

* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 3 4 0 9 A 2 *

(43) Data da Publicação Nacional: 16/06/2020

(57) Resumo: Métodos de expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), incluindo linfócitos de sangue periférico e linfócitos infiltrantes de medula óssea, a partir do sangue e/ou medula óssea de pacientes com malignidades hematológicas, tais como tumores líquidos, incluindo linfomas e leucemias, e usos de tais TILs expandidos no tratamento de doenças, tais como cânceres e malignidades hematológicas, são aqui divulgados.

[illegible]

MÉTODOS PARA TRATAR UM CÂNCER EM UM PACIENTE E UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA, PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO E LINFÓCITOS INFILTRANTES DE MEDULA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, E, USO DE UM TUMOR LÍQUIDO NA FABRICAÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica prioridade o Pedido Provisório norte-americano nº 62/504.337, depositado em 10 de maio de 2017; Pedido Provisório norte-americano nº 62/530.681, depositado em 10 de julho de 2017; Pedido Provisório norte-americano nº 62/550.398, depositado em 25 de agosto de 2017; Pedido Provisório norte-americano nº 62/590.034, depositado em 22 de novembro de 2017; Pedido Provisório norte-americano nº 62/621.462, depositado em 24 de janeiro de 2018; Pedido Provisório norte-americano nº 62/621.798, depositado em 25 de janeiro de 2018; e Pedido Provisório norte-americano nº 62/647.367, depositado em 23 de março de 2018, todos dos quais são aqui incorporados por referência em suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] Métodos de expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) derivados do sangue e/ou medula óssea de um paciente com uma malignidade hematológica, tal como um tumor líquido, incluindo linfomas e leucemias e composições compreendendo populações de TILs daí obtidas, são aqui divulgadas. Além disso, usos terapêuticos de TILs expandidos a partir do sangue ou medula óssea de um paciente com uma malignidade hematológica, tal como um tumor líquido, incluindo no tratamento de tais malignidades hematológicas, são aqui divulgados.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] O tratamento de cânceres volumosos, refratário usando a transferência autóloga adotiva de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) representa um método poderoso para terapia de pacientes com prognóstico insatisfatório. Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 383-393. Os TILs são dominados pelas células T e a expansão de TIL com base na IL-2 seguida por um “processo de expansão rápida” (REP) tem se tornado um método preferido para a expansão de TIL por causa da sua velocidade e eficiência. 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. Várias abordagens para melhorar as respostas para a terapia com TIL em melanoma e para expandir a terapia com TIL para outros tipos de tumor foram exploradas com sucesso limitado e o campo permanece desafiador. Goff, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2016**, 34, 2389-97; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233-39; Rosenberg, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 4550-57. Abordagens anteriores para expansões de TILs a partir de linfomas de célula B produziu resultados insatisfatórios, com apenas 2 de 12 tentativas no crescimento de TIL provendo atividade potencial contra tumores. Schwartzentruber, *et al.*, *Blood* **1993**, 82, 1204-1211. Há uma necessidade urgente para prover quanto a terapias mais eficazes em muitas malignidades hematológicas, incluindo leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfocítica crônica (CLL).

[004] A presente invenção provê a surpreendente verificação de que a expansão de processos de TIL pode resultar em populações de TIL eficazes obtidas a partir de malignidades hematológicas, tais como tumores líquidos, incluindo linfomas ou leucemias.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar

um câncer com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) compreendendo as etapas de:

(a) opcionalmente pré-tratar um paciente com um regime compreendendo pelo menos um inibidor da cinase;

(b) obter um tumor do paciente pela ressecção, biópsia, aspiração com agulha, ou aferese, o tumor compreendendo uma primeira população de TILs;

(c) opcionalmente fragmentar ou dissociar o tumor para obter fragmentos de tumor e contatar os fragmentos de tumor com um primeiro meio de cultura de células;

(d) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2 e em que a expansão inicial é realizada em um período de 21 dias ou menos;

(e) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(f) colher a terceira população de TILs; e

(g) administrar uma porção terapêuticamente eficaz da terceira população de TILs a um paciente com o câncer;

em que o tumor é um tumor líquido e em que o câncer é uma malignidade hematológica.

[006] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar um câncer com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) compreendendo as etapas de:

(a) opcionalmente pré-tratar um paciente com um regime compreendendo pelo menos um inibidor da cinase;

(b) obter um tumor do paciente pela resseção, biópsia, aspiração com agulha, ou aferese, o tumor compreendendo uma primeira população de TILs;

(c) opcionalmente fragmentar ou dissociar o tumor para obter fragmentos de tumor e contatar os fragmentos de tumor com um primeiro meio de cultura de células;

(d) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2 e em que a expansão inicial é realizada em um período de 21 dias ou menos;

(e) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(f) colher a terceira população de TILs; e

(g) administrar uma porção terapêuticamente eficaz da terceira população de TILs a um paciente com o câncer;

em que o tumor é um tumor líquido e em que o câncer é uma

maligância hematológica selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

[007] Em uma modalidade da invenção, o método compreende adicionalmente a adição de um inibidor de ITK. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é adicionado ao meio de cultura de células durante pelo menos uma das etapas (d) e (e). Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é um inibidor de ITK covalente que covalentemente e irreversivelmente se liga ao ITK. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é um inibidor de ITK alostérico que se liga ao ITK. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em inibidores de ITK com base em aminotiazol, inibidores de ITK com base em benzimidazol, inibidores de ITK com base em aminopirimidina, inibidores de ITK com base em 3-aminopiridina-2-onas, inibidores de ITK com base em indolilindazol, inibidores com base em pirazolil-indol, inibidores de tienopirazol e inibidores de ITK alvejando cisteína-442 na bolsa de ATP. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é ibrutinib, dasatinib, bosutinib, nilotinib, erlotinib BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((*R*)-3-(1-(1-acrililpiperidin-3-il)-4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-N-(3-metil-4-(1-metiletil))benzamida) e combinações dos mesmos. Em uma

outra modalidade, o inibidor de ITK é ibrutinib. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é (*R*)-3-(1-(1-acriloilpiperidin-3-il)-4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-*N*-(3-metil-4-(1-metiletil))benzamida. Os inibidores de ITK precedentes são comercialmente disponíveis de várias fontes, incluindo Tocris Bioscience, Inc. (Minneapolis, MN, USA), Selleckchem, Inc. (Houston, TX, USA) e AK Scientific, Inc. (Union City, CA, USA). Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é adicionado em uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 5 µM. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é adicionado em uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 5 µM. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é adicionado em uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 100 nM. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é adicionado em uma concentração de cerca de 0,5 nM a cerca de 50 nM. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é adicionado em uma concentração de cerca de 1 nM a cerca de 10 nM. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é adicionado em uma concentração de cerca de 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, e 50 µM.

[008] Em uma modalidade da invenção, um método para expandir linfócitos de sangue periférico (PBLs) de sangue periférico compreende:

- a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de sangue periférico, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;
- b. isolar PBLs da dita amostra pela seleção e remoção de células B CD19+;
- c. opcionalmente cocultivar os ditos PBLs com as ditas células B CD19+;
- d. estimular os ditos PBLs em um primeiro meio de cultura de

células com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 durante um período de cerca de 2 dias a cerca de 6 dias em um recipiente permeável a gás;

e. cultivar os PBLs da etapa (d) durante um período de cerca de 2 dias a cerca de 6 dias com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28;

f. isolar os PBLs ligados ao anticorpo da cultura na etapa (e);

g. remover os anticorpos dos PBLs isolados na etapa (e); e

h. colher os PBLs.

[009] Em uma modalidade da invenção, o método compreende adicionalmente a adição de IL-2 depois da etapa (d) e trocar o primeiro meio de cultura para um segundo meio de cultura de células. Em uma outra modalidade, o método compreende adicionalmente a adição de IL-2 depois da etapa (e) e trocar o segundo meio de cultura para um terceiro meio de cultura. Em uma modalidade, o primeiro meio de cultura de células, segundo meio de cultura de células, ou o terceiro meio de cultura é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V. Em uma outra modalidade, o primeiro e segundo meios de cultura de células são os mesmos. Em uma outra modalidade, o primeiro e segundo meios de cultura de células são diferentes. Em uma modalidade da invenção, um ou mais do primeiro, segundo e terceiro meios de cultura de células são os mesmos. Em uma outra modalidade, o primeiro, segundo e terceiro meios de cultura de células são todos diferentes.

[0010] Em uma modalidade, o cocultivo opcional dos ditos PBLs com as ditas células B CD19+ é realizado durante um período de 1 hora a 3 dias.

[0011] Em uma modalidade da invenção, a razão de células T para células B na etapa (c) é de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1 (células B:células T). Em uma outra modalidade, a razão de células B para células T na etapa (c) é selecionada do grupo consistindo em 0,1:1, 1:1 e 10:1 (células B:células T).

[0012] Em uma modalidade da invenção, o número de célula de partida de PBLs no começo da etapa (d) é pelo menos de cerca de 1×10^5 a cerca de 10×10^5 PBLs. Em uma outra modalidade, o número de célula de

partida de PBLs no começo da etapa (d) é pelo menos de cerca de $2,5 \times 10^5$ a 10×10^5 PBLs. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBLs no começo da etapa (d) é pelo menos 5×10^5 PBLs.

[0013] Em uma modalidade da invenção, a IL-2 em cada uma das etapas (c) e (d) é usada em uma concentração de cerca de 1000 IU/mL a cerca de 6000 IU/mL. Em uma outra modalidade, a IL-2 em cada uma das etapas (c) e (d) é usada em uma concentração de cerca de 3000 IU/mL.

[0014] Em uma modalidade da invenção, os anticorpos anti-CD3/anti-CD28 são revestidos em grânulos. Em uma modalidade da invenção, os anticorpos anti-CD3/anti-CD28 são DynaBeads[®]. Em uma modalidade, o método inclui cocultivar os grânulos de anticorpo anti-CD3/anti-CD28 com os PBLs em cerca de uma razão de grânulo:PBL de 1:1 em cada uma das etapas (c) e (d).

[0015] Em uma modalidade da invenção, o método compreende adicionar um inibidor de ITK. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é adicionado durante pelo menos uma das etapas (c), (d) e (e). Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em inibidores de ITK com base em aminotiazol, inibidores de ITK com base em benzimidazol, inibidores de ITK com base em aminopirimidina, inibidores de ITK com base em 3-aminopiridi-2-onas, inibidores de ITK com base em indolilindazol, inibidores com base em pirazolil-indol, inibidores de tienopirazol e inibidores de ITK alvejando cisteína-442 na bolsa de ATP. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é ibrutinib, dasatinib, bosutinib, nilotinib, erlotinib BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 e combinações dos mesmos. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é ibrutinib.

[0016] Em uma modalidade da invenção, qualquer um dos métodos precedentes para preparar PBLs é realizado em um sistema fechado, estéril.

[0017] Em uma modalidade da presente invenção, um método para

expandir linfócitos de sangue periférico (PBLs) do sangue periférico compreende:

- a. obter uma amostra de PBMCs do sangue periférico, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;
- b. isolar PBLs da dita amostra pela seleção e remoção de células B CD19+;
- c. cocultivar os ditos PBLs com as ditas células B CD19+ durante um período de 4 dias;
- d. adicionar de cerca de $2,5 \times 10^5$ a cerca de 5×10^5 células a um recipiente permeável a gás em meio de cultura de células CM-2 e estimular os ditos PBLs com 3000 IU/ml de anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 imobilizados nos grânulos durante um período de cerca de 4 dias;
- e. trocar o CM-2 com meio de cultura de células AIM-V e IL-2 adicional a cerca de 3000 IU/ml;
- f. cultivar os PBLs da etapa (e) por um período adicional de cerca de 3 dias com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 imobilizados nos grânulos;
- g. isolar os PBLs ligados ao anticorpo da cultura na etapa (f);
- h. remover os anticorpos dos PBLs isolados na etapa (g); e
- i. colher os PBLs.

[0018] Em uma modalidade da invenção, um método para tratar uma malignidade hematológica compreende:

- a. obter uma amostra de PBMCs do sangue periférico de um paciente que sofre de uma malignidade hematológica;
- b. isolar PBLs da dita amostra pela seleção e remoção de células B CD19+;
- c. opcionalmente cocultivar os ditos PBLs com as ditas células B CD19+;
- d. estimular os ditos PBLs em um primeiro meio de cultura de

células com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 durante um período de pelo menos cerca de 4 dias em um recipiente permeável a gás;

e. cultivar os PBLs da etapa (d) durante um período de 3 dias com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28;

f. isolar os PBLs ligados ao anticorpo da cultura na etapa (e);

g. remover os anticorpos dos PBLs isolados na etapa (e); e

h. colher os PBLs; e

i. administrar os PBLs ao paciente em uma quantidade terapeuticamente eficaz para tratar a dita malignidade hematológica.

[0019] Em uma modalidade da invenção, o método compreende adicionalmente obter uma amostra de PBMC de um paciente que é pré-tratado com um inibidor de ITK. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em inibidores de ITK com base em aminotiazol, inibidores de ITK com base em benzimidazol, inibidores de ITK com base em aminopirimidina, inibidores de ITK com base em 3-aminopiridina-2-onas, inibidores de ITK com base em indolilindazol, inibidores com base em pirazolil-indol, inibidores de tienopirazol e inibidores de ITK alvejando cisteína-442 na bolsa de ATP. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é ibrutinib, BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 e combinações dos mesmos. Em uma outra modalidade, o inibidor de ITK é ibrutinib. Em uma outra modalidade, o paciente é pré-tratado com pelo menos três rodadas de um regime de ibrutinib.

[0020] Em uma modalidade da invenção, a malignidade hematológica é selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica

aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV). Em uma outra modalidade, a malignidade hematológica é leucemia linfocítica crônica (CLL). Em uma modalidade da invenção, os PBLs são administrados em uma quantidade de cerca de $0,1 \times 10^9$ a cerca de 15×10^9 PBLs.

[0021] Em uma modalidade da invenção, um método para expandir linfócitos infiltrantes da medula (MILs) da medula óssea compreende:

a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) da medula óssea, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;

b. escolher uma fração de célula CD3+, CD33+, CD20+ e CD14+ (fração de MIL) e uma fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+, não CD14+ (fração de célula blástica AML);

c. opcionalmente romper a fração de célula blástica AML;

d. adicionar a fração de célula blástica AML opcionalmente rompida à fração de MIL em uma razão de número de célula de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1

e. cultivar uma ou ambas das frações de célula em um recipiente permeável a gás em um primeiro meio de cultura de células, compreendendo IL-2;

f. estimular os MILs com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 para obter expansão de MILs;

g. reestimar os MILs com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 por um período adicional de cerca de 2 a cerca de 6 dias;

h. cultivar os MILs com IL-2 adicional por um período

adicional de cerca de 1 a cerca de 3 dias; e

i. colher os ditos MILs.

[0022] Em uma modalidade da invenção, o método compreende adicionalmente a adição de IL-2 depois da etapa (e) e trocar os meios de cultura para um segundo meio de cultura de células. Em uma modalidade, o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são selecionados do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V. Em uma outra modalidade, o primeiro e segundo meios de cultura de células são os mesmos. Em uma outra modalidade, o primeiro e segundo meios de cultura de células são diferentes.

[0023] Em uma modalidade, há pelo menos de cerca de 2×10^4 a cerca de 5×10^5 MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e). Em uma outra modalidade, há pelo menos de cerca de $2,8 \times 10^4$ a $3,4 \times 10^5$ MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e). Em uma outra modalidade, há pelo menos 5×10^5 MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e).

[0024] Em uma modalidade da invenção, a IL-2 está presente em uma concentração dentre 1000 IU/ml e 6000 IL/ml na etapa (e). Em uma outra modalidade, a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 6000 IU/ml. Em uma outra modalidade, a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml na etapa (g). Em uma outra modalidade, a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml na etapa (h).

[0025] Em uma modalidade da invenção, o cultivo na etapa (e) é realizado em um período de cerca de 3 dias. Em uma modalidade, a estimulação na etapa (f) é realizada em um período de cerca de 4 dias. Em uma modalidade, a estimulação na etapa (g) é realizada em um período de cerca de 7 dias.

[0026] Em uma modalidade da invenção, a fração da célula opcionalmente rompida é rompida usando um método selecionado do grupo

consistindo em sonicação, homogeneização, turbilhonamento, vibração e lise. Em uma modalidade da invenção, a fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+, não CD14+ (fração blástica de AML) é lisada usando um método de lise adequado, incluindo temperatura de lise alta, lise química (tal como álcoois orgânicos), lise de enzima e outros métodos de lise de célula conhecidos na técnica.

[0027] Em uma modalidade da invenção, os anticorpos anti-CD3/anti-CD28 são revestidos em grânulos e a razão de MILs:grânulo é de cerca de 1:1 em cada uma das etapas (f) e (g).

[0028] Em uma modalidade da invenção, o método é realizado em um sistema fechado, estéril.

[0029] Em uma modalidade da invenção, um método para expandir linfócitos infiltrantes da medula (MILs) da medula óssea compreende:

a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) da medula óssea, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;

b. escolher uma fração de célula CD3+, CD33+, CD20+ e CD14+ (fração de célula AML) e uma fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+, não CD14+ (fração de célula blástica AML);

c. romper a fração de célula blástica AML e adicionar a fração de célula blástica AML rompida a uma fração de célula AML em uma razão de número de célula de cerca de 1:1;

d. cultivar as frações de célula em um recipiente permeável a gás com um primeiro meio de cultura de células compreendendo IL-2 a cerca de 6000 IU/ml durante um período de cerca de 3 dias;

e. adicionar anticorpos anti-CD3/anti-CD28 imobilizados nos grânulos à cultura de células em uma razão de cerca de 1:1 (MILs:grânulos) e cultivar os MILs e anticorpos durante um período de cerca de 1 dia;

f. trocar o primeiro meio de cultura de células para um

segundo meio de cultura de células compreendendo IL-2 adicional a cerca de 3000 IU/ml;

g. cultivar os anticorpos e MILs por um período adicional de cerca de 3 dias;

h. reestimar os MILs com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 imobilizados nos grânulos por um período adicional de pelo menos de cerca de 4 dias;

i. trocar o segundo meio de cultura de células para um terceiro meio de cultura de células compreendendo IL-2 adicional a cerca de 3000 IU/ml por um período adicional de pelo menos de cerca de 3 dias;

j. colher os ditos MILs.

[0030] Em uma modalidade da invenção, um método para tratar uma malignidade hematológica compreende:

a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) da medula óssea, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;

b. escolher uma fração de célula CD3+, CD33+, CD20+ e CD14+ (fração de MIL) e uma fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+, não CD14+ (fração de célula blástica AML);

c. opcionalmente romper a fração de célula blástica AML;

d. adicionar a fração de célula blástica AML opcionalmente rompida à fração de MIL em uma razão de número de célula de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1;

e. cultivar uma ou ambas das frações de célula em um recipiente permeável a gás em um primeiro meio de cultura de células compreendendo IL-2;

f. estimular a dita amostra com anticorpos anti-CD3/anti-CD28;

g. reestimar os MILs com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-

CD28 por um período adicional de pelo menos cerca de 4 dias;

h. cultivar os MILs com IL-2 adicional por um período adicional de pelo menos cerca de 3 dias;

i. colher os ditos MILs; e

j. administrar os ditos MILs a um paciente em uma quantidade terapeuticamente eficaz para tratar a malignidade hematológica.

[0031] Em uma modalidade da invenção, a malignidade hematológica é selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV). Em uma outra modalidade, a malignidade hematológica é leucemia mieloide aguda (AML). Em uma modalidade da invenção, os MILs são administrados em uma quantidade de cerca de 4×10^8 a cerca de $2,5 \times 10^9$ MILs.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0032] O sumário precedente, assim como a seguinte descrição detalhada da invenção, serão melhor entendidos quando lidos em conjunção com os desenhos anexos.

[0033] A FIG. 1 ilustra informação de patologia para tumores de linfoma.

[0034] A FIG. 2 ilustra uma comparação de subconjuntos diferentes

de TILs de linfoma e melanoma, mostrando que os subconjuntos de memória efetora (EM) em TILs de linfoma são significativamente mais altos do que os subconjuntos de EM em TILs de melanoma.

[0035] A FIG. 3 ilustra uma comparação de diferentes subconjuntos de TILs de linfoma e melanoma, mostrando que os subconjuntos CD28⁺CD4⁺ no TIL de linfoma são significativamente mais altos do que estes subconjuntos em TILs de melanoma.

[0036] A FIG. 4 ilustra uma comparação de subconjuntos de células T CD4⁺ de TILs de linfoma de não Hodgkin e TILs de melanoma, mostrando marcadores de diferenciação. As linhas vermelhas nos gráficos representam valores medianos. CM refere-se às células T de memória central, EM refere-se às células T de memória efetora e TEMRA refere-se às células T CD45RA⁺ de memória efetora.

[0037] A FIG. 5 ilustra uma comparação de subconjuntos de células T CD8⁺ de TILs de linfoma de não Hodgkin e TILs de melanoma, mostrando marcadores de diferenciação. As linhas vermelhas nos gráficos representam valores medianos. CM refere-se às células T de memória central, EM refere-se às células T de memória efetora e TEMRA refere-se às células T CD45RA⁺ de memória efetora.

