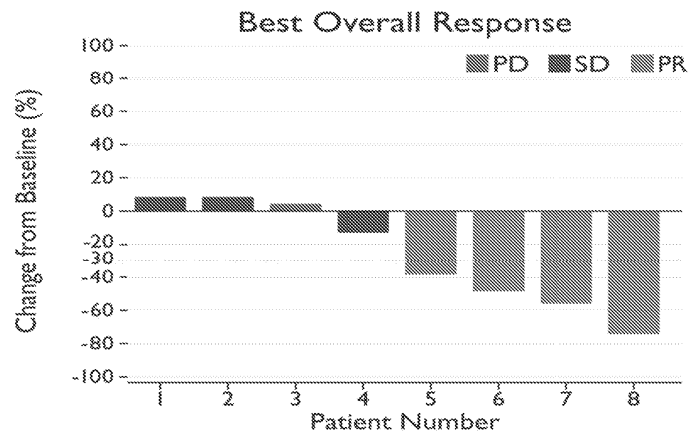
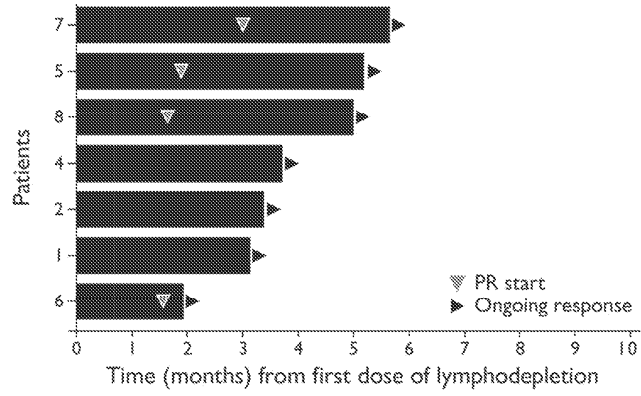


