

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 46669 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 5/0783**
- (43) Date de publication : **31.05.2024**
-
- (21) N° Dépôt : **46669**
- (22) Date de Dépôt : **26.10.2017**
- (30) Données de Priorité : **26.10.2016 US 201662413283P**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2017/058610 26.10.2017**
- (71) Demandeur(s) : **Iovance Biotherapeutics, Inc., 999 Skyway Road Suite 150 San Carlos, CA 94070 (US)**
- (72) Inventeur(s) : **FRANK, Ian ; LOTZE, Michael, T.**
- (74) Mandataire : **MOROCCO INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation : EP17798045.5
-
- (54) Titre : **RE-STIMULATION DE LYMPHOCYTES INFILTRANT LES TUMEURS CRYOCONSERVÉS**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne des procédés de re-stimulation de populations de TIL qui conduisent à un phénotype amélioré et à une santé métabolique accrue des TIL et concerne des méthodes de dosage de populations de TIL pour déterminer l'adéquation pour une perfusion plus efficace après une re-stimulation.

Revendications

1. Méthode permettant l'expansion de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) dans une population thérapeutique de TIL comprenant :

(i) l'obtention d'une première population de TIL provenant d'une tumeur préalablement réséquée d'un patient ;

(ii) la réalisation d'une première expansion en cultivant la première population de TIL dans un milieu de culture cellulaire comprenant de l'IL-2 pour produire une deuxième population de TIL ; et

(iii) la réalisation d'une deuxième expansion en complétant le milieu de culture cellulaire de la deuxième population de TIL avec de l'IL-2 supplémentaire, de l'OKT-3 et des cellules présentant des antigènes (APC), de manière à produire une troisième population de TIL, ladite troisième population de TIL étant au moins 100 fois plus grande en nombre que la deuxième population de TIL, et ladite deuxième expansion étant effectuée pendant au moins 14 jours afin d'obtenir la troisième population de TIL, ladite troisième population de TIL étant une population thérapeutique de TIL qui comprend une sous-population accrue de lymphocytes T effecteurs et/ou de lymphocytes T à mémoire centrale par rapport à la deuxième population de TIL.

2. Méthode selon la revendication 1, ladite méthode comprenant en outre :

(iv) la réalisation d'une deuxième expansion supplémentaire en complétant le milieu de culture cellulaire de la troisième population de TIL avec de l'IL-2 supplémentaire, de l'OKT-3 supplémentaire et des APC supplémentaires, ladite deuxième expansion supplémentaire étant effectuée pendant au moins 14 jours de manière à obtenir une population thérapeutique de TIL plus grande que celle obtenue à l'étape (iii), ladite population thérapeutique plus grande de TIL comprenant une sous-population accrue de lymphocytes T effecteurs et/ou de lymphocytes T à mémoire centrale par rapport à la troisième population de TIL,

et éventuellement après l'étape (iii), lesdites cellules étant retirées de la culture cellulaire et cryoconservées dans un milieu de stockage avant d'effectuer l'étape (iv), éventuellement lesdites cellules étant décongelées avant d'effectuer l'étape (iv) et en outre éventuellement ladite étape (iv) étant répétée une à quatre fois afin d'obtenir suffisamment de TIL dans la population thérapeutique de TIL pour un dosage thérapeutiquement efficace des TIL.

3. Méthode selon la revendication 2, lesdites étapes (i) à (iii) ou (iv) étant effectuées dans un délai d'environ 40 jours à environ 50 jours, ou lesdites étapes (i) à (iii) ou (iv) étant effectuées dans un délai d'environ 42 jours à environ 48 jours, ou lesdites étapes (i) à (iii) ou (iv) étant effectuées dans un délai d'environ 42 jours à environ 45 jours,

ou lesdites étapes (i) à (iii) ou (iv) étant effectuées dans les environ 44 jours, éventuellement lesdites cellules issues des étapes (iii) ou (iv) exprimant CD4, CD8 et TCR $\alpha \beta$ à des niveaux similaires à ceux des cellules fraîchement collectées.

4. Méthode selon la revendication 1, lesdites cellules présentant des antigènes étant des cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) ou lesdites APC étant des APC artificielles (aAPC), éventuellement lesdites PBMC étant ajoutées à la culture cellulaire à l'un quelconque des jours 9 à 17 à l'étape (iii).