[0038] A FIG. 6 ilustra uma comparação de subconjuntos de células T CD4⁺ de TILs de linfoma de não Hodgkin e TILs de melanoma, mostrando marcadores de exaustão. As linhas vermelhas nos gráficos representam valores medianos. LAG3 refere-se ao gene de ativação de linfócito 3, PD1 refere-se à morte programada 1 e TIGIT refere-se ao imunorreceptor de célula T com domínios Ig e ITIM.

[0039] A FIG. 7 ilustra uma comparação de subconjuntos de células T CD8⁺ de TILs de linfoma de não Hodgkin e TILs de melanoma, mostrando marcadores de exaustão. As linhas vermelhas nos gráficos representam valores medianos. LAG3 refere-se ao gene de ativação de linfócito 3, PD1

refere-se à morte programada 1 e TIGIT refere-se ao imunorreceptor de célula T com domínios Ig e ITIM.

[0040] A FIG. 8 ilustra uma comparação de tipos de célula entre TILs de linfoma de não Hodgkin e TILs de melanoma. NK refere-se às células matadoras naturais e TCRab refere-se às células que expressam um receptor de célula T com cadeias alfa e beta.

[0041] A FIG. 9 ilustra resultados do ensaio de lise redirecionado bioluminescente (BRLA).

[0042] A FIG. 10 ilustra resultados do ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) de interferon- γ (IFN- γ) para TILs de linfoma versus TILs de melanoma.

[0043] A FIG. 11 ilustra resultados do ensaio de imunomancha ligado à enzima (ELISpot) para TILs de linfoma.

[0044] A FIG. 12 ilustra resultados de ensaio ELISpot para TILs de melanoma

[0045] A FIG. 13 ilustra os resultados da análise NANOSTRING NCOUNTER, mostrando que TILs de linfoma expressam níveis mais altos de RORC IL17A (fenótipo TH17) e GATA3 (fenótipo Th2) comparados aos TILs de melanoma. Os respectivos de genes são salientados em caixas vermelhas no mapa térmico.

[0046] A FIG. 14 ilustra uma expansão de TIL e processo de tratamento. A etapa 1 refere-se à adição de 4 fragmentos de tumor dentro de 10 frascos G-Rex 10. Na etapa 2, aproximadamente 40×10^6 TILs ou mais são obtidos. Na etapa 3, uma separação ocorre dentro de 36 frascos G-Rex 100 para REP. TILs são colhidos pela centrifugação na etapa 4. O produto de TIL fresco é obtido na etapa 5 depois de um tempo de processo total de aproximadamente 43 dias, ponto no qual TILs podem ser infundidos em um paciente.

[0047] A FIG. 15 ilustra um protocolo de tratamento para o uso com

TILs obtidos de linfomas da presente divulgação. A cirurgia (e ressecção de tumor) ocorre no início e a linfodepleção quimio refere-se linfodepleção não-mieloablativo com quimioterapia como aqui descrito em outro lugar.

[0048] A FIG. 16 demonstra os resultados da análise de citometria de fluxo usando painel de fenótipo padrão DF2 como descrito no Exemplo 4, abaixo. Os TILs de linfoma e melanoma foram tingidos usando painel de fenótipo padrão DF2 como descrito no Exemplo 4. Os dados mostrados representam subpopulações diferentes de células T CD4 e CD8 total em TIL. A Figura 16A demonstra a proporção de células CD4 e CD8 para subconjuntos de células T ingênuas; a Figura 16B para subconjuntos de células T de memória central (CM); a Figura 16C para subconjuntos de células T de memória efetora (EM) e a Figura 16D para subconjuntos de células T de memória efetora (TEMRA) terminalmente diferenciado. Os valores P foram calculados usando Teste de Mann-Whitney de duas caudas (não emparelhado). A proporção média de subconjuntos de células é apresentada pelas barras horizontais.

[0049] A FIG. 17 demonstra os resultados da análise de citometria de fluxo usando o painel de fenótipo padrão DF1 como descrito no Exemplo 4, abaixo. TILs de linfoma e melanoma foram tingidos usando painel de fenótipo padrão DF1, como descrito no Exemplo 4. Os dados mostrados representam subpopulações de CD27+ (FIG. 17A) e CD28+ (FIG. 17B) diferentes de células T CD4 e CD9 total em TIL, que indica uma proporção mais alta de células T CD4 expressando CD28 de molécula coestimulatória não expressando no TIL em linfoma. Os valores P foram calculados usando o Teste de Mann-Whitney de duas caudas (não emparelhadas).

[0050] A FIG. 18 demonstra os resultados de um teste de interferon-gama (IFN- λ) conduzido de acordo com o Exemplo 4, abaixo. A FIG. 18A demonstra os resultados usando ELISpot. Os dados de ELISpot são expressos como células produtoras de IFN- λ por 10^6 TIL. A FIG. 18B demonstra os

resultados usando ELISA. Os dados de ELISA são expressos como níveis de IFN- λ nos sobrenadantes de culturas TIL a 5×10^5 TIL/poço) como medido pelo ELISA (escala logarítmica. Os valores P foram calculados usando o Teste de Mann-Whitney de duas caudas (não emparelhado).

[0051] A FIG. 19 demonstra o potencial lítico de TIL. A FIG. 19A mostra a LU_{50} de células alvo normalizadas para 10^6 TIL em 4 horas (FIG. 19A) e 24 horas (FIG. 19B) em cocultura (células efetoras de TIL com células alvo GFP+P815).

[0052] A FIG. 20 demonstra a atividade citolítica de TIL diferentes contra tipos de tumor alogênicos e autólogos. A FIG. 20A mostra a atividade citolítica de TIL de melanoma contra as células alvo 526 alogênicas. A FIG. 20B mostra a atividade citolítica de TIL de linfoma contra células autólogas de tumor determinadas pela captação de 7-AAD. Os dados nas FIGS. 20A e 20B são mostradas como porcentagem de células mortas em coculturas com razão 50:1 de célula efetora:célula alvo (E:T). A FIG. 20C representa a morte percentual de células alvo induzida pelo TIL de melanoma. A FIG. 20D representa a morte percentual de células alvo induzida pelo linfoma TIL em razões E:T diferentes.

[0053] A FIG. 21 é um mapa térmico mostrando os perfis de expressão de gene de TIL de linfoma e melanoma. Os perfis de expressão foram determinados pelo painel 579 plex nCounter GX Human Immunology V2 CSO da NanoString. O mapa térmico mostra a mudança na taxa na expressão de um conjunto particular de genes no TIL no TIL de linfoma comparado ao de melanoma e sugere uma expressão mais alta de IL-17A e RORC de TIL derivado de linfoma. Os cânceres mostrados nesta figura incluem linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL) e linfoma de célula do manto (MCL).

[0054] A FIG. 22 é uma demonstração esquemática do processo 2A para preparar, colher e programar a remessa de TIL.

[0055] A FIG. 23 é um diagrama de fluxo demonstrando o processo 2A para preparar TIL.

[0056] A FIG. 24 é um diagrama de fluxo demonstrando três métodos diferentes para expandir Linfócitos de Sangue Periférico (PBLs).

[0057] As FIGS. 25A-25C representam três métodos diferentes para expandir linfócitos infiltrantes de medula óssea (MILs) da medula óssea.

[0058] A FIG. 26 representa um gráfico da expansão multiplicativa para PBLs isolados de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) frescas a partir de PBMCs criopreservadas. As PBMCs criopreservadas são derivadas dos pacientes com CLL que não foram (PBL Pré-Rx) ou que foram (PBL Pós-Rx) tratados com um regime de ibrutinib. Para cada uma das FIGS. 26-34, cada ponto é um paciente. Os pontos vermelhos são pacientes cujos PBLs foram expandidos usando o Método de PBL 1; os pontos verdes são pacientes cujos PBLs foram expandidos usando o Método de PBL 2; os pontos pretos são pacientes cujos PBLs foram expandidos usando o Método de PBL 3.

[0059] A FIG. 27 representa um gráfico de células produtoras de IFN- λ para PBLs isolados de PBMCs frescas e PBMCs criopreservadas. Dentro das PBMCs criopreservadas, PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx também são representadas.

[0060] A FIG. 28 representa a proporção de subconjuntos de célula T CD4+ e CD8+ em PBL Pré-Rx e PBL Pós-Rx, usando TIL de melanoma como um comparador.

[0061] As FIGS. 29A-29D e FIGS. 30A-30D representam uma comparação entre CD4 (FIG. 29) e CD8 (FIG. 30) memória subconjuntos of PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx, usando TIL de melanoma como um comparador. As FIGS. 29A e 30A mostram os dados para (CCR7+/CD45RA+) ingênuas; as FIGS. 29B e 30B mostram os dados para as células t de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); as FIGS. 29C e 30C

mostram os dados para as células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e as FIGS. 29D e 30D mostram os dados para células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+).

[0062] As FIGS. 31A e 31B representam uma comparação de subconjuntos de CD27 de subconjuntos CD4 (FIG. 31A) e CD8 (FIG. 31B) para PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx, usando TIL de melanoma como um comparador.

[0063] As FIGS. 32A e 32B representam uma comparação de subconjuntos CD28 de subconjuntos CD4 (FIG. 32A) e CD8 (FIG. 32B) para PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx, usando TIL de melanoma como um comparador.

[0064] As FIGS. 33A e 33B representam uma comparação de subconjuntos LAG3+ dentro das populações de CD4 (FIG. 33A) e CD8 (FIG. 33B) tanto para PBLs Pré-Rx quanto para PBLs Pós-Rx.

[0065] As FIGS. 34A e 34B representam uma comparação de subconjuntos PD1+ dentro das populações CD4 (FIG. 34A) e CD8 (FIG. 34B) tanto para PBLs Pré-Rx quanto para PBLs Pós-Rx.

[0066] As FIGS. 35A e 35B mostram resultados da atividade citolítica de PBLs Pré-Rx (FIG. 35A) e PBLs Pós-Rx (FIG. 35B), medida usando um ensaio de morte de tumor autólogo. A citotoxicidade é medida como o LU₅₀ (o número de PBLs requerido para matar 50% das células alvo).

[0067] As FIGS. 36A e 36B representam gráficos da expansão multiplicativa para MILs (FIG. 36A) e PBLs (FIG. 36B) isolados da medula óssea (MILs) ou sangue periférico (PBLs) de pacientes AML. MIL1,1 foi expandido usando o Método MIL 1, MIL1,2 foi expandido usando o Método MIL 2 e MIL1,3 foi expandido usando o Método MIL 3. MIL2 e MIL3 foram expandidos usando o Método MIL 3. Todos PBLs foram expandidos usando o Método PBL 3. O número de célula de partida para MIL1.3 foi de 138.000 células, para MIL2 foi 62.000 e para MIL 3 foi 28.000 células. O número de

célula de partida para PBL2 foi 338.000 e para PBL3 foi 336.000.

[0068] As FIGS. 37A e 37B ilustram células produtoras de IFN- λ para cada um de MILs (FIG. 37A) e PBLs (FIG. 37B).

[0069] As FIGS. 38A-38F representam gráficos ilustrando subconjuntos de célula T em MILs (FIGS. 38A-38C) e PBLs (FIGS. 38D-38F) isolados de pacientes com AML. As FIGS. 38A e 38D ilustram subconjuntos TCR $\alpha\beta$ +, as FIGS. 38B e 38E ilustram subconjuntos CD4+ e as FIGS. 38C e 38F ilustram subconjuntos CD8. Os PBLs são mostrados no Dia 0 e no Dia 14.

[0070] As FIGS. 39A-39D representam gráficos ilustrando subconjuntos de memória CD4 para MILs isolados de pacientes com AML. A FIG. 39A mostra dados para (CCR7+/CD45RA+) ingênuas; a FIG. 39B mostra dados para as células t de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); a FIG. 39C mostra dados para as células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e a FIG. 39D mostra dados para células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+).

[0071] As FIGS. 40A-40D representam gráficos ilustrando subconjuntos de memória CD4 para PBLs isolados de pacientes com AML. A FIG. 40A mostra dados para (CCR7+/CD45RA+) ingênuas; a FIG. 40B mostra dados para as células t de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); a FIG. 40C mostra dados para células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e a FIG. 40D mostra dados para células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+).

[0072] As FIGS. 41A-41D representam gráficos ilustrando subconjuntos de memória CD8 para MILs isolados de pacientes AML. A FIG. 41A mostra dados para (CCR7+/CD45RA+) ingênuo; a FIG. 41B mostra dados para as células t de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); a FIG. 41C mostra dados para células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e a FIG. 41D mostra dados para células efetoras de memória terminalmente

diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+).

[0073] As FIGS. 42A-42D representam gráficos ilustrando subconjuntos de memória CD8 para PBLs isolados de pacientes com AML. A FIG. 42A mostra dados para (CCR7+/CD45RA+) ingênuo; a FIG. 42B mostra dados para as células t de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); a FIG. 42C mostra dados para células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e a FIG. 42D mostra dados para células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+).

[0074] As FIGS. 43A e 43B representam gráficos ilustrando subconjuntos CD27 de populações de células CD4 e CD8 para MILs (FIG. 43A) e PBLs (FIG 43B).

[0075] As FIGS. 44A e 44B representam gráficos ilustrando subconjuntos CD28 de populações de células CD4 e CD8 para MILs (FIG. 44A) e PBLs (FIG. 44B).

[0076] As FIGS. 45A e 45B representam gráficos ilustrando subconjuntos PD1+ de populações de células CD4 e CD8 para MILs (FIG. 45A) e PBLs (FIG. 45B).

[0077] FIGS. 46A e 46B representam gráficos ilustrando LAG3+ subconjuntos of CD4 e CD8 populações de células para MILs (FIG. 46A) e PBLs (FIG. 46B).

[0078] A FIG. 47 é uma linha cronológica ilustrando modalidades exemplares do Método PBL 1 e Método PBL 3. Nesta figura, a adição de IL-2 pode ocorrer em qualquer ponto no tempo durante o processo e em uma modalidade exemplar, sobre a área entre colchetes.

[0079] A FIG. 48 é uma linha cronológica ilustrando uma modalidade exemplar do Método MIL 3. Nesta figura, a adição de IL-2 pode ocorrer em qualquer ponto no tempo durante o processo e em uma modalidade exemplar, sobre a área entre colchetes.

BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0080] A SEQ ID NO: 1 é a sequência de aminoácidos da cadeia pesada de muromonab.

[0081] A SEQ ID NO: 2 é a sequência de aminoácidos da cadeia leve de muromonab.

[0082] A SEQ ID NO: 3 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-2 humana recombinante.

[0083] A SEQ ID NO: 4 é a sequência de aminoácidos de aldesleucina.

[0084] A SEQ ID NO: 5 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-4 humana recombinante.

[0085] A SEQ ID NO: 6 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-7 humana recombinante.

[0086] A SEQ ID NO: 7 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-15 humana recombinante.

[0087] A SEQ ID NO: 8 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-21 humana recombinante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0088] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como é habitualmente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual esta invenção pertence. Todas as patentes e publicações aqui aludidas são incorporadas por referência nas suas totalidades.

Definições

[0089] Os termos “coadministração,” “coadministrar,” “administrado em combinação com,” “administrar em combinação com,” “simultâneo,” e “concorrente,” como aqui usados, abrangem a administração de dois ou mais ingredientes farmacêticamente ativos a um sujeito de modo que tanto is ingredientes farmacêticamente ativos quanto/ou seus metabólitos estejam presentes no sujeito ao mesmo tempo. Coadministração inclui administração

simultânea em composições separadas, administração em tempos diferentes em composições separadas, ou administração em uma composição em que dois ou mais ingredientes farmacêuticamente ativos estão presentes. A administração simultânea em composições separadas e a administração em uma composição em que ambos os agentes estão presentes são preferidas.

[0090] O termo “*in vivo*” refere-se a um evento que ocorre em um corpo de sujeito mamífero.

[0091] O termo “*ex vivo*” refere-se um evento que ocorre fora de um corpo de sujeito mamífero, em um ambiente artificial.

[0092] O termo “*in vitro*” refere-se a um evento que ocorre em um sistema de teste. Ensaaios *in vitro* abrangem ensaios com base em célula em que células vivas ou mortas são utilizadas e também podem abranger um ensaio livre de célula no qual nenhuma célula intacta é utilizada.

[0093] O termo “expansão rápida” significa um aumento no número de TILs específicos de antígeno de pelo menos cerca de 3 vezes (ou 4, 5, 6, 7, 8, ou 9 vezes) em um período de uma semana, mais preferivelmente pelo menos cerca de 10 vezes (ou 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, ou 90 vezes) em um período de uma semana, ou o mais preferivelmente pelo menos cerca de 100 vezes em um período de uma semana. Vários protocolos de expansão rápida são aqui descritos.

[0094] Os termos “fragmentar,” “fragmento,” e “fragmentado,” como aqui usados para descrever processos para romper um tumor, incluem métodos de fragmentação mecânica tais como esmagamento, fatiamento, divisão e morcelação de tecido de tumor assim como qualquer outro método para romper a estrutura física de tecido de tumor.

[0095] Os termos “células mononucleares do sangue periférico” e “PBMCs” referem-se a uma célula de sangue periférico tendo um núcleo redondo, incluindo linfócitos (células T, células B, células NK) e monócitos. Opcionalmente, as células mononucleares do sangue periférico são células

mononucleares do sangue periférico alogênicas irradiadas. São células que apresentam antígeno. O termo “PBLs” refere-se aos Linfócitos de Sangue Periférico e são células T expandidas a partir do sangue periférico. Os termos PBL e TIL são aqui usados intercambiavelmente.

[0096] O termo “anticorpo anti-CD3” refere-se a um anticorpo ou variante dos mesmos, por exemplo, um anticorpo monoclonal e incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos ou de murino que são direcionados contra o receptor de CD3 no receptor antigênico de célula T de células T maduras. Os anticorpos anti-CD3 incluem OKT-3, também conhecidos como muromonab e UCHT-1. Outros anticorpos anti-CD3 incluem, por exemplo, orelizumab, teplizumab e visilizumab.

[0097] O termo “OKT-3” (também aqui aludido como “OKT3”) refere-se a um anticorpo monoclonal ou biossimilar ou variante dos mesmos, incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos, ou de murino, direcionados contra o receptor de CD3 no receptor antigênico de célula T de células T maduras e inclui formas comercialmente disponíveis tais como OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 puro, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA) e muromonab ou variantes, substituições de aminoácido conservativas, glicoformas, ou biossimilares dos mesmos. As sequências de aminoácido das cadeias pesada e leve de muromonab são dadas na Tabela 1 (SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2). Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 é depositado com a American Type Culture Collection e designado o número de acesso ATCC CRL 8001. Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 também é depositado com a European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) e designado Catálogo No. 86022706.

TABELA 1. Sequências de aminoácido de muromonab.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)	
SEQ ID NO: 1	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY	60
Muromonab	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA	120
cadeia pesada	KTTAPSVYPL APVCGGTGTS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAPVLSDL	180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)	
SEQ ID NO: 2	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH	60
Muromonab	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS	120
cadeia leve	SEQLTSGGAS VVCFLNFPYP KDINVWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLT	180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	213

[0098] O termo “IL-2” (também aqui aludido como “IL2”) refere-se ao fator de crescimento de célula T conhecido como interleucina-2 e inclui todas as formas de IL-2 incluindo as formas humana e mamífera, as substituições de aminoácido conservativas, glicoformas, biossimilares e variantes dos mesmos. IL-2 é descrito, por exemplo, em Nelson, *J. Immunol.* **2004**, 172, 3983-88 e Malek, *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, 26, 453-79, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. A sequência de aminoácidos de IL-2 humana recombinante adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 3). Por exemplo, o termo IL-2 abrange as formas humanas, recombinantes de IL-2 tais como aldesleucina (PROLEUCINA, comercialmente disponível de múltiplos fornecedores em 22 milhões de IU por frasco de uso único), assim como a forma de IL-2 recombinante comercialmente fornecidos pela CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) ou ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-209-b) e outros equivalentes comerciais de outros fornecedores. A aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana) é uma forma recombinante humana não glicosilada de IL-2 com um peso molecular de aproximadamente 15 kDa. A sequência de aminoácidos de aldesleucina adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 4). O termo IL-2 também abrange formas peguiladas de IL-2, como aqui descritas, incluindo o pró-fármaco IL2 peguilado NKTR-214, disponível da Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214 e IL-2 peguilada adequadas para o uso na invenção são descritas na Publicação do Pedido de Patente No. US 2014/0328791 A1 e Publicação do Pedido de patente Internacional No. WO 2012/065086 A1, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As formas alternativas de IL-2 conjugada adequadas para o uso na invenção são descritas nas Patentes norte-americanas

nº 4.766.106, 5.206.344, 5.089.261 e 4.902.502, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As formulações de IL-2 adequadas para o uso na invenção são descritas na Patente norte-americana nº 6.706.289, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência.