Figure 112



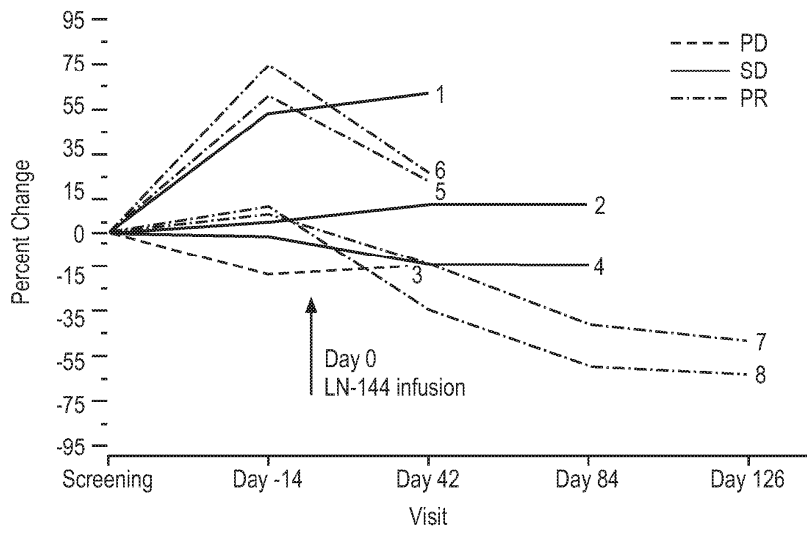


Figure 113

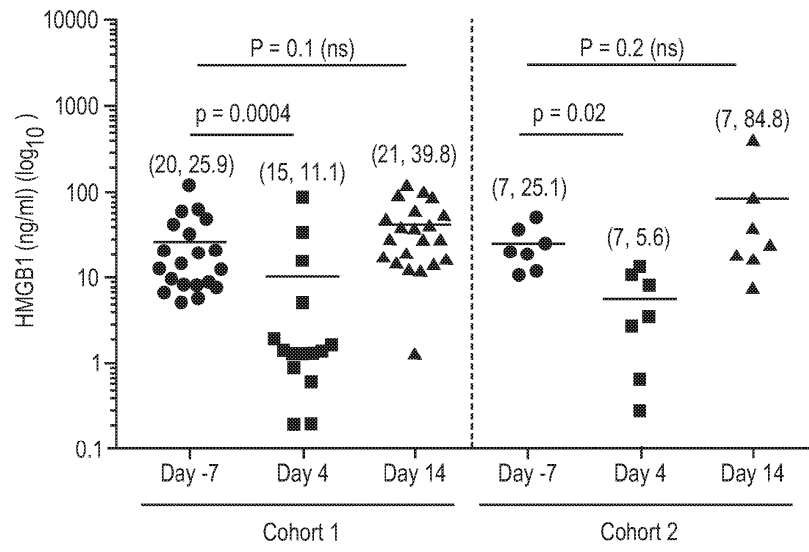


Figure 114

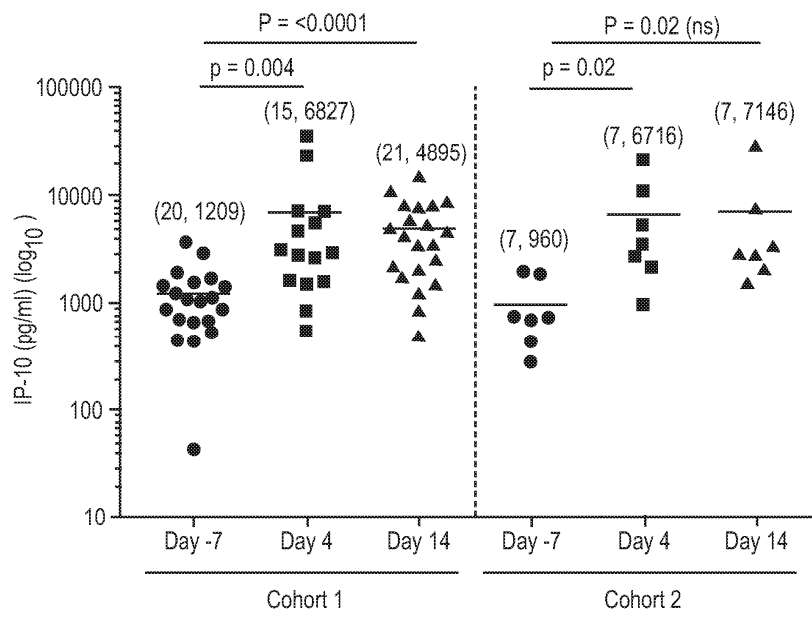


Figure 115

CHARACTERISTIC	Cohort 2 N = 17, (%)
Gender, n (%)	
Male	8 (47)
Female	9 (53)
Age	
Median	54
Min, Max	35, 66
Prior therapies, n (%)	
Mean # prior systemic therapies	3.6
Anti-CTLA-4	15 (88)
Anti-PD-1	16 (94)
Target Lesion Sum of Diameter (mm)	
Mean (SD)	140 (93)
Min, Max	38, 342
Cohort 2 N = 17, (%)	
CHARACTERISTIC	
Baseline ECOG, n (%)	
0	11 (65)
1	6 (35)
BRAF Status, n (%)	
Mutated	5 (29)
Wild Type	9 (53)
Unknown	3 (18)
Baseline LDH (U/L [SD])	
1-2 times ULN	8 (47)
> 2 times ULN	2 (12)
Number of Target & Non-Target Lesions (at Base Line)	
> 3	12 (71)
Mean	5.9

Cohort 2 has:

3.6 median prior therapies

High tumor burden at baseline as reflected by 140 mm sum of diameters for target lesions

*Figure 116*

PREFERRED TERM	Cohort 2 (N = 17)		
	Any Grade n (%)	Grade 3/4 n (%)	Grade 5 n (%)
Number of patients reporting at least one Treatment-Emergent AE	16 (94.1)	16 (94.1)	0
Pyrexia	13 (76.5)	1 (5.9)	0
Anaemia	11 (64.7)	10 (58.8)	0
Neutrophil count decreased	10 (58.8)	10 (58.8)	0
Platelet count decreased	10 (58.8)	8 (47.1)	0
Febrile neutropenia	10 (58.8)	8 (47.1)	0
Fatigue	10 (58.8)	0	0
Chills	9 (52.9)	1 (5.9)	0
Nausea	9 (52.9)	0	0
White blood cell count decreased	8 (47.1)	8 (47.1)	0
Lymphocyte count decreased	6 (35.3)	6 (35.3)	0
Diarroea	6 (35.3)	0	0
Decreased appetite	6 (35.3)	0	0

Notes: Patients with multiple events for a given preferred term are counted only once using the maximum grade under each preferred term. Treatment-Emergent Adverse Events refer to all AEs starting on or after the first dose date of pre-treatment chemotherapy (Fludarabine and Cyclophosphamide) up to the last dose of IL-2 + 30 days.