5. Méthode selon les revendications 2 et 3, lesdits lymphocytes T effecteurs et/ou lesdits lymphocytes T à mémoire centrale dans la population thérapeutique de TIL à l'étape (iv) présentant une ou plusieurs caractéristiques choisies dans le groupe constitué par l'expression de CD27, l'expression de CD28, les télomères plus longs, une expression de CD57 accrue et une expression de CD56 réduite, par rapport aux lymphocytes T effecteurs et/ou aux lymphocytes T à mémoire centrale dans la troisième population de cellules, éventuellement lesdits lymphocytes T effecteurs et/ou lesdits lymphocytes T à mémoire centrale présentant une expression de CD57 accrue et une expression de CD56 réduite.

6. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre l'étape de transduction de la première population de TIL avec un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique codant un récepteur de lymphocytes T à haute affinité,

et éventuellement, la méthode comprend en outre l'étape de transduction de la première population de TIL avec un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique codant un récepteur d'antigène chimérique (CAR) comprenant un anticorps à fragment variable à chaîne unique fusionné avec au moins un endodomaine d'une molécule de signalisation de lymphocytes T.

7. Méthode selon la revendication 1, ladite étape (iii) comprenant en outre une étape de retrait des cellules du milieu de culture cellulaire, éventuellement ladite étape (iii) étant répétée une à quatre fois afin d'obtenir suffisamment de TIL dans la population thérapeutique de TIL pour un dosage thérapeutiquement efficace des TIL, éventuellement le nombre de TIL suffisant pour un dosage thérapeutiquement efficace étant d'environ $2,3 \times 10^{10}$ à environ $13,7 \times 10^{10}$.

8. Méthode permettant d'évaluer l'activité métabolique d'une population de cellules TIL préparée conformément à la méthode selon la revendication 1, comprenant :

i) l'obtention d'une première population de TIL provenant d'une tumeur préalablement réséquée d'un patient ;

(ii) la réalisation d'une première expansion en cultivant la première population de TIL dans un milieu de culture cellulaire comprenant de l'IL-2 de manière à produire une deuxième population de TIL ;

(iii) la réalisation d'une deuxième expansion en complétant le milieu de culture cellulaire de la deuxième population de TIL avec de l'IL-2 supplémentaire, de l'OKT-3 et des cellules présentant des antigènes (APC), de manière à produire une troisième population de TIL, ladite troisième population de TIL étant au moins 100 fois plus grande en nombre que la deuxième population de TIL, et ladite deuxième expansion étant effectuée pendant au moins 14 jours afin d'obtenir la troisième population de TIL, ladite troisième population de TIL étant une population thérapeutique de TIL qui comprend une sous-population accrue de lymphocytes T effecteurs et/ou de lymphocytes T à mémoire centrale par rapport à la deuxième population de TIL ;

iv) la mesure de la glycolyse basale des cellules ;

v) la mesure de la respiration basale des cellules ;

vi) la mesure de la capacité respiratoire de réserve (SRC) des cellules ; et/ou

vii) la mesure de la réserve glycolytique des cellules.

9. Méthode selon la revendication 2, lesdites cellules du milieu de culture cellulaire à l'étape (iii) étant retirées et cryoconservées dans un milieu de stockage avant l'étape (iv), éventuellement lesdites cellules étant décongelées avant l'étape (iv) et/ou ladite étape (iii) étant répétée une à quatre fois afin d'obtenir suffisamment de TIL dans la population thérapeutique de TIL pour un dosage thérapeutiquement efficace des TIL, éventuellement lorsque le nombre de TIL suffisant pour un dosage thérapeutiquement efficace est d'environ $2,3 \times 10^{10}$ à environ $13,7 \times 10^{10}$.