TABELA 2. Sequências de aminoácidos de interleucinas.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de uma Letra)	
SEQ ID NO: 3	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLD DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL	60
IL-2 humana	EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN	120
recombinante (rhIL-2)	RWITFCQSII STLT	134
SEQ ID NO: 4	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE	60
Aldelesleucina	ELKPLEEVLN LAQSKNFH LRPRDLISNI IVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLNRW	120
	ITFSQSIIST LT	132
SEQ ID NO: 5	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH	60
IL-4 humana	EKDTKCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLTKI	120
recombinante (rhIL-4)	MREKYSKCSS	130
SEQ ID NO: 6	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLDLSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA	60
IL-7 humana	ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVGSEGTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL	120
recombinante (rhIL-7)	KEQKKLNDLC FLKRLQLEIK TCWNKILMGT KEH	153
SEQ ID NO: 7	MNWNVNISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTM MKCFLLLELQV ISLES GDASI	60
IL-15 humana	HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHVIVQM FINTS	115
recombinante (rhIL-15)		
SEQ ID NO: 8	MQDRHMIRM QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG	60
IL-2 humana	NNERIINVTI KKLKRKPPST NAGRQRKHL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQLKMIHQ	120
recombinante (rhIL-21)	HLSSRTHGSE DS	132

[0099] O termo “IL-4” (também aqui aludido como “IL4”) refere-se à citocina conhecida como interleucina 4, que é produzida pelas células T Th2 e pelos eosinófilos, basófilos e mastóides. A IL-4 regula a diferenciação de células T auxiliares ingênuas (células Th0) para células T Th2. Steinke e Borish, *Respir. Res.* **2001**, 2, 66-70. Na ativação pela IL-4, as células T Th2 subsequentemente produzem mais IL-4 em uma alça de retroalimentação positiva. A IL-4 também estimulam a proliferação de célula B e a expressão de MHC classe II e induz a comutação de classe para a expressão de IgE e IgG₁ a partir de células B. A IL-4 recombinante humana adequada para o uso na invenção está comercialmente disponível de múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-211) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante de IL-15 humana, Cat. No. Gibco CTP0043). A sequência de aminoácidos de IL-4 humana recombinante adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 5).

[00100] O termo “IL-7” (também aqui aludido como “IL7”) refere-se a uma citocina derivada de tecido glicosilada conhecida como interleucina 7, que pode ser obtida a partir de células estrômicas e epiteliais, assim como a partir de células dendríticas. Fry e Mackall, *Blood* **2002**, 99, 3892-904. A IL-7 pode estimular o desenvolvimento de células T. A IL-7 liga-se ao receptor de IL-7, um heterodímero consistindo do receptor alfa de IL-7 e receptor de cadeia gama comum, que em uma série de sinais importantes para o desenvolvimento de célula T dentro do timo e sobrevivência dentro da periferia. A IL-7 humana recombinante adequada para o uso na invenção está comercialmente disponível de múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-254) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante IL-7 humana, Cat. No. Gibco PHC0071). A sequência de aminoácidos de IL-7 recombinante humana adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 6).

[00101] O termo “IL-15” (também aqui aludido como “IL15”) refere-se ao fator de crescimento de célula T conhecido como interleucina-15 e inclui todas as formas de IL-15 incluindo as formas humanas e de mamífero, substituições de aminoácido conservativas, glicoformas, biossimilares e variantes das mesmas. IL-15 está descrita, por exemplo, em Fehniger e Caligiuri, *Blood* **2001**, 97, 14-32, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. IL-15 compartilha as subunidades do receptor de sinalização β e γ com IL-2. A IL-15 recombinante humana é uma cadeia única de polipeptídeo, não glicosilada contendo 114 aminoácidos (e uma metionina no terminal N) com uma massa molecular de 12,8 kDa. A IL-15 recombinante humana está comercialmente disponível de múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-230-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante de IL-15 humana, Cat. No. 34-8159-82). A sequência de aminoácidos da IL-15

recombinante humana adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 7).

[00102] O termo “IL-21” (também aqui aludido como “IL21”) refere-se à proteína de citocina pleiotrópica conhecida como interleucina-21 e inclui todas as formas de IL-21 incluindo as formas humanas e de mamífero, substituições de aminoácido conservativas, glicoformas, biossimilares e variantes da mesma. A IL-21 está descrita, por exemplo, em Spolski e Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2014**, *13*, 379-95, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. A IL-21 é primariamente produzida pelas células matadoras naturais e células T CD4⁺ humanas ativadas. A IL-21 recombinante humana é uma cadeia única de polipeptídeo, não glicosilada contendo 132 aminoácidos com uma massa molecular de 15,4 kDa. A IL-21 recombinante humana está comercialmente disponível de múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-408-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante de IL-21 humana, Cat. No. 14-8219-80). A sequência de aminoácidos da IL-21 recombinante humana adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 8).

[00103] Os termos “carreador farmacêuticamente aceitável” ou “excipiente farmacêuticamente aceitável” são intencionados a incluir qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção e ingredientes inertes. O uso de tais carreadores farmacêuticamente aceitáveis ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis para ingredientes farmacêuticos ativos é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer carreador farmacêuticamente aceitável ou excipiente farmacêuticamente aceitável convencionais sejam incompatíveis com o ingrediente farmacêutico ativo, o seu uso nas composições terapêuticas da invenção é considerado. Ingredientes farmacêuticos ativos adicionais, tais como outros fármacos,

também podem ser incorporados nas composições, processos e métodos descritos.

[00104] Os termos “anticorpo” e a sua forma plural “anticorpos” referem-se às imunoglobulinas inteiras e qualquer fragmento de ligação a antígeno (“porção de ligação a antígeno”) ou cadeias únicas dos mesmos. Um “anticorpo” refere-se ainda a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas pelas ligações de dissulfeto, ou uma porção de ligação a antígeno das mesmas. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável da cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável da cadeia leve (abreviada aqui como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L de um anticorpo podem ser subdivididas ainda nas regiões de hipervariabilidade, que são aludidas como regiões determinantes de complementaridade (CDR) ou regiões hipervariáveis (HVR) e que podem ser intercaladas com regiões que sejam mais conservadas, denominadas de regiões de armação (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino para terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interaja com um epítipo ou epítipos de antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico.

[00105] O termo “antígeno” refere-se a uma substância que induz uma resposta imune. Em algumas modalidades, um antígeno é uma molécula capaz de ser ligada por um anticorpo ou um receptor de célula T (TCR) se

apresentado pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC). O termo “antígeno”, como aqui usado, também abrange epítomos de célula T. Um antígeno é adicionalmente capaz de ser reconhecido pelo sistema imune. Em algumas modalidades, um antígeno é capaz de induzir uma resposta imune humoral ou uma resposta imune celular levando à ativação de linfócitos B e/ou linfócitos T. Em alguns casos, isto pode requerer que o antígeno contenha ou esteja ligado a um epítomo de célula Th. Um antígeno também pode ter um ou mais epítomos (por exemplo, epítomos B e T). Em algumas modalidades, um antígeno preferivelmente reagirá, tipicamente em uma maneira altamente específica e seletiva, com o seu anticorpo ou TCR correspondentes e não com a multidão de outros anticorpos ou TCRs que possam ser induzidos por outros antígenos.

[00106] Os termos “anticorpo monoclonal,” “mAb,” “composição de anticorpo monoclonal,” ou suas formas plurais referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal demonstra uma especificidade e afinidade de ligação únicas para um epítomo particular. Anticorpos monoclonais específicos para receptores de TNFRSF podem ser fabricados usando o conhecimento e habilidade na técnica de injetar sujeitos de teste com o antígeno adequado e depois isolar hibridomas expressando anticorpos tendo a sequência ou características funcionais desejadas. O DNA codificando os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando-se sondas de oligonucleotídeo que são capazes de ligar especificamente aos genes codificando as cadeias pesadas e leves dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado dentro de vetores de expressão, que são depois transfectados em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS síbias, células do ovário do hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outro modo

não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. A produção de anticorpos recombinantes será descrita em mais detalhes abaixo.

[00107] Os termos “porção de ligação a antígeno” ou “fragmento de ligação a antígeno” de um anticorpo (ou simplesmente a “porção de anticorpo” ou “fragmento”), como aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade para ligar especificamente a um antígeno. Foi mostrado que a função de ligação a antígeno de um anticorpo pode ser realizada pelos fragmentos de um anticorpo de tamanho natural. Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo “porção de ligação a antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo dos domínios V_L , V_H , C_L e $CH1$; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd consistindo dos domínios V_H e $CH1$; (iv) um fragmento Fv consistindo dos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento de anticorpo de domínio (dAb) (Ward, *et al.*, *Nature*, **1989**, 341, 544-546), que pode consistir em um domínio V_H ou um V_L ; e (vi) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , são codificados pelos genes separados, eles podem ser juntados, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que os possibilitam ser fabricado como uma cadeia de proteína única em que o par de regiões V_L e V_H emparelham para formar moléculas monovalentes conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); ver, por exemplo, Bird, *et al.*, *Science* **1988**, 242, 423-426; e Huston, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5879-5883). Tais anticorpos scFv também são intencionados ser abrangidos dentro dos termos “porção de ligação a antígeno” ou “fragmento de ligação a antígeno” de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando

técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica e os fragmentos são triados quanto a utilidade da mesma maneira como o são os anticorpos intactos.

[00108] O termo “anticorpo humano,” como aqui usado, é intencionado incluir anticorpos tendo regiões variáveis em que tanto a armação quanto as regiões de CDR são derivadas de sequências da imunoglobulina da linha germinativa humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas pela mutagênese aleatória ou loco-específica *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*). O termo “anticorpo humano”, como aqui usado, não é intencionado a incluir anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de uma outra espécie mamífera, tal como um camundongo, foram enxertadas nas sequências da armação humana.

[00109] O termo “anticorpo monoclonal humano” refere-se aos anticorpos demonstrando uma especificidade de ligação única que têm regiões variáveis em que as regiões tanto de armação quanto de CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve fundido a uma célula imortalizada.

[00110] O termo “anticorpo recombinante humano”, como aqui usado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados pelos meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um

animal (tal como um camundongo) que seja transgênico ou transcrômossômico para genes da imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir destes (descritos mais abaixo), (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo, de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo humano recombinante, combinatório e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva a junção de sequências de gene da imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis em que a armação e regiões de CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas modalidades, entretanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para as sequências da Ig humana é usado, mutagênese somática *in vivo*) e assim as sequências de aminoácidos das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas das e relacionadas com as sequências V_H e V_L da linha germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha germinativa de anticorpo humano *in vivo*.

[00111] Como aqui usado, “isótipo” refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificado pelos genes da região constante de cadeia pesada.

[00112] As frases “um anticorpo que reconhece um antígeno” e “um anticorpo específico para um antígeno” são usados intercambiavelmente aqui com o termo “um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno.”

[00113] O termo “derivados de anticorpo humano” refere-se a qualquer forma modificada do anticorpo humano, incluindo um conjugado do anticorpo e um outro ingrediente ou anticorpo farmacologicamente ativos. Os termos “conjugado,” “conjugado de anticorpo-fármaco”, “ADC” ou “imunoconjugado” referem-se a um anticorpo, ou um fragmento do mesmo,

conjugado a uma outra porção terapêutica, que pode ser conjugada aos anticorpos aqui descritos usando métodos disponíveis na técnica.

[00114] Os termos “anticorpo humanizado,” “anticorpos humanizados,” e “humanizados” são intencionados a se referir aos anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de uma outra espécie de mamífero, tais como um camundongo, foi enxertado nas sequências da armação humana. As modificações da região de armação adicionais podem ser feitas dentro das sequências da armação humana. As formas humanizadas de anticorpos não humanos (por exemplo, de murino) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que os resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos pelos resíduos de uma região hipervariável 15 de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região de armação Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. No geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas das alças hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas das regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones, *et al.*, *Nature* **1986**, 321, 522-525; Riechmann,

et al., *Nature* **1988**, 332, 323-329; e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* **1992**, 2, 593-596. Os anticorpos aqui descritos também podem ser modificados para utilizar qualquer variante Fc que é conhecida comunicar uma melhora (por exemplo, redução) na função efetora e/ou ligação FcR. As variantes Fc podem incluir, por exemplo, qualquer uma das substituições de aminoácido divulgadas nas Publicações de Pedido de Patente Internacional Nos. WO 1988/07089 A1, WO 1996/14339 A1, WO 1998/05787 A1, WO 1998/23289 A1, WO 1999/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 2000/09560 A2, WO 2000/32767 A1, WO 2000/42072 A2, WO 2002/44215 A2, WO 2002/060919 A2, WO 2003/074569 A2, WO 2004/016750 A2, WO 2004/029207 A2, WO 2004/035752 A2, WO 2004/063351 A2, WO 2004/074455 A2, WO 2004/099249 A2, WO 2005/040217 A2, WO 2005/070963 A1, WO 2005/077981 A2, WO 2005/092925 A2, WO 2005/123780 A2, WO 2006/019447 A1, WO 2006/047350 A2 e WO 2006/085967 A2; e Patentes norte-americanas nº 5.648.260, 5.739.277, 5.834.250, 5.869.046, 6.096.871, 6.121.022, 6.194.551, 6.242.195, 6.277.375, 6.528.624, 6.538.124, 6.737.056, 6.821.505, 6.998.253 e 7.083.784, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência.

[00115] O termo “anticorpo quimérico” é intencionado a referir-se aos anticorpos nos quais as sequências da região variável são derivadas de uma espécie e as sequências da região constante são derivadas de uma outra espécie, tal como um anticorpo no qual as sequências da região variável são derivadas de um anticorpo de camundongo e as sequências da região constante são derivadas de um anticorpo humano.

[00116] Um “diacorpo” é um fragmento de anticorpo pequeno com dois sítios de ligação a antígeno. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica (V_H - V_L ou V_L - V_H). Usando-se um ligante que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois

domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de uma outra cadeia e criar dois sítios de ligação a antígeno. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, na Patente Europeia nº EP 404.097, Publicação de Patente Internacional nº WO 93/11161; e Bolliger, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6444-6448.

[00117] O termo “glicosilação” refere-se a um derivado modificado de um anticorpo. Um anticorpo aglicosilado carece da glicosilação. A glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno. tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, alterando-se um ou mais sítios de glicosilação dentro da sequência de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas que resultam na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação da armação da região variável para eliminar deste modo a glicosilação neste sítio. A aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno, como descrito nas Patentes norte-americanas nº 5.714.350 e 6.350.861. Adicional ou alternativamente, um anticorpo pode ser fabricado que tem um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos de fucosila ou um anticorpo tendo estruturas GlcNac divididas em duas partes aumentadas. Tais padrões de glicosilação alterada foram demonstrados aumentar a capacidade dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, expressando-se o anticorpo em uma célula hospedeira com mecanismo de glicosilação alterado. As células com mecanismo de glicosilação alterado foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras nas quais expressar anticorpos recombinantes da invenção para deste modo produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, as linhagens de célula Ms704, Ms705 e Ms709 carecem do gene da fucosiltransferase, FUT8 (alfa (1.6) fucosiltransferase), tal que anticorpos expressos nas linhagens de célula Ms704, Ms705 e Ms709 carecem de fucose

nos seus carboidratos. As linhagens de célula FUT8^{-/-} Ms704, Ms705 e Ms709 foram criadas pelo rompimento alvejado do gene FUT8 nas células CHO/DG44 usando dois vetores de substituição (ver por exemplo a Publicação de Patente norte-americana nº 2004/0110704 ou Yamane-Ohnuki, *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 87, 614-622). Como um outro exemplo, a Patente Europeia nº EP 1.176.195 descreve uma linhagem de célula com um gene FUT8 funcionalmente rompido, que codifica uma fucosil transferase, tal que os anticorpos expressos em uma tal linhagem de célula exibem hipofucosilação pela redução ou eliminação da enzima relacionada com a ligação alfa 1,6 e também descreve linhagens celulares que têm uma atividade de enzima baixa para adicionar fucose à N-acetilglicosamina que se liga à região Fc do anticorpo ou não tem a atividade enzimática, por exemplo a linhagem de célula de mieloma de rato YB2/0 (ATCC CRL 1662). A publicação de Patente Internacional WO 03/035835 descreve uma linhagem de célula CHO variante, células Lec 13, com capacidade reduzida para fixar fucose aos carboidratos ligados a Asn(297), também resultando na hipofucosilação de anticorpos expressos nesta célula hospedeira (ver também Shields, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26733-26740). A publicação de Patente Internacional WO 99/54342 descreve linhagens celulares engenheiradas para expressar glicosil transferases modificadoras de glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N-acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII)) tal que os anticorpos expressos nas linhagens celulares engenheiradas exibam estruturas de GlcNac divididas aumentadas que resulta na atividade de ADCC aumentada dos anticorpos (ver também Umana, *et al.*, *Nat. Biotech.* **1999**, 17, 176-180). Alternativamente, os resíduos de fucose do anticorpo podem ser separados por clivagem usando uma enzima da fucosidase. Por exemplo, a fucosidase alfa-L-fucosidase remove os resíduos de fucosila dos anticorpos como descrito em Tarentino, *et al.*, *Biochem.* **1975**, 14, 5516-5523.

[00118] “Peguição” refere-se a um anticorpo modificado, ou um fragmento do mesmo, que tipicamente é reagido com polietileno glicol (PEG), tal como um derivado reativo de éster ou aldeído de PEG, sob condições em que um ou mais grupos PEG tornam-se fixados ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. A peguição pode, por exemplo, aumentar a meia vida biológica (por exemplo, soro) do anticorpo. Preferivelmente, a peguição é realizada por intermédio de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Como aqui usado, o termo “polietileno glicol” é intencionado a abranger qualquer uma das formas de PEG que fossem usadas para derivatizar outras proteínas, tais como mono alcóxi (C_1 - C_{10}) - ou arilóxi-polietileno glicol ou polietileno glicol-maleimida. O anticorpo a ser peguado pode ser um anticorpo aglicosilado. Os métodos para peguição são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção, como descrito por exemplo nas Patentes Europeias Nos. EP 0154316 e EP 0401384 e Patente norte-americana nº 5.824.778, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência.

[00119] Os termos “proteína de fusão” ou “polipeptídeo de fusão” referem-se às proteínas que combinam as propriedades de duas ou mais proteínas individuais. Tais proteínas têm pelo menos dois polipeptídeos heterólogos covalentemente ligados diretamente ou por intermédio de um ligante de aminoácido. Os polipeptídeos formando a proteína de fusão são tipicamente ligados do terminal C ao terminal N, embora eles também possam estar ligados do terminal C ao terminal C, terminal N ao terminal N, ou terminal N ao terminal C. Os polipeptídeos da proteína de fusão podem estar em qualquer ordem e podem incluir mais do que um de cada um ou ambos dos polipeptídeos constituintes. O termo abrange variantes conservativamente modificadas, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsequências, homólogos interespecies e fragmentos imunogênicos dos antígenos que

compõem a proteína de fusão. As proteínas de fusão da divulgação também podem compreender cópias adicionais de um antígeno componente ou fragmento imunogênico dos mesmos. A proteína de fusão pode conter um ou mais domínios de ligação ligados juntos e ligados ainda a um domínio Fc, tal como um domínio Fc de IgG. As proteínas de fusão podem ser ligadas ainda juntas para imitar um anticorpo monoclonal e prover seis ou mais domínios de ligação. As proteínas de fusão podem ser produzidas pelos métodos recombinantes como são conhecidos na técnica. A preparação de proteínas de fusão é conhecida na técnica e está descrita, por exemplo, nas Publicações de Pedido de Patente Internacional Nos. WO 1995/027735 A1, WO 2005/103077 A1, WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1, WO 2010/078966 A1, Publicação dos Pedidos de Patente norte-americanos nº US 2015/0125419 A1 e US 2016/0272695 A1 e Patente norte-americana nº 8.921.519, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência.

[00120] O termo “heterólogo” quando usado com referência às porções de um ácido nucleico ou proteína indica que o ácido nucleico ou proteína compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação uma com a outra na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico é de modo típico recombinantemente produzido, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionadas dispostas para compor um novo ácido nucleico funcional, por exemplo, um promotor de uma fonte e uma região codificadora de uma outra fonte, ou regiões codificadoras de fontes diferentes. Similarmente, uma proteína heteróloga indica que a proteína compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação uma com a outra na natureza (por exemplo, uma proteína de fusão).

[00121] O termo “substituições de aminoácido conservativas” significa modificações de sequência de aminoácidos que não anulam a ligação de um anticorpo ou proteína de fusão ao antígeno. Substituições de aminoácido

conservativas incluem a substituição de um aminoácido em uma classe por um aminoácido da mesma classe, onde uma classe é definida pelas propriedades de cadeia lateral de aminoácido físico-químicas comuns e altas frequências de substituição em proteínas homólogos encontradas na natureza, como determinado, por exemplo, por uma matriz de troca de frequência de Dayhoff padrão ou matriz BLOSUM. Seis classes gerais de cadeias laterais de aminoácido foram categorizadas e incluem: Classe I (Cys); Classe II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Classe III (Asn, Asp, Gln, Glu); Classe IV (His, Arg, Lys); Classe V (Ile, Leu, Val, Met); e Classe VI (Phe, Tyr, Trp). Por exemplo, a substituição de um Asp no lugar de um outro resíduo de classe III tal como Asn, Gln, ou Glu, é uma substituição conservativa. Assim, um resíduo de aminoácido prognosticado não essencial em um anticorpo é preferivelmente substituído com um outro resíduo de aminoácido da mesma classe. Os métodos de identificar substituições conservativas de aminoácido que não eliminam a ligação ao antígeno são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Brummell, *et al.*, *Biochemistry* **1993**, 32, 1180-1187; Kobayashi, *et al.*, *Protein Eng.* **1999**, 12, 879-884 (1999); e Burks, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 412-417.