*Figure 117*

Figure 118

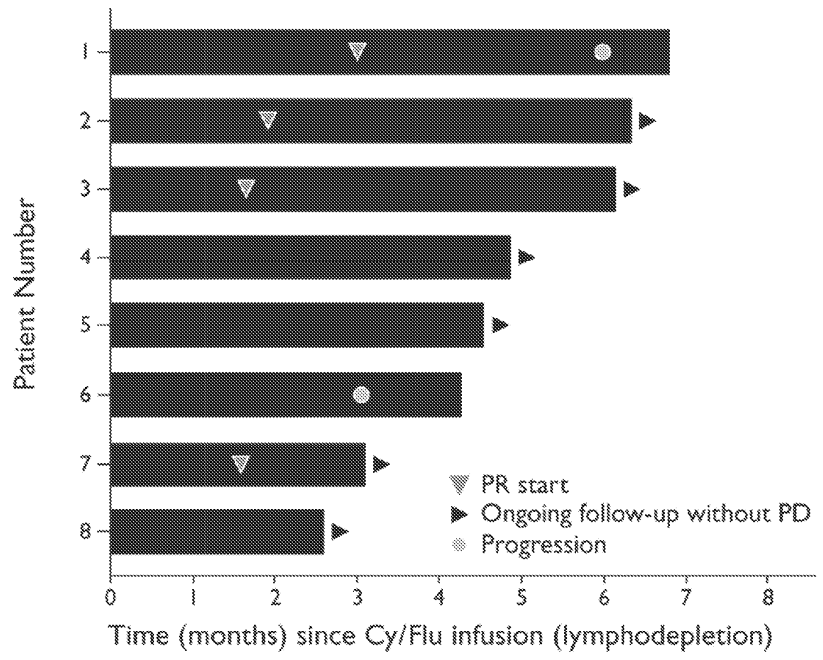
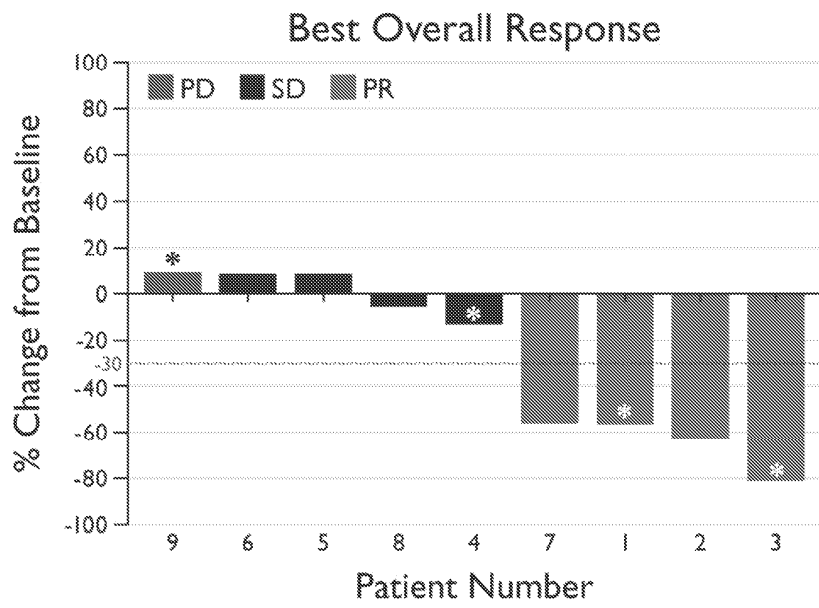


Figure 119



**Figure 120**

RESPONSE	PATIENTS, N=10 n (%)
<b>Objective Response Rate</b>	<b>4 (40%)</b>
Disease Control Rate	8 (80%)
Partial Response	4 (40%)
Stable Disease	4 (40%)
Progressive Disease	1 (10%)
Non-Evaluable*	1 (10%)