10. Méthode de dosage de TIL comprenant :

(i) l'obtention d'une première population de TIL ;

(ii) la réalisation d'une première expansion en cultivant la première population de TIL dans un milieu de culture cellulaire comprenant de l'IL-2 de manière à produire une deuxième population de TIL ; et

(iii) la réalisation d'une deuxième expansion en complétant le milieu de culture cellulaire de la deuxième population de TIL avec de l'IL-2 supplémentaire, de l'OKT-3 et des cellules présentant des antigènes (APC), de manière à produire une troisième population de TIL, ladite troisième population de TIL étant au moins 50 fois plus grande en nombre que la deuxième population de TIL ;

et ladite deuxième expansion étant effectuée pendant au moins 14 jours afin d'obtenir la troisième population de TIL, ladite troisième population de TIL étant une population thérapeutique de TIL qui comprend une sous-population accrue de cellules effectrices et/ou de lymphocytes T à mémoire centrale par rapport à la deuxième population de TIL ;

(iv) la collecte, le lavage et la cryoconservation de la troisième population de TIL ;

(v) le stockage des TIL cryoconservés à une température cryogénique ;

(vi) la décongélation de la troisième population de TIL de manière à fournir une troisième population de TIL décongelée ; et

(vii) la réalisation d'une deuxième expansion supplémentaire d'une partie de la troisième population de TIL décongelée en complétant le milieu de culture cellulaire de la troisième population avec de l'IL-2, de l'OKT-3 et des APC pendant une période de reREP d'au moins 3 jours, ladite troisième expansion étant effectuée de manière à obtenir une quatrième population de TIL, ledit nombre de TIL dans la quatrième population de TIL étant comparé au nombre de TIL dans la troisième population de TIL de manière à obtenir un rapport ;

(viii) la détermination, sur la base du rapport de l'étape (vii), pour savoir si la population décongelée de TIL est adaptée à l'administration à un patient ;

une dose thérapeutiquement efficace de la troisième population de TIL décongelée étant destinée à être administrée au patient lorsque le rapport du nombre de TIL dans la quatrième population de TIL au nombre de TIL dans la troisième population de TIL est déterminé comme étant supérieur à 5:1 à l'étape (viii), éventuellement ladite période de reREP étant effectuée jusqu'à ce que le rapport du nombre de TIL dans la quatrième population de TIL au nombre de TIL dans la troisième population de TIL soit supérieur à 50:1, éventuellement ledit nombre de TIL suffisant pour un dosage thérapeutiquement efficace étant d'environ $2,3 \times 10^{10}$ à environ $13,7 \times 10^{10}$, et/ou lesdites étapes (i) à (vii) étant effectuées dans un délai d'environ 40 jours à environ 50 jours, ou lesdites étapes (i) à (vii) étant effectuées dans un délai d'environ 42 jours à environ 48 jours, ou lesdites étapes (i) à (vii) étant effectuées dans un délai d'environ 42 jours à environ 45 jours, ou lesdites étapes (i) à (vii) étant effectuées dans les environ 44 jours.

11. Méthode selon la revendication 10, lesdites cellules de l'étape (iii) ou (vii) expriment CD4, CD8 et TCR $\alpha \beta$ à des niveaux similaires aux cellules fraîchement collectées, lesdites cellules présentant les antigènes étant des cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) ou des APC artificielles (aAPC), éventuellement lesdites PBMC étant ajoutées à la culture cellulaire à l'un quelconque des jours 9 à 17 à l'étape (iii), éventuellement lesdits lymphocytes T effecteurs et/ou lesdits lymphocytes T à mémoire centrale dans la plus grande population de TIL à l'étape (iii) ou (vii) présentant une ou plusieurs caractéristiques choisies dans le groupe constitué par

l'expression de CD27, l'expression de CD28, les télomères plus longs, une expression de CD57 accrue et une expression de CD56 réduite, par rapport aux lymphocytes T effecteurs et/ou aux lymphocytes T à mémoire centrale dans la troisième population de cellules et/ou lesdits lymphocytes T effecteurs et/ou lesdits lymphocytes T à mémoire centrale présentant une expression de CD57 accrue et une expression de CD56 réduite.

12. Méthode selon les revendications 10 et 11, comprenant en outre l'étape de transduction de la première population de TIL avec un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique codant un récepteur de lymphocytes T à haute affinité, ou ladite étape de transduction de la première population de TIL avec un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique codant un récepteur d'antigène chimérique (CAR) comprenant un anticorps à fragment variable à chaîne unique fusionné avec au moins un endodomaine d'une molécule de signalisation de lymphocytes T, éventuellement ladite étape de transduction ayant lieu avant l'étape (i), éventuellement lesdits TIL étant analysés pour déterminer leur viabilité après l'étape (vii).