[00122] Os termos “identidade de sequência,” “identidade percentual,” e “identidade percentual de sequência” (ou sinônimos dos mesmos, por exemplo, “99% idênticos”) no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou polipeptídeos, referência a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas ou têm uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácido que são os mesmos, quando comparados e alinhados (introduzindo intervalos, se necessário) para correspondência máxima, não considerando nenhuma das substituições de aminoácido conservativas como parte da identidade de sequência. A identidade percentual pode ser medida usando software ou algoritmos de comparação de sequência ou pela inspeção visual. Vários algoritmos e software são conhecidos na técnica que podem ser

usados para se obter alinhamentos de sequências de aminoácidos ou nucleotídeos. Os programas adequados para determinar a identidade de sequência percentual incluem por exemplo o pacote BLAST de programas disponível do U.S. Government's National Center for Biotechnology Information BLAST web site. As comparações entre duas sequências podem ser realizadas usando o algoritmo BLASTN ou BLASTP. BLASTN é usado para comparar sequências de ácido nucleico, enquanto BLASTP é usado para comparar sequências de aminoácidos. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Califórnia) ou MegAlign, disponível da DNASTAR, são programas de software adicionais publicamente disponíveis que podem ser usados para alinhar sequências. Uma pessoa versada na técnica pode determinar parâmetros apropriados para alinhamento máximo pelo software de alinhamento particular. Em certas modalidades, os parâmetros de default do software de alinhamento são usados.

[00123] Como aqui usado, o termo “variante” abrange mas não é limitado aos anticorpos ou proteínas de fusão que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos de um anticorpo de referência por intermédio de uma ou mais substituições, deleções e/ou adições em certas posições dentro ou adjacente à sequência de aminoácidos do anticorpo de referência. A variante pode compreender uma ou mais substituições conservativas na sua sequência de aminoácidos quando comparada com a sequência de aminoácidos de um anticorpo de referência. As substituições conservativas podem envolver, por exemplo, a substituição de aminoácidos similarmente carregados ou não carregados. A variante retém a capacidade para especificamente se ligar ao antígeno do anticorpo de referência. O termo variante também inclui anticorpos ou proteínas peguillados.

[00124] As sequências de ácido nucleico implicitamente abrangem variantes conservativamente modificadas das mesmas (por exemplo,

substituições de códon degenerado) e sequências complementares, assim como a sequência explicitamente indicada. Especificamente, as substituições de códon degeneradas podem ser obtidas pela geração de sequências em que a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída com resíduos de base mista e/ou desoxiinosina. Batzer, *et al.*, *Nucleic Acid Res.* **1991**, 19, 5081; Ohtsuka, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 2605-2608; Rossolini, *et al.*, *Mol. Cell. Probes* **1994**, 8, 91-98. O termo ácido nucleico é usado intercambiavelmente com cDNA, mRNA, oligonucleotídeo e polinucleotídeo.

[00125] O termo “biossimilar” significa um produto biológico, incluindo um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão, que é altamente similar a um produto biológico de referência não obstante diferenças menores nos componentes clinicamente inativos e para os quais não há nenhuma diferença clinicamente significativa entre o produto biológico e o produto de referência em termos da segurança, pureza e potência do produto. Além disso, um remédio biológico similar ou “biossimilar” é um remédio biológico que é similar a um outro remédio biológico que já foi autorizado para o uso pela European Medicines Agency. O termo “biossimilar” também é usado sinonimamente por outras agências reguladoras nacional e regional. Os produtos biológicos ou remédios biológicos são remédios que são fabricados por ou derivados de uma fonte biológica, tal como uma bactéria ou levedura. Eles podem consistir em moléculas relativamente pequenas tais como insulina humana ou eritropoietina, ou moléculas complexas tais como anticorpos monoclonais. Por exemplo, se a proteína IL-2 de referência for aldesleucina (PROLEUKIN), uma proteína aprovada pelas autoridades reguladoras de fármaco com referência à aldesleucina é uma “biossimilar para” aldesleucina ou é um “biossimilar da mesma” de aldesleucina. Na Europa, um remédio similar biológico ou “biossimilar” é um remédio biológico que é similar a um outro remédio biológico que já foi autorizado para o uso pela European

Medicines Agency (EMA). A base legal relevante para aplicações biológicas similares na Europa é o Artigo 6 da Regulamentação (EC) No 726/2004 e Artigo 10(4) da Diretiva 2001/83/EC, como emendada e portanto na Europa, o biossimilar pode ser autorizado, aprovado para autorização ou objeto de um pedido para autorização sob o Artigo 6 da Regulamentação (EC) No 726/2004 e Artigo 10(4) da Diretiva 2001/83/EC. O produto medicinal biológico original já autorizado pode ser aludido como um “produto medicinal de referência” na Europa. Algumas das exigências para um produto ser considerado um biossimilar são esboçados no CHMP Guideline on Similar Biologic Medicinal Products. Além disso, as diretrizes específicas de produto, incluindo diretrizes com respeito aos biossimilares de anticorpo monoclonal, são providos em uma base de produto por produto pela EMA e publicados no seu website. Um biossimilar como aqui descrito pode ser similar ao produto medicinal de referência por intermédio de características de qualidade, atividade biológica, mecanismo de ação, perfis de segurança e/ou eficácia. Além disso, o biossimilar pode ser usado ou ser pretendido para o uso para tratar as mesmas condições como o produto medicinal de referência. Assim, um biossimilar como aqui descrito pode ser julgado ter características de qualidade similares ou altamente similares a um produto medicinal de referência. Alternativamente, ou além disso, um biossimilar como aqui descrito pode ser julgado ter atividade biológica similar ou altamente similar a um produto medicinal de referência. Alternativamente, ou além disso, um biossimilar como aqui descrito pode ser julgado ter um perfil de segurança similar ou altamente similar a um produto medicinal de referência. Alternativamente, ou além disso, um biossimilar como aqui descrito pode ser julgado ter eficácia similar ou altamente similar a um produto medicinal de referência. Como aqui descrito, um biossimilar na Europa é comparado a um produto medicinal de referência que foi autorizado pelo EMA. Entretanto, em alguns casos, o biossimilar pode ser comparado a um produto medicinal

biológico que tenha sido autorizado fora da Área Econômica Europeia (um “comparador” não autorizado na EEA) em certos estudos. Tais estudos incluem por exemplo certos estudos clínicos e não clínicos *in vivo*. Como aqui usado, o termo “biossimilar” também se refere a um produto medicinal biológico que foi ou pode ser comparado a um comparador não autorizado na EEA. Certos biossimilares são proteínas tais como anticorpos, fragmentos de anticorpo (por exemplo, porções de ligação a antígeno) e proteínas de fusão. Uma proteína biossimilar pode ter uma sequência de aminoácidos que tenha modificações menores na estrutura de aminoácido (incluindo por exemplo deleções, adições, e/ou substituições de aminoácidos) que não afetam significativamente a função do polipeptídeo. O biossimilar pode compreender uma sequência de aminoácidos tendo uma identidade de sequência de 97% ou maior com a sequência de aminoácidos do seu produto medicinal de referência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100%. O biossimilar pode compreender uma ou mais modificações pós-traducionais, por exemplo, embora não limitado a glicosilação, oxidação, desamidação, e/ou truncagem que é/são diferentes das modificações pós-traducionais do produto medicinal de referência, contanto que as diferenças não resultem em uma mudança na segurança e/ou eficácia do produto medicinal. O biossimilar pode ter um padrão de glicosilação idêntico ou diferente ao produto medicinal de referência. Particularmente, embora não exclusivamente, o biossimilar pode ter um padrão de glicosilação diferente se as diferenças tratam ou são intencionadas para tratar problemas de segurança associados com o produto medicinal de referência. Adicionalmente, o biossimilar pode desviar do produto medicinal de referência por exemplo na sua concentração, forma farmacêutica, formulação, excipientes e/ou apresentação, provendo segurança e a eficácia do produto medicinal não é comprometida. O biossimilar pode compreender diferenças por exemplo nos perfis farmacocinéticos (PK) e/ou farmacodinâmicos (PD) quando comparado com o produto medicinal de

referência, mas ainda é julgado suficientemente similar ao produto medicinal de referência como para ser autorizado ou considerado adequado para autorização. Em certas circunstâncias, o biossimilar exibe características de ligação diferentes quando comparado com o produto medicinal de referência, em que as características de ligação diferentes são consideradas por uma Autoridade Reguladora tal como o EMA não ser uma barreira para autorização como um produto biológico similar. O termo “biossimilar” é também usado sinonimamente por outras agências reguladoras nacionais e regionais.

[00126] O termo “malignidade hematológica” refere-se a cânceres e tumores mamíferos dos tecidos hematopoiéticos e linfoides, incluindo, mas não limitados a tecidos do sangue, medula óssea, linfônodos e sistema linfático. As malignidades hematológicas podem resultar na formação de um “tumor líquido.” As malignidades hematológicas incluem, mas não são limitados a leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma linfocítico crônico (CLL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crônica (CML), leucemia monocítica aguda (AMoL), linfoma de Hodgkin e linfomas de não Hodgkin. O termo “malignidade hematológica de célula B” refere-se às malignidades hematológicas que afetam as células B.

[00127] O termo “tumor líquido” refere-se a uma massa anormal de células que é fluida por natureza. Os cânceres de tumor líquido incluem, mas não são limitados a leucemias, mielomas e linfomas, assim como outras malignidades hematológicas. Os TILs obtidos a partir de tumores líquidos, incluindo tumores líquidos residentes na medula óssea, também podem ser aqui aludidos como linfócitos infiltrantes de medula óssea (MILs). Os TILs obtidos a partir de tumores líquidos, incluindo tumores líquidos circulantes no sangue periférico, também podem ser aqui aludidos como PBLs. Os termos MIL, TIL e PBL são aqui usados intercambiavelmente e diferem apenas com

base no tipo de tecido a partir do qual as células são derivadas.

[00128] O termo “biópsia” refere-se a qualquer procedimento médico usado para obter células cancerosas, incluindo biópsia de medula óssea.

[00129] Os termos “leucemia mieloide aguda” ou “AML” refere-se aos cânceres das linhagens de célula sanguínea mieloides, que também são conhecidas na técnica como leucemia mielógena aguda e leucemia não linfocítica aguda. Embora a AML seja um tumor líquido, algumas manifestações de AML, incluindo manifestações extramedular tais como cloroma, exibindo propriedades de um tumor sólido, mas são aqui classificadas como um tumor líquido.

[00130] O termo “microambiente,” como aqui usado, pode referir-se ao microambiente do tumor sólido ou hematológico como um todo ou a um subconjunto individual de células dentro do microambiente. O microambiente do tumor, como aqui usado, refere-se a uma mistura complexa de “células, fatores solúveis, moléculas de sinalização, matrizes extracelulares e estímulos mecânicos que promovem a transformação neoplástica, sustentam o crescimento e invasão tumoral, protegem o tumor da imunidade do hospedeiro, reforça a resistência terapêutica e provê nichos para metástases dominantes prosperarem,” como descrito em Swartz, *et al.*, *Cancer Res.*, **2012**, 72, 2473. Embora os tumores expressem antígenos que devam ser reconhecidos pelas células T, a depuração do tumor pelo sistema imune é rara por causa da supressão imune pelo microambiente.

[00131] O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se àquela quantidade de um composto ou combinação de compostos como aqui descritos que seja suficiente para efetuar a aplicação pretendida incluindo, mas não limitada a tratamento de doença. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo da aplicação pretendida (*in vitro* ou *in vivo*), ou do sujeito e condição de doença sendo tratada (por exemplo, o peso, idade e gênero do sujeito), da severidade da

condição de doença, ou da maneira de administração. O termo também se aplica a uma dose que induzirá uma resposta particular em células alvo (por exemplo, a redução de adesão de plaqueta e/ou migração celular). A dose específica variará dependendo dos compostos particulares escolhidos, do regime de dosagem a ser seguida, se o composto é administrado em combinação com outros compostos, cronometragem da administração, do tecido ao qual o mesmo é administrado e do sistema de distribuição física no qual o composto é transmitido.

[00132] Um “efeito terapêutico” como este termo é aqui usado, abrange um benefício terapêutico e/ou um benefício profilático. Um efeito profilático inclui retardar ou eliminar o aparecimento de uma doença ou condição, retardar ou eliminar o início de sintomas de uma doença ou condição, diminuir a velocidade, parar, ou reverter a progressão de uma doença ou condição, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00133] Os termos “tratamento”, “tratando”, “tratar” e semelhantes, se referem à obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completa ou parcialmente uma doença ou sintoma da mesma e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. “Tratamento”, como aqui usado, abrange qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, particularmente em um ser humano e inclui: (a) prevenir a doença de ocorrer em um sujeito que possa estar predisposto para a doença mas ainda não foi diagnosticado como tendo a mesma; (b) inibir a doença, isto é, deter o seu desenvolvimento ou progressão; e (c) aliviar a doença, isto é, causar a regressão da doença e/ou aliviar um ou mais sintomas de doença. “Tratamento” também é intencionado a abranger a liberação de um agente de modo a prover um efeito farmacológico, mesmo na ausência de uma doença ou condição. Por exemplo, “tratamento” abrange a liberação de uma composição que possa evocar uma resposta imune ou

conferir imunidade na ausência de uma condição de doença, por exemplo, no caso de uma vacina.

[00134] Os termos “QD,” “qd,” ou “q.d.” significam *quaque die*, uma vez por dia, ou uma vez ao dia. Os termos “BID,” “bid,” ou “b.i.d.” significam *bis in die*, duas vezes por dia, ou duas vezes ao dia. Os termos “TID,” “tid,” ou “t.i.d.” significam *ter in die*, três vezes por dia, ou três vezes ao dia. Os termos “QID,” “qid,” ou “q.i.d.” significa *quater in die*, quatro vezes por dia, ou quatro vezes ao dia.

[00135] Por “linfócitos infiltrantes de tumor” ou “TILs” aqui é intencionada uma população de células originalmente obtidas como células sanguíneas brancas que deixaram a corrente sanguínea de um sujeito e migraram para dentro de um tumor. TILs incluem, mas não são limitados a células T citotóxicas CD8+ (linfócitos), células T CD4+ Th1 e Th17, células matadoras naturais, células dendríticas e macrófagos M1. TILs incluem tanto TILs primários quanto secundários. “TILs primários” são aqueles que são obtidos a partir de amostras de tecido de paciente como aqui esboçado (algumas vezes aludido como “recém colhidos”) e “TILs secundários” são quaisquer populações de TIL de células que foram expandidas ou proliferadas como aqui debatido, incluindo, mas não limitado a TILs volumosos, TILs expandidos (“REP TILs”) assim como “reREP TILs” como aqui debatidos.

[00136] Os TILs podem ser geralmente definidos bioquimicamente, usando marcadores de superfície celular, ou funcionalmente, pela sua capacidade para infiltrar tumores e efetuar o tratamento. TILs podem ser geralmente categorizados pela expressão de um ou mais dos seguintes biomarcadores: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 e CD25. Adicional ou alternativamente, os TILs podem ser funcionalmente definidos pela sua capacidade para infiltrar tumores sólidos na reintrodução em um paciente. TILs podem ser distinguidos adicionalmente pela potência – por exemplo, TILs podem ser considerados potentes se, por

exemplo, a liberação de interferon (IFN) for maior do que cerca de 50 pg/mL, maior do que cerca de 100 pg/mL, maior do que cerca de 150 pg/mL, ou maior do que cerca de 200 pg/mL.

[00137] Por “TILs criopreservados” (ou MILs ou PBLs criopreservados) aqui é intencionado que os TILs, primários, volumosos ou expandidos (REP TILs), sejam tratados e armazenados na faixa de cerca de -150°C a -60°C. Os métodos gerais para a criopreservação também são aqui descritos em outro lugar, incluindo nos Exemplos. Para clareza, “TILs criopreservados” são distinguíveis de amostras de tecido congelado que podem ser usadas como uma fonte de TILs primários.

[00138] Por “TILs criopreservados descongelados” (ou MILs ou PBLs descongelados) aqui é intencionada uma população de TILs que foi anteriormente criopreservada e depois tratada para retornar para a temperatura ambiente ou mais altas, incluindo, mas não limitadas às temperaturas de cultura de célula ou temperaturas em que TILs podem ser administrados a um paciente.

[00139] Por “população de células” (incluindo TILs) aqui é intencionado várias células que compartilham traços comuns. No geral, as populações geralmente variam de 1×10^6 a 1×10^{10} em número, com diferentes populações de TIL compreendendo números diferentes. Por exemplo, o crescimento inicial de TILs primários na presença de IL-2 resulta em uma população de TILs volumosos de aproximadamente 1×10^8 células. A expansão de REP é geralmente feita para prover populações de $1,5 \times 10^9$ a $1,5 \times 10^{10}$ células para infusão.

[00140] No geral, TILs são inicialmente obtidas de uma amostra de tumor de paciente (“TILs primárias”) e depois expandidos em uma população maior para manipulação adicional como aqui descrito, opcionalmente criopreservados, reestimulados como aqui esboçado e opcionalmente avaliados quanto ao fenótipo e parâmetros metabólicos como uma indicação

da saúde do TIL.

[00141] No geral, a suspensão de célula colhida é chamada de uma “população de célula primária” ou uma população de célula “recém colhida”.

[00142] No geral, como aqui debatido, os TILs são inicialmente preparados pela obtenção de uma população primária de TILs de um tumor ressecado de um paciente como aqui debatido (a “população de célula primária” ou “primeira população de célula”). Isto é seguido com uma expansão volumosa inicial utilizando um cultivo das células com IL-2, formando uma segunda população de células (algumas vezes aqui aludida como a “população de TIL volumosa” ou “segunda população”).

[00143] O termo “linfócito citotóxico” inclui células T citotóxicas (CTL) (incluindo linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e linfócitos T auxiliares CD4⁺), células T matadoras naturais (NKT) e células matadora naturais (NK). Os linfócitos citotóxicos podem incluir, por exemplo, células T positivas em $\alpha\beta$ TCR ou células T positivas em $\gamma\delta$ TCR ativadas pelos antígenos associados com tumor e/ou transduzidos com receptores de antígeno quimérico específico de tumor ou receptores de célula T e linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

[00144] O termo “célula T de memória central” refere-se a um subconjunto de células T que nos seres humanos é CD45RO⁺ e constitutivamente expressa CCR7 (CCR7^{hi}) e CD62L (CD62^{hi}). O fenótipo superficial de células T de memória central também inclui TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Os fatores de transcrição para as células T de memória central incluem BCL-6, BCL-6B, MBD2 e BMII. As células T de memória central primariamente secretam IL-2 e CD40L como moléculas efetoras depois de deflagrar TCR. As células T de memória central são predominantes no compartimento CD4 no sangue e nos seres humanos são proporcionalmente enriquecidos nos linfônodos e amígdalas.

[00145] O termo “célula T de memória efetora” refere-se a um

subconjunto de células T humanas ou de mamífero que, como as células T de memória central, são CD45R0+, mas perderam a expressão constitutiva de CCR7 (CCR7lo) e são heterogêneos ou baixos quanto à expressão de CD62L (CD62Llo). O fenótipo superficial de células T de memória central também inclui TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Os fatores de transcrição para as células T de memória central incluem BLIMP1. As células T de memória efetoras rapidamente secretam altos níveis de citocinas inflamatórias a seguir da estimulação antigênica, incluindo interferon- γ , IL-4 e IL-5. As células T de memória efetoras são predominantes no compartimento CD8 no sangue e nos seres humanos são proporcionalmente enriquecidos no pulmão, fígado e intestino. As células T de memória efetoras CD8+ carregam quantidades grandes de perforina. O termo “sistema fechado” refere-se a um sistema que é fechado para o ambiente externo. Qualquer sistema fechado apropriado para os métodos de cultura de célula pode ser utilizado com os métodos da presente invenção. Os sistemas fechados incluem, por exemplo, mas não são limitados a recipientes G fechados. Uma vez que um segmento de tumor é adicionado ao sistema fechado, o sistema não é aberto para o ambiente externo até que os TILs estejam prontos para serem administrados ao paciente.