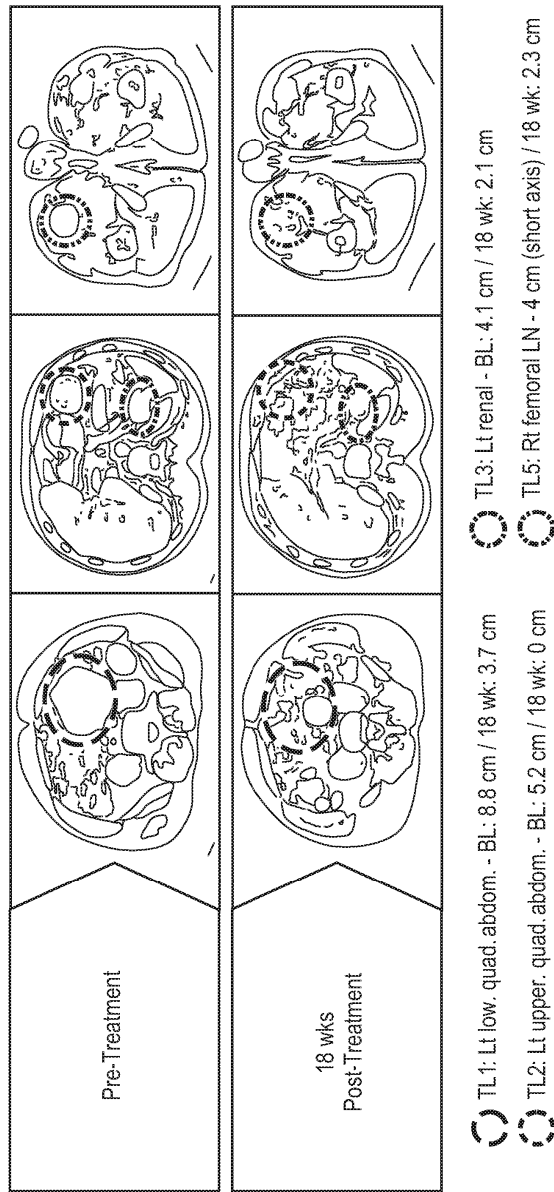
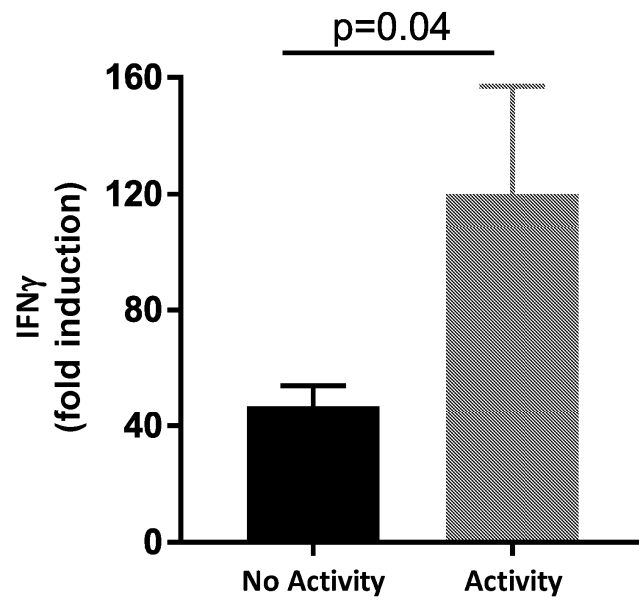


Figure 121

Figure 122



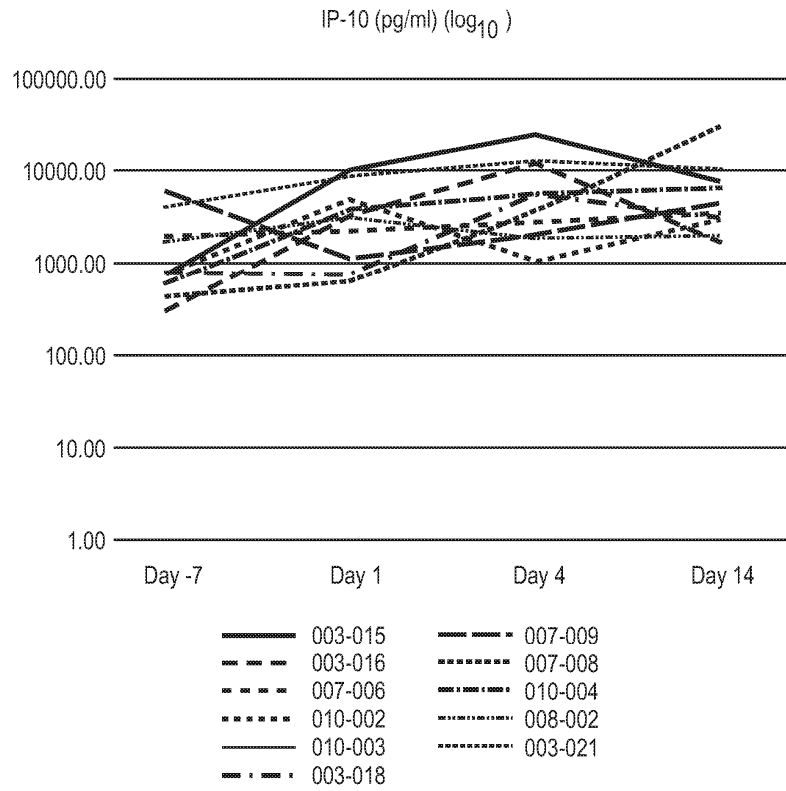


Figure 123

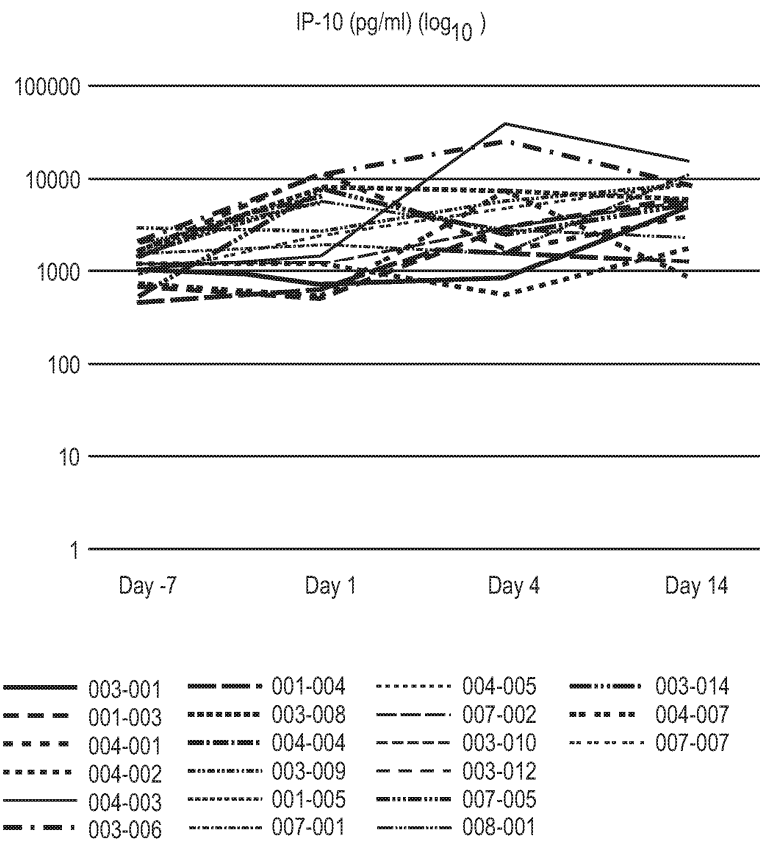


Figure 124

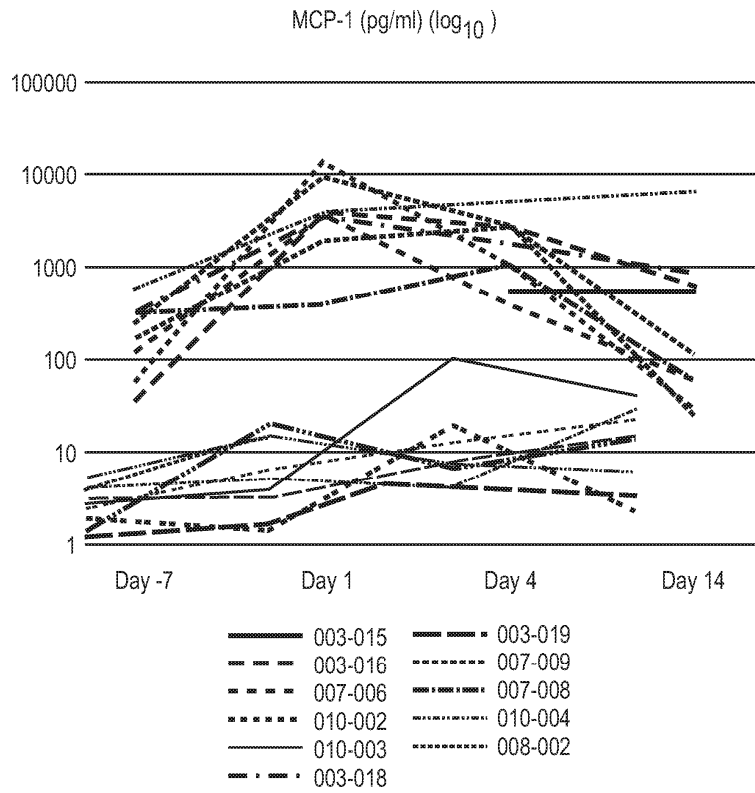


Figure 125

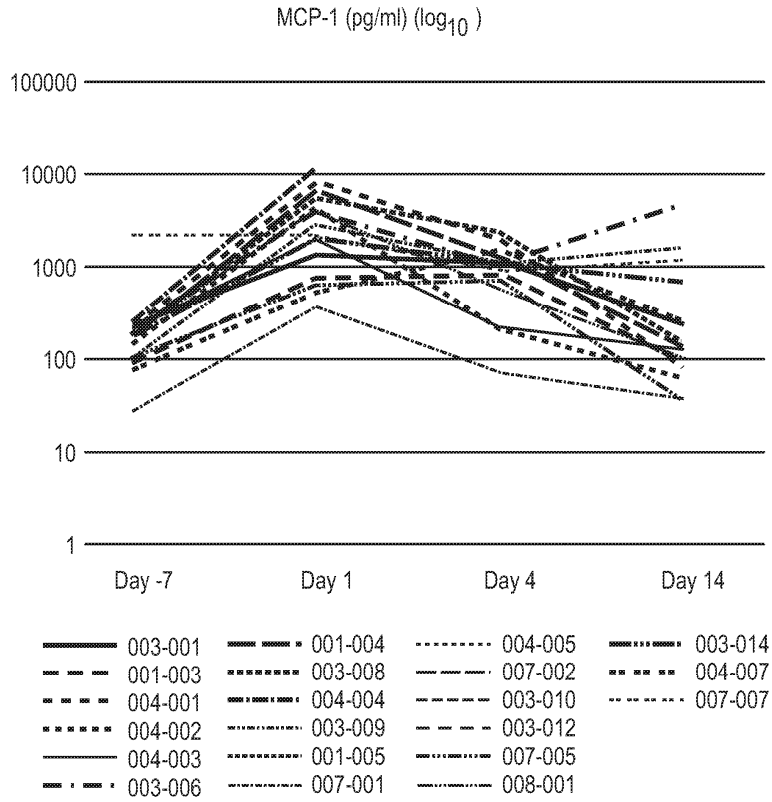


Figure 126

Cervical Carcinoma (C-145-04)

Pt No	INFUSION	# CELLS INFUSED	RESPONSE DAY 42	RESPONSE DAY 84	RESPONSE DAY 126	RESPONSE AT 6 MONTHS	RESPONSE AT 9 MONTHS	BOR	
1	9-Aug-17	32.6 bil	PR	PR	-	-	-	-	
2	19-Sep-17	41.4 bil	SD (needs confirmation)						-

HNSCC (C-145-03)

Pt No	INFUSION	# CELLS INFUSED	RESPONSE DAY 28	RESPONSE DAY 56	RESPONSE DAY 84	RESPONSE AT 4 MONTHS	RESPONSE AT 6 MONTHS	BOR
1	31-May-17	21 bil	SD	PD	Discon.	-	-	SD
2	20-Jun-17	21 bil	PR	SD	SD	Passed away.	-	SD
3	1-Aug-17	30 bil	PR	PR	PR	PD	-	PR
4	14-Sep-17	65 bil	PR	PR	-	-	-	PR
5	03-Nov-17	10 bil	-	-	-	-	-	-
6	07-Nov-17	37 bil	-	-	-	-	-	-
7	08-Nov-17	21.5 bil	-	-	-	-	-	-

Median Prior therapies for HNSCC: 4, all have had poor anti-PD-1. The data is live and subject to change.

Figure 127