[00146] Em algumas modalidades, os métodos da presente divulgação incluem adicionalmente um estágio “pré-REP” em que o tecido de tumor ou células de tecido de tumor são cultivados em meios de laboratório padrão (incluindo sem limitação RPMI) e tratados com reagentes tais como células alimentadoras irradiadas e anticorpos anti-CD3 para se obter um efeito desejado, tal como aumento no número de TILs e/ou um enriquecimento da população para as células contendo os marcadores de superfície celular desejados ou outros traços estruturais, bioquímicos ou funcionais. O estágio pré-REP pode utilizar reagentes de grau de laboratório (sob a suposição de que os reagentes grau laboratório ficam diluídos durante um estágio de REP

posterior), tornando mais fácil incorporar estratégias alternativas para melhorar a produção de TIL. Portanto, em algumas modalidades, o agonista de TLR divulgado e/ou peptídeo ou peptidomiméticos podem ser incluídos no meio de cultura durante o estágio pré-REP. A cultura pré-REP pode em algumas modalidades, incluir IL-2. A presente invenção está direcionada em aspectos preferidos aos novos métodos de aumentar REP com um ou mais protocolos de reestimulação adicionais, também aqui aludidos como um “Protocolo de Expansão Rápida com reestimulação” ou “reREP”, que levam surpreendentemente aos subconjuntos de célula T de memória expandidos, incluindo o subconjunto de célula T de memória efetora, e/ou ao realce de marcadores na respiração glicolítica quando comparado com TILs recém colhidos ou TILs criopreservados descongelados para os TILs reestimulados (algumas vezes aqui aludidos como “reTILs”). Isto é, pelo uso de um procedimento reREP nos TILs criopreservados, os pacientes podem receber TILs altamente saudáveis metabolicamente ativos, levando a resultados mais favoráveis.

[00147] Quando “uma quantidade eficaz antitumor”, “uma quantidade eficaz inibidora de tumor”, ou “quantidade terapêutica” são indicadas, a quantidade precisa das composições da presente invenção a serem administradas pode ser determinada por um médico com consideração de diferenças individuais na idade, peso, tamanho do tumor, grau de infecção ou metástase e condição do paciente (sujeito). Pode geralmente ser estabelecido que uma composição farmacêutica compreendendo os linfócitos citotóxicos geneticamente modificados aqui descritos pode ser administrada em uma dosagem de 10^4 a 10^{11} células/kg de peso corporal (por exemplo, 10^5 a 10^6 , 10^5 a 10^{10} , 10^5 a 10^{11} , 10^6 a 10^{10} , 10^6 a 10^{11} , 10^7 a 10^{11} , 10^7 a 10^{10} , 10^8 a 10^{11} , 10^8 a 10^{10} , 10^9 a 10^{11} , ou 10^9 a 10^{10} células/kg de peso corporal), incluindo todos valores inteiros dentro destas faixas. As composições de linfócitos citotóxicos geneticamente modificados também podem ser administradas

múltiplas vezes nestas dosagens. Os linfócitos citotóxicos geneticamente modificados podem ser administrados usando-se técnicas de infusão que são habitualmente conhecidas na imunoterapia (ver, por exemplo, Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). O regime de dosagem e tratamento ideal para um paciente particular pode facilmente ser determinado por uma pessoa versada na técnica da medicina pelo monitoramento do paciente quanto aos sinais de doença e ajustando o tratamento consequentemente.

[00148] Para se evitar dúvidas, é pretendido aqui que traços particulares (por exemplo números inteiros, características, valores, usos, doenças, fórmulas, compostos ou grupos) descritos em conjunção com um aspecto particular, modalidade ou exemplo da invenção devem ser entendidos como aplicáveis a qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo aqui descritos a menos que incompatível com o mesmo. Assim tais traços podem ser usados onde apropriado em conjunção com qualquer uma das definições, reivindicações ou modalidades aqui definidas. Todos os traços divulgados neste relatório descritivo (incluindo quaisquer reivindicações, resumo e desenhos anexos), e/ou todas das etapas de qualquer método ou processo assim divulgado, podem ser combinados em qualquer combinação, exceto combinações onde pelo menos alguns dos traços e/ou etapas sejam mutualmente exclusivas. A invenção não é restringida a nenhum dos detalhes de quaisquer modalidades divulgadas. A invenção estende-se a qualquer coisa nova ou nova combinação, dos traços divulgados neste relatório descritivo (incluindo quaisquer reivindicações, resumo e desenhos anexos), ou a qualquer coisa nova, ou qualquer nova combinação, das etapas de qualquer método ou processo assim divulgados.

[00149] Os termos “cerca de” e “aproximadamente” significam dentro de uma faixa estatisticamente significativa de um valor. Uma tal faixa pode estar dentro de uma ordem de magnitude, preferivelmente dentro de 50%,

mais preferivelmente dentro de 20%, mais preferivelmente ainda dentro de 10% e ainda mais preferivelmente dentro de 5% de um dado valor ou faixa. A variação permissível abrangida pelos termos “cerca de” ou “aproximadamente” depende do sistema particular sob estudo e pode ser facilmente avaliado por uma pessoa versados comum na técnica. além disso, como aqui usado, os termos “cerca de” e “aproximadamente” significam que dimensões, tamanhos, formulações, parâmetros, formatos e outras quantidades e características não são e não precisam ser exatas, mas podem ser aproximadas e/ou maior ou menor, como desejado, refletindo tolerâncias, fatores de conversão, arredondamento, erro de medição e os similares e outros fatores conhecidos por aqueles versados na técnica. No geral, uma dimensão, tamanho, formulação, parâmetro, formato ou outra quantidade ou característica é “de cerca de” ou “aproximada” seja ou não expressamente estabelecido serem tais. É mencionado que as modalidades de tamanhos, formatos e dimensões muito diferentes podem ser utilizadas para os arranjos descritos.

[00150] Os termos transicionais “compreendendo,” “consistindo essencialmente em,” e “consistindo em,” quando usados nas reivindicações anexas, nas formas original e emendada, definem o escopo da reivindicação com respeito a quais elementos ou etapas de reivindicação adicionais não citadas, se alguma, são excluídas o escopo da(s) reivindicação(ões). O termo “compreendendo” é intencionado a ser inclusivo ou de extremidade aberta e não exclui nenhum elemento, método, etapa ou material adicional, não citado. O termo “consistindo em” exclui qualquer elemento, etapa ou material outro que não aqueles especificados na reivindicação e, no último caso, impurezas ordinárias associadas com o(s) material(is) especificado(s). O termo “consistindo essencialmente em” limita o escopo de uma reivindicação aos elementos, etapas ou material(is) especificados e àqueles que não afetem materialmente a(s) característica(s) básica(s) e nova(s) da invenção

reivindicada. Todas as composições, métodos e kits aqui descritos que incorpora a presente invenção pode, em modalidades alternativas, ser mais especificamente definidos por qualquer um dos termos transicionais “compreendendo,” “consistindo essencialmente em,” e “consistindo em”.

Modalidades de Métodos de Expandir Células T Terapêuticas Incluindo Sangue Periférico (PBLs) e/ou Medula Óssea (MILs)

Métodos de Expandir Linfócitos de Sangue Periférico (PBLs) a partir de Sangue Periférico

[00151] Método PBL 1. Em uma modalidade da invenção, PBLs são expandidos usando os processos aqui descritos. Em uma modalidade da invenção, o método compreende obter uma amostra de PBMC de sangue integral. Em uma modalidade, o método compreende enriquecer células T pela isolamento de células T puras de PBMCs usando seleção negativa de uma fração não CD19+. No Dia 0, as células T puras são cultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células) e IL-2 a 3000 IU/ml. No Dia 4, mais IL-2 é adicionada à cultura a 3000 IU/ml. No Dia 7, a cultura é mais uma vez estimulada com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células), e mais IL-2 a 3000 IU/ml é adicionada à cultura. PBLs são colhidos no Dia 14, grânulos são removidos, e PBLs são contados e fenotipados. Em uma modalidade, o método compreende enriquecer células T pela isolamento de células T puras de PBMCs usando seleção negativa com base em grânulo magnético de uma fração não CD19+.

[00152] Em uma modalidade da invenção, o Método PBL 1 é realizado como segue: No Dia 0, uma amostra de PBMC criopreservada é descongelada e as PBMCs são contadas. As células T são isoladas usando um Kit de isolamento de Célula T Total Humana e colunas LS (Miltenyi Biotec). As células T isoladas são contadas e semeadas a 5×10^5 células por poço de uma placa GRex de 24 poços e são cocultivadas com DynaBeads® (anti-CD3/anti-

CD28) em uma razão 1:1 com IL-2 a 3000 IU/ml em um total de 8 ml de meios CM2 por poço. No Dia 4, os meios em cada poço são trocados de CM2 para AIM-V com IL-2 fresca a 3000 IU/ml. No Dia 7, as células expandidas são colhidas, contadas, depois cultivadas a 15×10^6 células por frasco em frascos GRex IOM com IL-2 a 3000 IU/ml e DynaBeads® em uma razão 1:1 (grânulos:células) em um total de 100 ml de meios AIM-V. No Dia 11, os meios são trocados por meios CM-4 suplementados com IL-2 fresca a 3000 IU/ml. No Dia 14, os DynaBeads® são removidos usando um DynaMag Magnet (DynaMag®-15) e as células são contadas.

[00153] Em uma modalidade da invenção, o Método PBL 1 é realizado como segue: No Dia 0, uma amostra de PBMC criopreservada é descongelada e as PBMCs são contadas. As células T são isoladas usando um Kit de isolamento de Célula T Total Humana e colunas LS (Miltenyi Biotec). As células T isoladas são contadas e semeadas a 5×10^5 células por poço de uma placa GRex de 24 poços e são cocultivadas com DynaBeads® (anti-CD3/anti-CD28) em uma razão 1:1 com IL-2 a 3000 IU/ml em um total de 8 ml de meios CM2 por poço. No Dia 4, os meios em cada poço são trocados de CM2 para AIM-V com IL-2 fresca a 3000 IU/ml. No Dia 7, os PBLs são colhidos, contados, depois ressemeados a 1×10^6 células por poço de uma nova placa GRex de 24 poços com IL-2 a 3000 IU/ml e DynaBeads® em uma razão 1:1 (grânulos:células) em um total de 8 ml de meios AIM-V. No Dia 11, os meios são trocados por meios CM-4 suplementados com IL-2 fresca a 3000 IU/ml. No Dia 14, os DynaBeads® são removidos usando um DynaMag Magnet (DynaMag®-15) e as células são contadas.

[00154] Método PBL 2. Em uma modalidade da invenção, os PBLs são expandidos usando o Método PBL 2, que compreende obter uma amostra de PBMC de sangue integral. As células T das PBMCs são enriquecidas pela incubação de PBMCs por pelo menos três horas a 37°C e depois isolar as células não aderentes. As células não aderentes são as similarmente

expandidas como Método PBL 1, isto é, no Dia 0, as células não aderentes são cultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos: células) e IL-2 a 3000 IU/ml. No Dia 4, mais IL-2 é adicionada à cultura a 3000 IU/ml. No Dia 7, a cultura é mais uma vez estimulada com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células), e mais IL-2 a 3000 IU/ml é adicionada à cultura. Os PBLs são colhidos no Dia 14, grânulos são removidos, e PBLs são contados e fenotipados.

[00155] Em uma modalidade da invenção, o Método PBL 2 é realizado como segue: No Dia 0, a amostra de PMBC criopreservada é descongelada e as células PBMC são semeadas a 6 milhões de células por poço em uma placa de 6 poços em meios CM-2 e incubadas por 3 horas a 37 graus Celsius. Depois de 3 horas, as células não aderentes, que são os PBLs, são removidas e contadas. Os PBLs são cultivados com DynaBeads® anti-CD3/anti-CD28 em uma razão 1:1 de grânulos:células, a 1×10^6 células por poço e IL-2 a 3000 IU/ml em um total de 7 ml de meios CM-2 em cada poço de uma placa GRex de 24 poços. No Dia 4, os meios em cada poço são trocados com meios AIM-V e IL-2 fresca a 3000 IU/ml. No Dia 7, as células expandidas são colhidas, contadas, depois cultivadas a 15×10^6 células por frasco em frascos GRex IOM com IL-2 a 3000 IU/ml e DynaBeads® em uma razão 1:1 (células T:grânulos) em um total de 100 ml de meios AIM-V. No Dia 11, os meios são carregados por meios CM-4 e suplementados com IL-2 fresca (3000 IU/ml). No Dia 14, os DynaBeads são removidos usando um DynaMag® Magnet (DynaMag®-15) e as células são contadas.

[00156] Em uma modalidade da invenção, o Método PBL 2 é realizado como segue: No Dia 0, a amostra de PMBC criopreservada é descongelada e as células PBMC são semeadas a 6 milhões de células por poço em uma placa de 6 poços em meios CM-2 e incubadas por 3 horas a 37 graus Celsius. Depois de 3 horas, as células não aderentes, que são os PBLs, são removidas e

contadas. Os PBLs são cultivados com DynaBeads[®] anti-CD3/anti-CD28 em uma razão 1:1 de grânulos:células, a 1×10^6 células por poço e IL-2 a 3000 IU/ml em um total de 7 ml de meios CM-2 em cada poço de uma placa GRex de 24 poços. No Dia 4, os meios em cada poço são trocados com meios AIM-V e IL-2 fresca a 3000 IU/ml. No Dia 7, as células expandidas são colhidas, contadas, depois cultivadas a 1×10^6 células por poço em uma nova placa GRex de 24 poços com IL-2 a 3000 IU/ml e DynaBeads[®] em uma razão 1:1 (células T:grânulos) em um total de 8 ml de meios AIM-V. No Dia 11, os meios são carregados por meios CM-4 e suplementados com IL-2 fresca (3000 IU/ml). No Dia 14, os DynaBeads são removidos usando um DynaMag[®] Magnet (DynaMag[®]-15) e as células são contadas.

[00157] Método PBL 3. Em uma modalidade da invenção, os PBLs são expandidos usando o Método PBL 3, que compreende obter uma amostra de PBMC a partir de sangue periférico. As células B são isoladas usando uma seleção CD19+ e células T são selecionadas usando seleção negativa da fração não CD19+ da amostra PBMC. No Dia 0, as células T e células B são cocultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads[®]) em uma razão 1:1 (grânulos:células) e IL-2 a 3000 IU/ml. No Dia 4, mais IL-2 é adicionada à cultura a 3000 IU/ml. No Dia 7, a cultura é mais uma vez estimulada com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads[®]) em uma razão 1:1 (grânulos:células), e mais IL-2 a 3000 IU/ml é adicionada à cultura. PBLs são colhidos no Dia 14, grânulos são removidos, e PBLs são contados e fenotipados.

[00158] Em uma modalidade da invenção, o Método PBL 3 é realizado como segue: No Dia 0, as PBMC criopreservadas derivadas do sangue periférico são descongeladas e contadas. Células B CD19+ são classificadas usando um CD19 Multisort Kit, Human (Miltenyi Biotec). A fração de célula não CD19+, as células T são purificadas usando o Kit de Isolação de Célula T Total Humana e Colunas LS (Miltenyi Biotec). As células T (PBLs) e células B são cocultivadas em razões diferentes em uma placa GRex de 24 poços em

cerca de 8 ml de meios CM2 na presença de IL-2 a cerca de 3000IU/ml. As razões da célula B:célula T são 0,1:1; 1:1, e 10:1. a cocultura de célula T/célula B é estimulada com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células). No Dia 4, os meios são trocados de CM2 para meios AIM-V e mais IL-2 é adicionada à cultura a 3000 IU/ml. No Dia 7, as células são colhidas e contadas e ressemeadas em uma nova placa GRex de 24 poços em meios AIM-V em uma faixa de célula de cerca de $1,5 \times 10^5$ a cerca de 4×10^5 células por poço e estimuladas com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células), com mais IL-2 a 3000 IU/ml. No Dia 14, os DynaBeads são removidos usando um DynaMag® Magnet (DynaMag®-15) e as células são contadas.

[00159] Em uma modalidade, as PBMCs são isoladas de uma amostra de sangue integral. Em uma modalidade, a amostra de PBMC é usada como o material de partida para expandir os PBLs. Em uma modalidade, a amostra é criopreservada antes do processo de expansão. Em uma outra modalidade, uma amostra fresca é usada como o material de partida para expandir os PBLs. Em uma modalidade da invenção, as células T são isoladas de PBMCs usando métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, as células T são isoladas usando um Kit de Isolação de Célula T Total Humana e colunas LS. Em uma modalidade da invenção, células T são isoladas de PBMCs usando métodos de seleção de anticorpo conhecidos na técnica, por exemplo, seleção negativa de CD19.

[00160] Em uma modalidade da invenção, o processo é realizado em cerca de 7 dias, cerca de 8 dias, cerca de 9 dias, cerca de 10 dias, cerca de 11 dias, cerca de 12 dias, cerca de 13 dias, ou cerca de 14 dias. Em uma outra modalidade, o processo é realizado em cerca de 7 dias. Em uma outra modalidade, o processo é realizado em cerca de 14 dias.

[00161] Em uma modalidade da invenção, as PBMCs são cultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28. Em uma modalidade, qualquer produto

antiCD3/antiCD28 disponível é útil na presente invenção. Em uma modalidade da invenção, o produto usado comercialmente disponível é DynaBeads®. Em uma modalidade, os DynaBeads® são cultivados com as PBMCs em uma razão de 1:1 (grânulos:células). Em uma outra modalidade, os anticorpos são DynaBeads® cultivados com as PBMCs em uma razão de 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, ou 5:1 (grânulos:células). Em uma modalidade da invenção, as etapas de cultivar anticorpo e/ou a etapa de reestimar células com anticorpo são realizadas em um período de cerca de 2 a cerca de 6 dias, de cerca de 3 a cerca de 5 dias, ou durante cerca de 4 dias. Em uma modalidade da invenção, a etapa de cultivar anticorpo é realizada em um período de cerca de 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, ou 6 dias.

[00162] Em uma modalidade, a amostra de PBMC é cultivada com IL-2. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura de células usado para expansão dos PBLs de PBMCs compreende IL-2 em uma concentração selecionada do grupo consistindo em cerca de 100 IU/mL, cerca de 200 IU/mL, cerca de 300 IU/mL, cerca de 400 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 500 IU/mL, cerca de 600 IU/mL, cerca de 700 IU/mL, cerca de 800 IU/mL, cerca de 900 IU/mL, cerca de 1.000 IU/mL, cerca de 1,100 IU/mL, cerca de 1.200 IU/mL, cerca de 1.300 IU/mL, cerca de 1.400 IU/mL, cerca de 1.500 IU/mL, cerca de 1.600 IU/mL, cerca de 1.700 IU/mL, cerca de 1.800 IU/mL, cerca de 1.900 IU/mL, cerca de 2.000 IU/mL, cerca de 2.100 IU/mL, cerca de 2.200 IU/mL, cerca de 2.300 IU/mL, cerca de 2.400 IU/mL, cerca de 2.500 IU/mL, cerca de 2.600 IU/mL, cerca de 2.700 IU/mL, cerca de 2.800 IU/mL, cerca de 2.900 IU/mL, cerca de 3.000 IU/mL, cerca de 3.100 IU/mL, cerca de 3.200 IU/mL, cerca de 3.300 IU/mL, cerca de 3.400 IU/mL, cerca de 3.500 IU/mL, cerca de 3.600 IU/mL, cerca de 3.700 IU/mL, cerca de 3.800 IU/mL, cerca de 3.900 IU/mL, cerca de 4.000 IU/mL, cerca de 4.100 IU/mL, cerca de 4.200 IU/mL, cerca de 4.300 IU/mL, cerca de 4.400 IU/mL,

cerca de 4.500 IU/mL, cerca de 4.600 IU/mL, cerca de 4.700 IU/mL, cerca de 4.800 IU/mL, cerca de 4.900 IU/mL, cerca de 5.000 IU/mL, cerca de 5.100 IU/mL, cerca de 5.200 IU/mL, cerca de 5.300 IU/mL, cerca de 5.400 IU/mL, cerca de 5.500 IU/mL, cerca de 5.600 IU/mL, cerca de 5.700 IU/mL, cerca de 5.800 IU/mL, cerca de 5.900 IU/mL, cerca de 6.000 IU/mL, cerca de 6.500 IU/mL, cerca de 7.000 IU/mL, cerca de 7.500 IU/mL, cerca de 8.000 IU/mL, cerca de 8.500 IU/mL, cerca de 9.000 IU/mL, cerca de 9.500 IU/mL, e cerca de 10.000 IU/mL.

[00163] Em uma modalidade da invenção, o número de célula de partida de PBMCs para o processo de expansão é de cerca de 25.000 a cerca de 1.000.000, de cerca de 30.000 a cerca de 900.000, de cerca de 35.000 a cerca de 850.000, de cerca de 40.000 a cerca de 800.000, de cerca de 45.000 a cerca de 800.000, de cerca de 50.000 a cerca de 750.000, de cerca de 55.000 a cerca de 700.000, de cerca de 60.000 a cerca de 650.000, de cerca de 65.000 a cerca de 600.000, de cerca de 70.000 a cerca de 550.000, preferivelmente de cerca de 75.000 a cerca de 500.000, de cerca de 80.000 a cerca de 450.000, de cerca de 85.000 a cerca de 400.000, de cerca de 90.000 a cerca de 350.000, de cerca de 95.000 a cerca de 300.000, de cerca de 100.000 a cerca de 250.000, de cerca de 105.000 a cerca de 200.000, ou de cerca de 110.000 a cerca de 150.000. Em uma modalidade da invenção, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 138.000, 140.000, 145.000, ou mais. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 28.000. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 62.000. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 338.000. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 336.000.

[00164] Em uma modalidade da invenção, as células são desenvolvidas em uma placa GRex de 24 poços. Em uma modalidade da invenção, uma placa de poço comparável é usada. Em uma modalidade, o material de partida

para a expansão é de cerca de 5×10^5 células T por poço. Em uma modalidade da invenção, há 1×10^6 células por poço. Em uma modalidade da invenção, o número de células por poço é suficiente para semear o poço e expandir as células T.

[00165] Em uma modalidade da invenção, a expansão multiplicativa de PBLs é de cerca de 20% a cerca de 100%, 25% a cerca de 95%, 30% a cerca de 90%, 35% a cerca de 85%, 40% a cerca de 80%, 45% a cerca de 75%, 50% a cerca de 100%, ou 25% a cerca de 75%. Em uma modalidade da invenção, a expansão multiplicativa é de cerca de 25%. Em uma outra modalidade da invenção, a expansão multiplicativa é de cerca de 50%. Em uma outra modalidade, a expansão multiplicativa é de cerca de 75%.

[00166] Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 pode ser adicionada à cultura em um ou mais dias por todo o processo. Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 é adicionada no Dia 4. Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 é adicionada no Dia 7. Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 é adicionada no Dia 11. Em uma outra modalidade, mais IL-2 é adicionada no Dia 4, Dia 7, e/ou Dia 11. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura de células pode ser mudado em um ou mais dias através do processo de cultura de célula. Em uma modalidade, o meio de cultura de células é mudado no Dia 4, Dia 7, e/ou Dia 11 do processo. Em uma modalidade da invenção, os PBLs são cultivados com mais IL-2 durante um período de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, ou 14 dias. Em uma modalidade da invenção, PBLs são cultivados durante um período de 3 dias depois de cada adição de IL-2.

[00167] Em uma modalidade, o meio de cultura de células é trocado pelo menos uma vez durante o método. Em uma modalidade, o meio de cultura de células é trocado ao mesmo tempo que mais IL-2 é adicionada. Em uma outra modalidade o meio de cultura de células é trocado em pelo menos

um de Dia 1, Dia 2, Dia 3, Dia 4, Dia 5, Dia 6, Dia 7, Dia 8, Dia 9, Dia 10, Dia 11, Dia 12, Dia 13, ou Dia 14. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura de células usado por todo o método pode ser o mesmo ou diferente. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura de células é CM-2, CM-4, ou AIM-V.

[00168] Em uma modalidade da invenção, as células T podem ser reestimuladas com anticorpos antiCD3/antiCD28 em um ou mais dias por todo o processo de expansão de 14 dias. Em uma modalidade, as células T são reestimuladas no Dia 7. Em uma modalidade, frascos GRex 10M são usados para a etapa de reestimulação. Em uma modalidade da invenção, frascos comparáveis são usados.

[00169] Em uma modalidade da invenção, os DynaBeads® são removidos usando um DynaMag® Magnet, as células são contadas, e as células são analisadas usando análise fenotípica e funcional como descrito ainda nos Exemplos abaixo. Em uma modalidade da invenção, os anticorpos são separados dos PBLs ou MILs usando métodos conhecidos na técnica. Em qualquer uma das modalidades precedentes, seleção com base em grânulos magnéticos de TILs, PBLs, ou MILs é usada.

[00170] Em uma modalidade da invenção, a amostra de PBMC é incubada durante um período de tempo em uma temperatura desejada eficaz para identificar as células não aderentes. Em uma modalidade da invenção, o tempo de incubação é de cerca de 3 horas. Em uma modalidade da invenção, a temperatura é de cerca de 37° Celsius. As células não aderentes são depois expandidas usando o processo descrito acima.

[00171] Em uma modalidade da invenção, as PBMCs são obtidas de um paciente que foi tratado com ibrutinib ou um outro inibidor ITK ou cinase, tais inibidores ITK e cinase como aqui descrito em outro lugar. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é um inibidor de ITK covalente que se liga covalentemente e irreversivelmente ao ITK. Em uma modalidade

da invenção, o inibidor de ITK é um inibidor de ITK alostérico que se liga ao ITK. Em uma modalidade da invenção, as PBMCs são obtidas de um paciente que foi tratado com ibrutinib ou outro inibidor de ITK, incluindo inibidores de ITK como aqui descrito em outro lugar, antes da obtenção de uma amostra de PBMC para o uso com qualquer um dos métodos precedentes, incluindo Método PBL 1, Método PBL 2, ou Método PBL 3. Em uma modalidade da invenção, o tratamento com o inibidor de ITK foi administrado pelo menos 1 vez, pelo menos 2, vezes, ou pelo menos 3 vezes ou mais. Em uma modalidade da invenção, os PBLs que são expandidos a partir dos pacientes pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK compreende menos células LAG3+, PD-1+ do que aqueles expandidos a partir dos pacientes não pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK. Em uma modalidade da invenção, os PBLs que são expandidos a partir dos pacientes pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK compreendem níveis aumentados de produção de INF γ do que aqueles expandidos a partir dos pacientes não pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK. Em uma modalidade da invenção, os PBLs que são expandidos a partir dos pacientes pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK compreendem atividade lítica aumentada em razões mais baixas de Célula Efetora:Alvo do que aquelas expandidas a partir dos pacientes não pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK. Em uma modalidade da invenção, os pacientes pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK têm expansão multiplicativa mais alta quando comparados com pacientes não tratados.

[00172] Em uma modalidade da invenção, o método inclui uma etapa de adicionar um inibidor de ITK à cultura de células. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é adicionado em um ou mais de Dia 0, Dia 1, Dia 2, Dia 3, Dia 4, Dia 5, Dia 6, Dia 7, Dia 8, Dia 9, Dia 10, Dia 11, Dia 12, Dia 13, ou Dia 14 do processo. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é adicionado nos dias durante o método quando o meio de cultura de células é trocado. Em uma

modalidade, o inibidor de ITK é adicionado no Dia 0 e quando o meio de cultura de células é trocado. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é adicionado durante o método quando IL-2 é adicionada. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é adicionado no Dia 0, Dia 4, Dia 7, e opcionalmente Dia 11 do método. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é adicionado no Dia 0 e no Dia 7 do método. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é um conhecido na técnica. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é um aqui descrito em outro lugar.

[00173] Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é usado no método em uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 5 uM. Em uma modalidade, o inibidor de ITK é usado no método em uma concentração de cerca de 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM, 400 nM, 450 nM, 500 nM, 550 nM, 600 nM, 650 nM, 700 nM, 750 nM, 800 nM, 850 nM, 900 nM, 950 nM, 1 uM, 2 nM, 3 uM, 4 uM, ou 5 uM.

[00174] Em uma modalidade da invenção, o método inclui uma etapa de adicionar um inibidor de ITK quando as PBMCs são derivadas de um paciente que não teve nenhuma exposição anterior a um tratamento com o inibidor de ITK, tal como ibrutinib.

[00175] Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi opcionalmente pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK. Em algumas modalidades, a amostra de tumor é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK. Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK, passou por tratamento por pelo menos 1 mês, pelo menos 2 meses, pelo menos 3 meses, pelo menos 4 meses, pelo menos 5

meses, pelo menos 6 meses, ou 1 ano ou mais. Em uma outra modalidade, as PBMCs são derivadas de um paciente que está correntemente em um regime de inibidor de ITK, tal como ibrutinib.

[00176] Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK e é refratário ao tratamento com um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK, tal como ibrutinib.

[00177] Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK mas não está mais passando por tratamento com um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK. Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK mas não está mais passando por tratamento com um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK e não passou por tratamento durante pelo menos 1 mês, pelo menos 2 meses, pelo menos 3 meses, pelo menos 4 meses, pelo menos 5 meses, pelo menos 6 meses, ou pelo menos 1 ano ou mais. Em uma outra modalidade, as PBMCs são derivadas do um paciente que teve exposição anterior a um inibidor de ITK, mas não foi tratado nem pelo menos 3 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, ou pelo menos 1 ano.

[00178] Em uma modalidade da invenção, no Dia 0, as células são selecionadas quanto a CD19+ e consequentemente separadas. Em uma modalidade da invenção, a seleção é feita usando grânulos de ligação de anticorpo. Em uma modalidade da invenção, as células T puras são isoladas das PBMCs no Dia 0. Em uma modalidade da invenção, no Dia 0, as células B CD19+ e as células T puras são cocultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28 por um mínimo de 4 dias. Em uma modalidade da invenção, no Dia 4, IL-2 é adicionada à cultura. Em uma modalidade da invenção, no Dia 7, a cultura é reestimulada com anticorpos

antiCD3/antiCD28 e mais IL-2. Em uma modalidade da invenção, no Dia 14, os PBLs são colhidos.

[00179] Em uma modalidade da invenção, para os pacientes que não são pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK, 10 a 15 ml de Camada Leucoplaquetária produzirão cerca de 5×10^9 PBMC, que, por sua vez, produzirão cerca de $5,5 \times 10^7$ de material de célula de partida, e cerca de 11×10^9 PBLs no final do processo de expansão. Em uma modalidade da invenção, cerca de 54×10^6 PBMCs produzirão cerca de 6×10^5 de material de partida, e cerca de $1,2 \times 10^8$ MIL (cerca de uma expansão de 205 vezes).

[00180] Em uma modalidade da invenção, para os pacientes que são pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK, o processo de expansão produzirá cerca de 20×10^9 PBLs. Em uma modalidade da invenção, $40,3 \times 10^6$ PBMCs produzirão cerca de $4,7 \times 10^5$ de material de célula de partida, e cerca de $1,6 \times 10^8$ PBLs (uma expansão de cerca de 338 vezes).

[00181] Em uma modalidade da invenção, a dose clínica de PBLs útil na presente invenção para os pacientes com leucemia linfocítica crônica (CLL) é de cerca de $0,1 \times 10^9$ a cerca de 15×10^9 PBLs, de cerca de $0,1 \times 10^9$ a cerca de 15×10^9 PBLs, de cerca de $0,12 \times 10^9$ a cerca de 12×10^9 PBLs, de cerca de $0,15 \times 10^9$ a cerca de 11×10^9 PBLs, de cerca de $0,2 \times 10^9$ a cerca de 10×10^9 PBLs, de cerca de $0,3 \times 10^9$ a cerca de 9×10^9 PBLs, de cerca de $0,4 \times 10^9$ a cerca de 8×10^9 PBLs, de cerca de $0,5 \times 10^9$ a cerca de 7×10^9 PBLs, de cerca de $0,6 \times 10^9$ a cerca de 6×10^9 PBLs, de cerca de $0,7 \times 10^9$ a cerca de 5×10^9 PBLs, de cerca de $0,8 \times 10^9$ a cerca de 4×10^9 PBLs, de cerca de $0,9 \times 10^9$ a cerca de 3×10^9 PBLs, ou de cerca de 1×10^9 a cerca de 2×10^9 PBLs.

[00182] Em qualquer uma das modalidades precedentes, as PBMCs podem ser derivadas de uma amostra de sangue integral, pela aferese, da camada leucoplaquetária, ou de qualquer outro método conhecido na técnica para obter PBMCs.

Métodos de Expandir Linfócitos Infiltrantes de Medula Óssea (MILs) a partir

de PBMCs Derivadas da Medula Óssea

[00183] Método MIL 1. Em uma modalidade da invenção, um método para expandir MILs de PBMCs derivados da medula óssea é descrito. Em uma modalidade da invenção, o método é realizado em 14 dias. Em uma modalidade, o método compreende obter PBMCs da medula óssea e criopreservar as PBMCs. No Dia 0, as PBMCs são cultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células) e IL-2 a 3000 IU/ml. No Dia 4, mais IL-2 é adicionada à cultura a 3000 IU/ml. No Dia 7, a cultura é mais uma vez estimulada com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células), e mais IL-2 a 3000 IU/ml é adicionada à cultura. Os MILs são colhidos no Dia 14, grânulos são removidos, e MILs são opcionalmente contados e fenotipados.

[00184] Em uma modalidade da invenção, o Método MIL 1 é realizado como segue: No Dia 0, uma amostra de PBMC derivada da medula óssea criopreservada é descongelada e as PBMCs são contadas. As PBMCs são cocultivadas em uma placa GRex de 24 poços a 5×10^5 células por poço com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 em cerca de 8 ml por poço de meio de cultura de células CM-2 (compreendendo de RPMI-1640, soro AB humano, l-glutamina, 2-mercaptoetanol, sulfato de gentamicina, meios AIM-V) na presença de IL-2 a 3000IU/ml. No Dia 4, os meios de cultura de células são trocados com AIM-V suplementado com mais IL-2 a 3000IU/ml. No Dia 7, os MILs expandidos são contados. 1×10^6 células por poço são transferidas para uma nova placa GRex de 24 poços e cultivadas com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 em cerca de 8 ml por poço de meios AIM-V na presença de IL-2 a 3000IU/ml. No Dia 11, os meios de cultura de células são trocados de AIM-V para CM-4 (compreendendo de meios AIM-V, 2 mM de Glutamax, e 3000IU/ml de IL2). No Dia 14, os DynaBeads® são removidos usando um DynaMag Magnet (DynaMag®15) e os MILs são contados.

[00185] Método MIL 2. Em uma modalidade da invenção, o método é realizado em 7 dias. Em uma modalidade, o método compreende obter PMBCs derivadas da medula óssea e criopreservar as PBMCs. No Dia 0, as PBMCs são cultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 3:1 (grânulos:células) e IL-2 a 3000 IU/ml. Os MILs são colhidos no Dia 7, os grânulos são removidos, e os MILs são opcionalmente contados e fenotipados.

[00186] Em uma modalidade da invenção, o Método MIL 2 é realizado como segue: No Dia 0, uma amostra de PBMC criopreservada é descongelada e as PBMCs são contadas. As PBMCs são cocultivadas em uma placa GRex de 24 poços a 5×10^5 células por poço com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 em cerca de 8 ml por poço de meio de cultura de células CM-2 (compreendendo de RPMI-1640, soro AB humano, 1-glutamina, 2-mercaptoetanol, sulfato de gentamicina, meios AIM-V) na presença de IL-2 a 3000 IU/ml. No Dia 7, os DynaBeads® são removidos usando um DynaMag Magnet (DynaMag®15) e os MILs são contados.

[00187] Método MIL 3. Em uma modalidade da invenção, o método compreende obter PBMCs a partir da medula óssea. No Dia 0, as PBMCs são selecionadas quanto a CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ e classificadas, e a fração de célula não CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ é sonicada e uma porção da fração de célula sonicada é adicionada de volta para a fração de célula selecionada. IL-2 é adicionada à cultura de células a 3000 IU/ml. No Dia 3, as PBMCs são cultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células) e IL-2 a 3000 IU/ml. No Dia 4, mais IL-2 é adicionada à cultura a 3000 IU/ml. No Dia 7, a cultura é mais uma vez estimulada com anticorpos antiCD3/antiCD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 (grânulos:células), e mais IL-2 a 3000 IU/ml é adicionada à cultura. No Dia 11, IL-2 é adicionada à cultura a 3000 IU/ml. Os MILs são colhidos no Dia 14, os grânulos são removidos, e os MILs são opcionalmente contados e

fenotipados.

[00188] Em uma modalidade da invenção, o Método MIL 3 é realizado como segue: No Dia 0, uma amostra criopreservada de PBMCs é descongelada e as PBMCs são contadas. As células são tingidas com anticorpos CD3, CD33, CD20, e CD14 e classificadas usando uma célula S3e classificada (Bio-Rad). As células são classificadas em duas frações – uma fração de célula imune (ou a fração de MIL) (CD3+CD33+CD20+CD14+) e uma fração de célula blástica de AML (não CD3+CD33+CD20+CD14+). Várias células da fração de célula blástica de AML isto é aproximadamente igual ao número de células da fração de célula imune (ou fração de MIL) a serem semeadas sobre uma placa GRex de 24 poços são colocadas em suspensão em 100 µl de meios e sonicada. Neste exemplo, cerca de $2,8 \times 10^4$ a cerca de $3,38 \times 10^5$ células da fração de célula blástica de AML são recolhidas e colocadas em suspensão em 100 µl de meios CM2 e depois sonicadas por 30 segundos. Os 100 µl de fração de célula blástica de AML sonicada são adicionados à fração de célula imune em uma placa GRex de 24 poços. As células imunes estão presentes em uma quantidade de cerca de $2,8 \times 10^4$ a cerca de $3,38 \times 10^5$ células por poço em cerca de 8 ml por poço de meio de cultura de células CM-2 na presença de IL-2 a 6000 IU/ml e são cultivadas com a porção de fração de célula blástica de AML durante cerca de 3 dias. No Dia 3, anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 são adicionados a cada poço e cultivados durante cerca de 1 dia. No Dia 4, os meios de cultura de células são trocados com AIM-V suplementados com mais IL-2 a 3000IU/ml. No Dia 7, os MILs expandidos são contados. Cerca de $1,5 \times 10^5$ a 4×10^5 células por poço são transferidas para uma nova placa GRex de 24 poços e cultivadas com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (DynaBeads®) em uma razão 1:1 em cerca de 8 ml por poço de meio AIM-V na presença de IL-2 a 3000IU/ml. No Dia 11, os meios de cultura de células são trocados de AIM-V para CM-4 (suplementados com IL-2 a 3000IU/ml).

No Dia 14, os DynaBeads[®] são removidos usando um DynaMag Magnet (DynaMag[®]15) e os MILs são opcionalmente contadas.

[00189] Em uma modalidade da invenção, as PBMCs são obtidas a partir da medula óssea. Em uma modalidade, as PBMCs são obtidas da medula óssea através da aferese, aspiração, biópsia de agulha, ou outros meios similares conhecidos na técnica. Em uma modalidade, as PBMCs são frescas. Em uma outra modalidade, as PBMCs são criopreservada.

[00190] Em uma modalidade da invenção, o método é realizado em cerca de 7 dias, cerca de 8 dias, cerca de 9 dias, cerca de 10 dias, cerca de 11 dias, cerca de 12 dias, cerca de 13 dias, ou cerca de 14 dias. Em uma outra modalidade, o método é realizado em cerca de 7 dias. Em uma outra modalidade, o método é realizado em cerca de 14 dias.

[00191] Em uma modalidade da invenção, as PBMCs são cultivadas com anticorpos antiCD3/antiCD28. Em uma modalidade, qualquer produto antiCD3/antiCD28 disponível é útil na presente invenção. Em uma modalidade da invenção, o produto usado comercialmente disponível é DynaBeads[®]. Em uma modalidade, os DynaBeads[®] são cultivados com as PBMCs em uma razão de 1:1 (grânulos:células). Em uma outra modalidade, os anticorpos são DynaBeads[®] cultivados com as PBMCs em uma razão de 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, ou 5:1 (grânulos:células). Em qualquer uma das modalidades precedentes, a seleção com base em grânulos magnéticos de uma fração de célula imune (ou fração de MIL) (CD3+CD33+CD20+CD14+) ou uma fração de célula blástica de AML (não CD3+CD33+CD20+CD14+) são usadas. Em uma modalidade da invenção, as etapas de cultivar anticorpo e/ou a etapa de reestimar células com anticorpo são realizadas em um período de cerca de 2 a cerca de 6 dias, de cerca de 3 a cerca de 5 dias, ou durante cerca de 4 dias. Em uma modalidade da invenção, a etapa de cultivar anticorpo é realizada em um período de cerca de 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, ou 6 dias.

[00192] Em uma modalidade da invenção, a razão do número de células da fração de célula blástica de AML para o número de células da fração de célula imune (ou fração de MIL) é de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1. Em uma outra modalidade, a razão é de cerca de 0,1:1 a cerca de 5:1, cerca de 0,1:1 a cerca de 2:1, ou cerca de 1:1. Em uma modalidade da invenção, a fração de célula blástica de AML é opcionalmente rompida para romper a agregação de célula. Em uma modalidade, a fração de célula blástica de AML é rompida usando sonicação, homogeneização, célula lise, turbilhonamento ou vibração. Em uma outra modalidade, a fração de célula blástica de AML é rompida usando sonicação. Em uma modalidade da invenção, a fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+, não CD14+ (fração blástica AML) é lisada usando um método de lise adequado, incluindo lise de alta temperatura, lise de química (tal como álcoois orgânicos), lise de enzima, e outros métodos de lise de célula conhecidos na técnica.

[00193] Em uma modalidade da invenção, as células da fração de célula blástica de AML são colocadas em suspensão em uma concentração de cerca de $0,2 \times 10^5$ a cerca de 2×10^5 células por 100 uL e adicionadas à cultura de células com a fração de célula imune. Em uma outra modalidade, a concentração é de cerca de $0,5 \times 10^5$ a cerca de 2×10^5 células por 100 uL, de cerca de $0,7 \times 10^5$ a cerca de 2×10^5 células por 100 uL, de cerca de 1×10^5 a cerca de 2×10^5 células por 100 uL, ou de cerca de $1,5 \times 10^5$ a cerca de 2×10^5 células por 100 uL.

[00194] Em uma modalidade, a amostra de PBMC é cultivada com IL-2. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura de células usado para expansão dos MILs compreende IL-2 em uma concentração selecionada do grupo consistindo em cerca de 100 IU/mL, cerca de 200 IU/mL, cerca de 300 IU/mL, cerca de 400 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 500 IU/mL, cerca de 600 IU/mL, cerca de 700 IU/mL, cerca de 800 IU/mL, cerca

de 900 IU/mL, cerca de 1.000 IU/mL, cerca de 1.100 IU/mL, cerca de 1.200 IU/mL, cerca de 1.300 IU/mL, cerca de 1.400 IU/mL, cerca de 1.500 IU/mL, cerca de 1.600 IU/mL, cerca de 1.700 IU/mL, cerca de 1.800 IU/mL, cerca de 1.900 IU/mL, cerca de 2.000 IU/mL, cerca de 2.100 IU/mL, cerca de 2.200 IU/mL, cerca de 2.300 IU/mL, cerca de 2.400 IU/mL, cerca de 2.500 IU/mL, cerca de 2.600 IU/mL, cerca de 2.700 IU/mL, cerca de 2.800 IU/mL, cerca de 2.900 IU/mL, cerca de 3.000 IU/mL, cerca de 3.100 IU/mL, cerca de 3.200 IU/mL, cerca de 3.300 IU/mL, cerca de 3.400 IU/mL, cerca de 3.500 IU/mL, cerca de 3.600 IU/mL, cerca de 3.700 IU/mL, cerca de 3.800 IU/mL, cerca de 3.900 IU/mL, cerca de 4.000 IU/mL, cerca de 4.100 IU/mL, cerca de 4.200 IU/mL, cerca de 4.300 IU/mL, cerca de 4.400 IU/mL, cerca de 4.500 IU/mL, cerca de 4.600 IU/mL, cerca de 4.700 IU/mL, cerca de 4.800 IU/mL, cerca de 4.900 IU/mL, cerca de 5.000 IU/mL, cerca de 5.100 IU/mL, cerca de 5.200 IU/mL, cerca de 5.300 IU/mL, cerca de 5.400 IU/mL, cerca de 5.500 IU/mL, cerca de 5.600 IU/mL, cerca de 5.700 IU/mL, cerca de 5.800 IU/mL, cerca de 5.900 IU/mL, cerca de 6.000 IU/mL, cerca de 6.500 IU/mL, cerca de 7.000 IU/mL, cerca de 7.500 IU/mL, cerca de 8.000 IU/mL, cerca de 8.500 IU/mL, cerca de 9.000 IU/mL, cerca de 9.500 IU/mL, e cerca de 10.000 IU/mL.

[00195] Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 pode ser adicionada à cultura em um ou mais dias por todo o método. Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 é adicionada no Dia 4. Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 é adicionada no Dia 7. Em uma modalidade da invenção, mais IL-2 é adicionada no Dia 11. Em uma outra modalidade, mais IL-2 é adicionada no Dia 4, Dia 7, e/ou Dia 11. Em uma modalidade da invenção, os MILs são cultivados com mais IL-2 durante um período de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, ou 14 dias. Em uma modalidade da invenção, os MILs são cultivados durante um período de 3 dias depois de cada adição de IL-2.

[00196] Em uma modalidade, o meio de cultura de células é trocado pelo menos uma vez durante o método. Em uma modalidade, o meio de cultura de células é trocado ao mesmo tempo que mais IL-2 é adicionada. Em uma outra modalidade o meio de cultura de células é trocado em pelo menos um de Dia 1, Dia 2, Dia 3, Dia 4, Dia 5, Dia 6, Dia 7, Dia 8, Dia 9, Dia 10, Dia 11, Dia 12, Dia 13, ou Dia 14. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura de células usado por todo o método pode ser o mesmo ou diferente. Em uma modalidade da invenção, o meio de cultura de células é CM-2, CM-4, ou AIM-V. Em uma modalidade da invenção, a etapa de troca do meio de cultura de células no Dia 11 é opcional. Em uma modalidade da invenção, o número de célula de partida de PBMCs para o processo de expansão é de cerca de 25.000 a cerca de 1.000.000, de cerca de 30.000 a cerca de 900.000, de cerca de 35.000 a cerca de 850.000, de cerca de 40.000 a cerca de 800.000, de cerca de 45.000 a cerca de 800.000, de cerca de 50.000 a cerca de 750.000, de cerca de 55.000 a cerca de 700.000, de cerca de 60.000 a cerca de 650.000, de cerca de 65.000 a cerca de 600.000, de cerca de 70.000 a cerca de 550.000, preferivelmente de cerca de 75.000 a cerca de 500.000, de cerca de 80.000 a cerca de 450.000, de cerca de 85.000 a cerca de 400.000, de cerca de 90.000 a cerca de 350.000, de cerca de 95.000 a cerca de 300.000, de cerca de 100.000 a cerca de 250.000, de cerca de 105.000 a cerca de 200.000, ou de cerca de 110.000 a cerca de 150.000. Em uma modalidade da invenção, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 138.000, 140.000, 145.000, ou mais. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 28.000. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 62.000. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 338.000. Em uma outra modalidade, o número de célula de partida de PBMCs é de cerca de 336.000.

[00197] Em uma modalidade da invenção, a expansão multiplicativa de MILs é de cerca de 20% a cerca de 100%, 25% a cerca de 95%, 30% a cerca

de 90%, 35% a cerca de 85%, 40% a cerca de 80%, 45% a cerca de 75%, 50% a cerca de 100%, ou 25% a cerca de 75%. Em uma modalidade da invenção, a expansão multiplicativa é de cerca de 25%. Em uma outra modalidade da invenção, a expansão multiplicativa é de cerca de 50%. Em uma outra modalidade, a expansão multiplicativa é de cerca de 75%.

[00198] Em uma modalidade da invenção, os MILs são expandidos a partir de 10 a 50 ml de aspirado de medula óssea. Em uma modalidade da invenção, 10 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em uma outra modalidade, 20 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em uma outra modalidade, 30 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em uma outra modalidade, 40 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em uma outra modalidade, 50 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente.

[00199] Em uma modalidade da invenção, o número de PBMCs produzido de cerca de 10 a 50 ml de aspirado de medula óssea é de cerca de 5×10^7 a cerca de 10×10^7 PBMCs. Em uma outra modalidade, o número de PMBCs produzido é de cerca de 7×10^7 PBMCs.

[00200] Em uma modalidade da invenção, cerca de 5×10^7 a cerca de 10×10^7 produzem cerca de $0,5 \times 10^6$ a cerca de $1,5 \times 10^6$ de material de célula de partida de expansão. Em uma modalidade da invenção, cerca de 1×10^6 de material de célula de partida de expansão é produzido.

[00201] Em uma modalidade da invenção, o número total de MILs colhidos no final do período de expansão é de cerca de $0,01 \times 10^9$ a cerca de 1×10^9 , de cerca de $0,05 \times 10^9$ a cerca de $0,9 \times 10^9$, de cerca de $0,1 \times 10^9$ a cerca de $0,85 \times 10^9$, de cerca de $0,15 \times 10^9$ a cerca de $0,7 \times 10^9$, de cerca de $0,2 \times 10^9$ a cerca de $0,65 \times 10^9$, de cerca de $0,25 \times 10^9$ a cerca de $0,6 \times 10^9$, de cerca de $0,3 \times 10^9$ a cerca de $0,55 \times 10^9$, de cerca de $0,35 \times 10^9$ a cerca de $0,5 \times 10^9$, ou de cerca de $0,4 \times 10^9$ a cerca de $0,45 \times 10^9$.

[00202] Em uma modalidade da invenção, 12×10^6 PBMC derivadas

de aspirado de medula óssea produzem aproximadamente $1,4 \times 10^5$ de material de célula de partida, que produzem cerca de $1,1 \times 10^7$ MILs no final do processo de expansão.

[00203] Em uma modalidade da invenção, os MILs expandidos a partir das PBMCs da medula óssea usando o Método MIL 3 descrito acima compreende uma porção alta de células CD8+ e número mais baixo de células LAG3+ e PD1+ quando comparados com MILs expandidos usando o Método MIL 1 ou o Método MIL 2. Em uma modalidade da invenção, PBLs expandidos a partir de PBMC do sangue usando o Método MIL 3 descrito acima compreende uma porção alta de células CD8+ e níveis aumentados de produção de INF γ quando comparados com PBLs expandidos usando o Método MIL 1 ou o Método MIL 2.

[00204] Em uma modalidade da invenção, a dose clínica de MILs útil para os pacientes com leucemia mieloide aguda (AML) está na faixa de cerca de 4×10^8 a cerca de $2,5 \times 10^9$ MILs. Em uma outra modalidade, o número de MILs provido na composição farmacêutica da invenção é $9,5 \times 10^8$ MILs. Em uma outra modalidade, o número de MILs provido na composição farmacêutica da invenção é $4,1 \times 10^8$. Em uma outra modalidade, o número de MILs provido na composição farmacêutica da invenção é $2,2 \times 10^9$.

[00205] Em qualquer uma das modalidades precedentes, as PBMCs podem ser derivadas de uma amostra de sangue integral, a partir da medula óssea, pela aferese, da camada leucoplaquetária, ou de qualquer outro método conhecido na técnica para obter PBMCs.

Métodos para a Expansão de TILs Usando o “Processo 2A”

[00206] Em uma modalidade da presente invenção, a invenção provê dispositivos e métodos para expandir células T derivadas da medula óssea e/ou sangue periférico. Em uma modalidade da invenção, as células T têm uma especificidade de tumor aumentada do microambiente da medula óssea em uma maneira policlonal, porém altamente específica de tumor. Em uma

modalidade, o microambiente da medula óssea é usado para sustentar e expandir as células T. Em uma modalidade da invenção, há aproximadamente uma expansão de TILs de 25 a 100 vezes em um processo de expansão de 7-dias ou 14-dias. Em uma modalidade, a expansão multiplicativa de TILs é de cerca de 30 a 90 vezes. Em uma modalidade, a expansão multiplicativa é de cerca de 35 a 85 vezes. Em uma modalidade, a expansão multiplicativa é de cerca de 40 a 80 vezes. Em uma modalidade, a expansão multiplicativa é de cerca de 45 a 75 vezes. Em uma outra modalidade, a expansão multiplicativa é de cerca de 40 a 70 vezes. Em uma outra modalidade, a expansão multiplicativa é de cerca de 45 a 65 vezes. Em uma outra modalidade, a expansão multiplicativa é expansão de cerca de 25 vezes, cerca de 30 vezes, cerca de 35 vezes, cerca de 40 vezes, cerca de 45 vezes, e 50 vezes, cerca de 55 vezes, cerca de 60 vezes, cerca de 65 vezes, cerca de 70 vezes, cerca de 75 vezes, cerca de 80 vezes, cerca de 85 vezes, cerca de 90 vezes, cerca de 95 vezes, ou cerca de 100 vezes.

[00207] Em uma modalidade da invenção, o processo de fabricação da célula T não requer nenhuma intervenção para selecionar quanto à especificidade tumoral. Em uma modalidade da invenção, o processo de fabricação da célula T não requer a presença de tumor na medula óssea e/ou sangue periférico no momento da expansão da célula T. Em uma modalidade, as células T são expandidas na presença de medula óssea quase completa.

[00208] Em uma modalidade, a invenção provê um método para extrair células T a partir da medula óssea e/ou sangue periférico como descrito nos Exemplos, e em particular, Exemplo 21, apresentado na WO 2010/062742, que é aqui incorporada por referência. Em uma modalidade, a invenção provê um método para extrair células T a partir da medula óssea e/ou sangue periférico como descrito, por exemplo, em Noonan, *et al.*, 2005, Cancer Res. 65:2026-2034, que é aqui incorporada por referência.

[00209] Em uma modalidade, os métodos para obter medula óssea e/ou

sangue periférico são conhecidos por uma pessoa versada na técnica são úteis na presente invenção. Em uma modalidade da invenção, a medula óssea e/ou sangue periférico são obtidas usando aspiração com agulha. Em uma modalidade da invenção, a medula óssea de um paciente é aspirada em seringas contendo heparina e armazenadas durante a noite na temperatura ambiente. Em uma modalidade da invenção, depois da armazenagem, os conteúdos das seringas são reunidos juntos em um recipiente estéril e a qualidade testada. A medula óssea é enriquecida quanto às células mononucleares (MNCs) usando meios de separação de linfócito (LSM) e centrifugação com um COBE Spectra. As células no gradiente são coletadas para as células sanguíneas vermelhas e lavadas usando HBSS. As MNCs são criopreservadas usando um crioprotetor com base em *hetastarch* suplementados com 2% de HSA e 5% de DMSO, reservar algumas das MNCs para o controle da qualidade. O frasco QC é descongelado para determinar o conteúdo celular CD3+ e CD38+/138+ do produto de MNC. É importante mencionar que a coleta de medula óssea não uma limitação para a presente invenção.

[00210] Em uma modalidade da invenção, a medula óssea é aspirada e fracionada em um gradiente de densidade de Meio de Separação de Linfócito e células são coletadas quase ao nível da pelota de célula vermelha. Em uma modalidade, este método de fracionamento substancialmente remove células de sangue vermelho e neutrófilos, provendo medula óssea quase completa. Em uma modalidade, o material fracionado resultante é células T e células de tumor. Em uma modalidade da invenção, os métodos podem ser praticados sem uma etapa de separação específica de célula T, e sem uma etapa de separação de célula T, tal como, por exemplo, sem rotular as células T com anticorpos ou outros rótulos detectáveis específicos do tipo de célula, e sem classificação usando a classificação de célula ativada por fluorescência (FACS).

[00211] Em uma modalidade da invenção, a medula óssea obtida é submetida a Ficoll ou o sangue periférico é colocado em suspensão em condições livre de soro a 1×10^6 células/mL em meio AIM-V a 200 uL/poço.

[00212] Em uma modalidade da invenção, a medula óssea é coletada de um sujeito que não está em remissão completa. Em uma modalidade da invenção, a medula óssea é coletada de um sujeito que não está em remissão completa.

[00213] Em uma modalidade da invenção, a medula óssea pode ser obtida e congelada. Em uma modalidade, a medula óssea pode ser obtida e imediatamente usada para extrair células T.

[00214] Em modalidades adicionais e de acordo com qualquer uma das acima, a invenção provê um método para expandir TILs, o método compreendendo contatar uma população de TILs compreendendo pelo menos um TIL obtido de um tumor líquido. Todos os debates de expandir TILs aqui são aplicáveis para a expansão de TILs obtidos a partir da medula óssea, sangue periférico, e/ou uma malignidade hematológica, incluindo um tumor líquido.

[00215] Em uma modalidade, a invenção provê um processo para a preparação de uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) de um tumor, o processo compreendendo as etapas de:

(a) contatar um tumor fragmentado com um primeiro meio de cultura de células;

(b) realizar uma expansão inicial (pré-REP) da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2;

(c) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira

população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3), células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas; e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(d) colher a terceira população de TILs; e

em que o tumor é um tumor líquido, e em que o câncer é uma malignidade hematológica.

[00216] Em uma modalidade, a invenção provê um processo para expandir uma população de TILs incluindo um primeiro processo de expansão pré-rápida (pré-REP) e depois um segundo processo de expansão (que pode ser um processo de expansão rápida-REP), em que o meio de cultura de células usado para expansão compreende IL-2 em uma concentração selecionada do grupo consistindo em: entre 100 IU/mL e 10.000 IU/mL, entre 200 IU/mL e 5.000 IU/mL, entre 300 IU/mL e 4.800 IU/mL, entre 400 IU/mL e 4.600 IU/mL, entre 500 IU/mL e 4.400 IU/mL, entre 600 IU/mL e 4.200 IU/mL, entre 700 IU/mL e 4.000 IU/mL, entre 800 IU/mL e 3.800 IU/mL, entre 900 IU/mL e 3.600 IU/mL, entre 1.000 IU/mL e 3.400 IU/mL, entre 1.100 IU/mL e 3.200 IU/mL, entre 1.200 IU/mL e 3.000 IU/mL, entre 1.300 IU/mL e 2.800 IU/mL, entre 1.400 IU/mL e 2.600 IU/mL, entre 1.500 IU/mL e 2.400 IU/mL, entre 1.600 IU/mL e 2.200 IU/mL, entre 1.700 IU/mL e 2.000 IU/mL, entre 5.500 IU/mL e 9.500 IU/mL, entre 6.000 IU/mL e 9.000 IU/mL, entre 6.500 IU/mL e 8.500 IU/mL, entre 7.000 IU/mL e 8.000 IU/mL, e entre 7.500 IU/mL e 8.000 IU/mL.

[00217] Em uma modalidade, a invenção provê um processo para expandir uma população de TILs incluindo um processo de expansão pré-rápida (pré-REP) e um processo de expansão rápida (REP), em que o meio de cultura de células usado para expansão compreende IL-2 em uma

concentração selecionada do grupo consistindo em cerca de 100 IU/mL, cerca de 200 IU/mL, cerca de 300 IU/mL, cerca de 400 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 100 IU/mL, cerca de 500 IU/mL, cerca de 600 IU/mL, cerca de 700 IU/mL, cerca de 800 IU/mL, cerca de 900 IU/mL, cerca de 1.000 IU/mL, cerca de 1.100 IU/mL, cerca de 1.200 IU/mL, cerca de 1.300 IU/mL, cerca de 1.400 IU/mL, cerca de 1.500 IU/mL, cerca de 1.600 IU/mL, cerca de 1.700 IU/mL, cerca de 1.800 IU/mL, cerca de 1.900 IU/mL, cerca de 2.000 IU/mL, cerca de 2.100 IU/mL, cerca de 2.200 IU/mL, cerca de 2.300 IU/mL, cerca de 2.400 IU/mL, cerca de 2.500 IU/mL, cerca de 2.600 IU/mL, cerca de 2.700 IU/mL, cerca de 2.800 IU/mL, cerca de 2.900 IU/mL, cerca de 3.000 IU/mL, cerca de 3.100 IU/mL, cerca de 3.200 IU/mL, cerca de 3.300 IU/mL, cerca de 3.400 IU/mL, cerca de 3.500 IU/mL, cerca de 3.600 IU/mL, cerca de 3.700 IU/mL, cerca de 3.800 IU/mL, cerca de 3.900 IU/mL, cerca de 4.000 IU/mL, cerca de 4.100 IU/mL, cerca de 4.200 IU/mL, cerca de 4.300 IU/mL, cerca de 4.400 IU/mL, cerca de 4.500 IU/mL, cerca de 4.600 IU/mL, cerca de 4.700 IU/mL, cerca de 4.800 IU/mL, cerca de 4.900 IU/mL, cerca de 5.000 IU/mL, cerca de 5.100 IU/mL, cerca de 5.200 IU/mL, cerca de 5.300 IU/mL, cerca de 5.400 IU/mL, cerca de 5.500 IU/mL, cerca de 5.600 IU/mL, cerca de 5.700 IU/mL, cerca de 5.800 IU/mL, cerca de 5.900 IU/mL, cerca de 6.000 IU/mL, cerca de 6.500 IU/mL, cerca de 7.000 IU/mL, cerca de 7.500 IU/mL, cerca de 8.000 IU/mL, cerca de 8.500 IU/mL, cerca de 9.000 IU/mL, cerca de 9.500 IU/mL, e cerca de 10.000 IU/mL.

[00218] Em uma modalidade, a invenção provê um processo para expandir uma população de TILs incluindo um processo de expansão pré-rápido (pré-REP). Em uma modalidade, a invenção provê um processo pré-REP de expandir uma população de TILs, o processo pré-REP compreendendo as etapas de contatar a população de TILs obtidas de um tumor líquido com um meio de cultura de células, em que o meio de cultura

de células compreende adicionalmente IL-2 em uma concentração inicial dentre 1000 IU/mL e 6000 IU/mL.

[00219] Em uma modalidade, a invenção provê um processo pré-REP para expandir uma população de TILs, o processo compreendendo as etapas de contatar a população de TILs obtidos de um tumor líquido com um meio de cultura de células, em que o meio de cultura de células compreende adicionalmente IL-2 em uma concentração inicial de cerca de 6000 IU/mL.

[00220] Em uma modalidade, REP pode ser realizado em um recipiente permeável a gás usando TILs obtidos de um tumor líquido de acordo com a presente divulgação por qualquer método adequado. Por exemplo, TILs podem ser rapidamente expandidos usando a estimulação de receptor de célula T não específico na presença de interleucina-2 (IL-2) ou interleucina-15 (IL-15). O estímulo do receptor de célula T não específico pode incluir, por exemplo, cerca de 30 ng/mL de OKT-3, um anticorpo monoclonal anti-CD3 (comercialmente disponível da Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA). TILs podem ser rapidamente expandidos pela estimulação adicional dos TILs *in vitro* com um ou mais antígenos, incluindo porções antigênicas dos mesmos, tais como epítipo(s) de câncer, que podem ser opcionalmente expressos a partir de um vetor, tal como um peptídeo de ligação a antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), por exemplo, 0,3 µM de MART-1:26-35 (27 L) ou gpl 00:209-217 (210M), opcionalmente na presença de um fator de crescimento de célula T, tal como 300 IU/mL de IL-2 ou IL-15. Outros antígenos adequados podem incluir, por exemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno canceroso da tirosinase, MAGE-A3, SSX-2 e VEGFR2, ou porções antigênicas dos mesmos. TIL também pode ser rapidamente expandido pela reestimulação com o(s) mesmo(s) antígeno(s) do câncer pulsado(s) sobre células que apresentam antígeno expressando HLA-A2. Alternativamente, os TILs podem ser reestimulados ainda com, por exemplo, linfócitos irradiados, autólogos ou

com linfócitos halogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2.

[00221] Em uma modalidade, um método para expandir TILs pode incluir o uso de cerca de 5000 mL a cerca de 25000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 5000 mL a cerca de 10000 mL de meio de cultura de célula, ou cerca de 5800 mL a cerca de 8700 mL de meio de cultura de célula. Em uma modalidade, um método para expandir TILs pode incluir o uso de cerca de 1000 mL a cerca de 2000 mL de meio de célula, cerca de 2000 mL a cerca de 3000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 3000 mL a cerca de 4000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 4000 mL a cerca de 5000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 5000 mL a cerca de 6000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 6000 mL a cerca de 7000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 7000 mL a cerca de 8000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 8000 mL a cerca de 9000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 9000 mL a cerca de 10000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 10000 mL a cerca de 15000 mL de meio de cultura de célula, cerca de 15000 mL a cerca de 20000 mL de meio de cultura de célula, ou cerca de 20000 mL a cerca de 25000 mL de meio de cultura de célula. Em uma modalidade, expandir o número de TILs não usa mais do que um tipo de meio de cultura de célula. Qualquer meio de cultura de célula adequado pode ser usado, por exemplo, meio de célula AIM-V (L-glutamina, 50 μ M de sulfato de estreptomicina e 10 μ M de sulfato de gentamicina) meio de cultura de célula (Invitrogen, Carlsbad CA). A este respeito, os métodos inventivos vantajosamente reduzem a quantidade de meio e o número de tipos de meio requeridos para expandir o número de TIL. Em uma modalidade, expandir o número de TIL podem compreender alimentar as células não mais frequentemente do que a cada terceiro ou quarto dia. Expandir o número de células em um recipiente permeável a gás simplifica os procedimentos necessários para expandir o número de células pela redução da frequência de alimentação necessária para expandir as células.

[00222] Em uma modalidade, a segunda expansão é realizada usando um recipiente permeável a gás. Tais modalidades permitem que as populações de célula expandam de cerca de 5×10^5 células/cm² até entre 10×10^6 e 30×10^6 células/cm². Em uma modalidade, esta expansão ocorre sem alimentação. Em uma modalidade, esta expansão ocorre sem alimentação contanto que o meio resida em uma altura de cerca de 10 cm em um frasco permeável a gás. Em uma modalidade, isto é, sem alimentação, mas com a adição de uma ou mais citocinas. Em uma modalidade, a citocina pode ser adicionada como um bolo sem nenhuma necessidade para misturar a citocina com o meio. Tais recipientes, dispositivos e métodos são conhecidos na técnica e foram usados para expandir TILs e incluem aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2014/0377739 A1, Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2014/210036 A1, Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2013/0115617 A1, Publicação Internacional nº WO 2013/188427 A1, Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2011/0136228 A1, Patente norte-americana nº 8.809.050, Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2011/072088 A2, Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2016/0208216 A1, Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2012/0244133 A1, Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2012/129201 A1, Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2013/0102075 A1, Patente norte-americana nº 8.956.860, Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2013/173835 A1 e Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2015/0175966 A1, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. Tais processos também são descritos em Jin, *et al.*, *J. Immunotherapy* **2012**, 35, 283-292, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência.

[00223] Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás é um frasco G-Rex 10 (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN,

USA). Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma superfície de cultura permeável a gás de 10 cm². Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma capacidade de 40 mL de meio de cultura de célula. Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás provê 100 a 300 milhões de TILs depois de 2 trocas de meio.

[00224] Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás é um frasco G-Rex 100 (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma superfície de cultura permeável a gás de 100 cm². Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma capacidade de meio de cultura de célula de 450 mL. Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás provê 1 a 3 bilhões de TILs depois de 2 trocas de meio.

[00225] Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás é um frasco G-Rex de 100M (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma superfície de cultura permeável a gás de 100 cm². Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma capacidade de meio de cultura de célula de 1000 mL. Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás provê 1 a 3 bilhões de TILs sem troca de meio.

[00226] Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás é um Frasco G-Rex 100L (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma superfície de cultura permeável a gás de 100 cm². Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma capacidade de meio de cultura de célula de 2000 mL. Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás provê 1 a 3 bilhões de TILs sem troca de meio.

[00227] Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás é uma placa de 24 poços G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma

placa com poços, em que cada poço inclui uma superfície de cultura permeável a gás de 2 cm². Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma placa com poços, em que cada poço inclui uma capacidade de meio de cultura de célula de 8 mL. Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás provê 20 a 60 milhões de células por poço depois de 2 trocas de meio.

[00228] Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás é uma placa de 6 poços G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma placa com poços, em que cada poço inclui uma superfície de cultura permeável a gás de 10 cm². Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás inclui uma placa com poços, em que cada poço inclui uma capacidade de meio de cultura de célula de 40 mL. Em uma modalidade, o recipiente permeável a gás provê 100 a 300 milhões de células por poço depois de 2 trocas de meio.

[00229] Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou segundo recipientes permeáveis a gás não é filtrado. O uso de meio de célula não filtrado pode simplificar os procedimentos necessários para expandir o número de células. Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou segundo recipientes permeáveis a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME).

[00230] Em uma modalidade, a duração do método compreendendo a obtenção de uma amostra de tecido de tumor do mamífero; cultivar a amostra de tecido de tumor em um primeiro recipiente permeável a gás contendo meio de célula nele; obter TILs da amostra de tecido de tumor; expandir o número de TILs em um segundo recipiente permeável a gás contendo meio de célula nele por uma duração de cerca de 14 a cerca de 42 dias, por exemplo, cerca de 28 dias.

[00231] Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende IL-2. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de células compreende

cerca de 3000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende cerca de 1000 IU/mL, cerca de 1500 IU/mL, cerca de 2000 IU/mL, cerca de 2500 IU/mL, cerca de 3000 IU/mL, cerca de 3500 IU/mL, cerca de 4000 IU/mL, cerca de 4500 IU/mL, cerca de 5000 IU/mL, cerca de 5500 IU/mL, cerca de 6000 IU/mL, cerca de 6500 IU/mL, cerca de 7000 IU/mL, cerca de 7500 IU/mL, ou cerca de 8000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende entre 1000 e 2000 IU/mL, entre 2000 e 3000 IU/mL, entre 3000 e 4000 IU/mL, entre 4000 e 5000 IU/mL, entre 5000 e 6000 IU/mL, entre 6000 e 7000 IU/mL, entre 7000 e 8000 IU/mL, ou entre 8000 IU/mL de IL-2.

[00232] Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende anticorpo OKT-3. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de células compreende cerca de 30 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende cerca de 0,1 ng/mL, cerca de 0,5 ng/mL, cerca de 1 ng/mL, cerca de 2,5 ng/mL, cerca de 5 ng/mL, cerca de 7,5 ng/mL, cerca de 10 ng/mL, cerca de 15 ng/mL, cerca de 20 ng/mL, cerca de 25 ng/mL, cerca de 30 ng/mL, cerca de 35 ng/mL, cerca de 40 ng/mL, cerca de 50 ng/mL, cerca de 60 ng/mL, cerca de 70 ng/mL, cerca de 80 ng/mL, cerca de 90 ng/mL, cerca de 100 ng/mL, cerca de 200 ng/mL, cerca de 500 ng/mL e cerca de 1 µg/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende entre 0,1 ng/mL e 1 ng/mL, entre 1 ng/mL e 5 ng/mL, entre 5 ng/mL e 10 ng/mL, entre 10 ng/mL e 20 ng/mL, entre 20 ng/mL e 30 ng/mL, entre 30 ng/mL e 40 ng/mL, entre 40 ng/mL e 50 ng/mL e entre 50 ng/mL e 100 ng/mL de anticorpo OKT-3.

[00233] Em uma modalidade, TILs são expandidos em recipientes permeáveis a gás. Os recipientes permeáveis a gás foram usados para expandir TILs usando PBMCs usando métodos, composições e dispositivos conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº 2005/0106717 A1, as divulgações da qual é

aqui incorporada por referência. Em uma modalidade, TILs são expandidos em bolsas permeáveis a gás. Em uma modalidade, TILs são expandidos usando um sistema de expansão de célula que expande TILs em bolsas permeáveis a gás, tais como o sistema de expansão de célula Xuri W25 (GE Healthcare). Em uma modalidade, TILs são expandidos usando um sistema de expansão de célula que expande TILs em bolsas permeáveis a gás, tais como o WAVE Bioreactor System, também conhecido como o Sistema de expansão de célula Xuri W5 (GE Healthcare). Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula inclui uma bolsa de célula permeável a gás com um volume selecionado do grupo consistindo em cerca de 100 mL, cerca de 200 mL, cerca de 300 mL, cerca de 400 mL, cerca de 500 mL, cerca de 600 mL, cerca de 700 mL, cerca de 800 mL, cerca de 900 mL, cerca de 1 L, cerca de 2 L, cerca de 3 L, cerca de 4 L, cerca de 5 L, cerca de 6 L, cerca de 7 L, cerca de 8 L, cerca de 9 L, cerca de 10 L, cerca de 11 L, cerca de 12 L, cerca de 13 L, cerca de 14 L, cerca de 15 L, cerca de 16 L, cerca de 17 L, cerca de 18 L, cerca de 19 L, cerca de 20 L, cerca de 25 L e cerca de 30 L. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula inclui uma bolsa de célula permeável a gás com uma faixa de volume selecionada do grupo consistindo entre 50 e 150 mL, entre 150 e 250 mL, entre 250 e 350 mL, entre 350 e 450 mL, entre 450 e 550 mL, entre 550 e 650 mL, entre 650 e 750 mL, entre 750 e 850 mL, entre 850 e 950 mL e entre 950 e 1050 mL. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula inclui uma bolsa de célula permeável a gás com uma faixa de volume selecionada do grupo consistindo entre 1 L e 2 L, entre 2 L e 3 L, entre 3 L e 4 L, entre 4 L e 5 L, entre 5 L e 6 L, entre 6 L e 7 L, entre 7 L e 8 L, entre 8 L e 9 L, entre 9 L e 10 L, entre 10 L e 11 L, entre 11 L e 12 L, entre 12 L e 13 L, entre 13 L e 14 L, entre 14 L e 15 L, entre 15 L e 16 L, entre 16 L e 17 L, entre 17 L e 18 L, entre 18 L e 19 L e entre 19 L e 20 L. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula inclui uma bolsa de célula permeável a gás com uma faixa de volume selecionada do grupo

consistindo entre 0,5 L e 5 L, entre 5 L e 10 L, entre 10 L e 15 L, entre 15 L e 20 L, entre 20 L e 25 L e entre 25 L e 30 L. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula utiliza um tempo de agitação de cerca de 30 minutos, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 2 dias, cerca de 3 dias, cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 8 dias, cerca de 9 dias, cerca de 10 dias, cerca de 11 dias, cerca de 12 dias, cerca de 13 dias, cerca de 14 dias, cerca de 15 dias, cerca de 16 dias, cerca de 17 dias, cerca de 18 dias, cerca de 19 dias, cerca de 20 dias, cerca de 21 dias, cerca de 22 dias, cerca de 23 dias, cerca de 24 dias, cerca de 25 dias, cerca de 26 dias, cerca de 27 dias e cerca de 28 dias. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula utiliza um tempo de agitação dentre 30 minutos e 1 hora, entre 1 hora e 12 horas, entre 12 horas e 1 dia, entre 1 dia e 7 dias, entre 7 dias e 14 dias, entre 14 dias e 21 dias e entre 21 dias e 28 dias. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula utiliza uma taxa de agitação de cerca de 2 agitações/minuto, cerca de 5 agitações/minuto, cerca de 10 agitações/minuto, cerca de 20 agitações/minuto, cerca de 30 agitações/minuto e cerca de 40 agitações/minuto. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula utiliza uma taxa de agitação dentre 2 agitações/minuto e 5 agitações/minuto, 5 agitações/minuto e 10 agitações/minuto, 10 agitações/minuto e 20 agitações/minuto, 20 agitações/minuto e 30 agitações/minuto e 30 agitações/minuto e 40 agitações/minuto. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula utiliza um ângulo de agitação de cerca de 2°, cerca de 3°, cerca de 4°, cerca de 5°, cerca de 6°, cerca de 7°, cerca de 8°, cerca de 9°, cerca de 10°, cerca de 11° e cerca de 12°. Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula utiliza um ângulo de agitação dentre 2° e 3°, entre 3° e 4°, entre 4° e 5°, entre 5° e 6°, entre 6° e 7°, entre 7° e 8°, entre 8° e 9°, entre 9° e 10°, entre 10° e

11° e entre 11° e 12°.

[00234] Em uma modalidade, um método para expandir TILs obtidos de um tumor líquido compreende ainda uma etapa em que TILs são selecionados quanto à reatividade de tumor superior. Qualquer método de seleção conhecido na técnica pode ser usado. Por exemplo, os métodos descritos na Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº 2016/0010058 A1, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência, podem ser usados para a seleção de TILs quanto à reatividade de tumor superior.

[00235] Em uma modalidade, a invenção provê um método para expandir uma população de TILs de um tumor líquido, o método compreendendo as etapas como descritas em Jin, *et al.*, *J. Immunotherapy* **2012**, 35, 283-292, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. Por exemplo, o tumor ou porção do mesmo podem ser colocados em meios enzimáticos e mecanicamente dissociados durante aproximadamente 1 minuto. A mistura pode ser depois incubada por 30 minutos a 37 °C em 5% de CO₂ e depois mecanicamente rompida mais uma vez durante aproximadamente 1 minuto. Depois da incubação durante 30 minutos a 37 °C em 5% de CO₂, o tumor ou porção do mesmo podem ser mecanicamente rompidos uma terceira vez durante aproximadamente 1 minuto. Se depois do terceiro rompimento mecânico, pedaços grandes de tecido estão presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais podem ser aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 °C em 5% de CO₂. No final da incubação final, se a suspensão de célula contém um número grande de células sanguíneas vermelhas ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade usando Ficoll pode ser realizada para remover estas células. As culturas de TIL foram iniciadas em placas de 24 poços (grupo de cultura de célula Costar de 24 poços, fundo chato; Corning Incorporated, Corning, NY), cada poço pode ser semeado com 1x10⁶ células de tumor digeridas ou um

fragmento de tumor de aproximadamente 1 a 8 mm³ no tamanho em 2 mL de meio completo (CM) com IL-2 (6000 IU/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA). CM compreende o tampão 1640 do Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com GlutaMAX, suplementado com 10% de soro AB humano, 25 mM de Hepes e 10 mg/mL de gentamicina. As culturas podem ser iniciadas em frascos permeáveis a gás com uma capacidade de 40 mL e um fundo de silício permeável a gás de 10 cm² (G-Rex 10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, cada frasco pode ser carregado com 10 a 40 x 10⁶ células de tumor viáveis digeridas ou 5 a 30 fragmentos de tumor em 10 a 40 mL de CM com IL-2. G-Rex 10 e as placas de 24 poços podem ser incubadas em um incubador umidificado a 37 °C em 5% de CO₂ e 5 dias depois do início da cultura, metade dos meios pode ser removida e repostada com CM e IL-2 frescos e depois do 5º dia, metade dos meios pode ser mudada a cada 2 a 3 dias. Um segundo protocolo de expansão (REP) de TILs pode ser realizado usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gás ou frascos G-Rex permeáveis a gás, como aqui descrito em outro lugar, usando TILs obtidos a partir dos tumores líquidos da presente divulgação. Para o REP em frascos T-175, 1 x 10⁶ TILs podem ser colocados em suspensão em 150 mL de meios em cada frasco. O TIL pode ser cultivado em uma mistura 1 para 1 de meio CM e AIM-V (meio 50/50), suplementado com 3000 IU/mL de IL-2 e 30 ng/mL de anticorpo anti-CD3 (OKT-3). Os frascos T-175 podem ser incubados a 37 °C em 5% de CO₂. Metade dos meios pode ser mudada no Dia 5 usando meio 50/50 com 3000 IU/mL de IL-2. No Dia 7, as células de frascos 2 T-175 podem ser combinados em uma bolsa de 3L e 300 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU/mL de IL-2 podem ser adicionados aos 300 mL de suspensão de TIL. O número de células em cada bolsa pode ser contado a cada dia ou dois dias e meios frescos podem ser adicionados para manter a contagem de célula entre 0,5 e 2,0 x 10⁶ células/mL. Para REP em frascos com capacidade de 500 mL com fundos de silício permeáveis a gás de 100

cm² (por exemplo, G-Rex 100, Wilson Wolf Manufacturing, como aqui descrito em outro lugar), 5×10^6 ou 10×10^6 TILs podem ser cultivados em 400 mL de meio 50/50, suplementado com 3000 IU/mL de IL-2 e 30 ng/mL de anticorpo anti-CD3 (OKT-3). Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37 °C em 5% de CO₂. No Dia cinco, 250 mL de sobrenadante podem ser removidos e colocados dentro de garrafas centrífugas e centrifugadas a 1500 rpm (491 g) durante 10 minutos. Os grânulos de TIL obtidos podem ser recolocados em suspensão com 150 mL de meio 50/50 fresco com 3000 IU/mL de IL-2 e adicionados de volta para os frascos G-Rex 100. Quando TILs são expandidos em série em frascos G-Rex 100, no Dia sete os TILs em cada G-Rex 100 são colocados em suspensão nos 300 mL de meios presentes em cada frasco e a suspensão de célula pode ser dividida em três alíquotas de 100 mL que podem ser usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Cerca de 150 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU/mL de IL-2 podem ser depois adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 podem ser depois incubados a 37 °C em 5% de CO₂ e depois de quatro dias, 150 mL de AIM-V com 3000 IU/mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco G-Rex 100. Depois disto, o REP pode ser completado colhendo-se as células no Dia 14 da cultura.

[00236] Em uma modalidade, um método para expandir ou tratar um câncer inclui uma etapa em que os TILs são obtidos de uma amostra de tumor de paciente. Uma amostra de tumor de paciente pode ser obtida usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, TILs podem ser cultivados a partir de digestões enzimáticas de tumor e fragmentos de tumor (cerca de 1 a cerca de 8 mm³ no tamanho) da dissecação pronunciada. Tais digestões de tumor podem ser produzidas pela incubação em meios enzimáticos (por exemplo, tampão 1640 do Roswell Park Memorial Institute (RPMI), 2 mM de glutamato, 10 mg/mL de gentamicina, 30 unidades/mL de DNase e 1,0 mg/mL de collagenase) seguida pela dissociação mecânica (por exemplo,

usando um dissociador de tecido). As digestões de tumor podem ser produzidas colocando-se o tumor em meios enzimáticos e dissociando-se mecanicamente o tumor durante aproximadamente 1 minuto, seguido pela incubação durante 30 minutos a 37 °C em 5% de CO₂, seguida pelos ciclos repetidos de dissociação mecânica e incubação sob as condições precedentes até que apenas pedaços de tecido pequenos estejam presentes. No final deste processo, se a suspensão de célula contiver um número grande de células sanguíneas vermelhas ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade usando polissacarídeo hidrofílico ramificado com FICOLL pode ser realizada para remover estas células. Métodos alternativos conhecidos na técnica podem ser usados, tais como aqueles descritos na Publicação do pedido de Patente norte-americano nº 2012/0244133 A1, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. Qualquer um dos métodos precedentes pode ser usado em qualquer uma das modalidades aqui descritas para os métodos de expandir TILs ou métodos de tratar um câncer.

[00237] Em uma modalidade, o segundo processo de expansão/REP para TILs pode ser realizado usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gás como anteriormente descrito (Tran, *et al.*, *J. Immunother.* **2008**, *31*, 742-51; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, *26*, 332-42) ou vidraria de cultura permeável a gás (frascos G-Rex, comercialmente disponíveis da Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Para a expansão de TIL em frascos T-175, 1 x 10⁶ TILs colocados em suspensão em 150 mL de meios podem ser adicionados a cada frasco T-175. Os TILs podem ser cultivados em uma mistura 1 para 1 de meio CM e AIM-V, suplementado com 3000 IU (unidades internacionais) por mL de IL-2 e 30 ng por mL de anticorpo anti-CD3 (por exemplo, OKT-3). Os frascos T-175 podem ser incubadas a 37° C em 5% de CO₂. Metade dos meios pode ser trocada no Dia 5 usando meio 50/50 com 3000 IU por mL de IL-2. No Dia 7 as células de dois frascos T-175 podem ser combinadas em uma bolsa de 3 L e 300 mL de

AIM V com 5% de soro AB humano e 3000 IU por mL de IL-2 foram adicionados aos 300 ml de suspensão de TIL. O número de células em cada bolsa foi contado a cada dia ou dois e meios frescos foram adicionados para manter a contagem de célula entre $0,5$ e $2,0 \times 10^6$ células/mL.

[00238] Em uma modalidade, para a segunda expansão/REP de TILs em frascos permeáveis a gás com capacidade de 500 mL com 100 cm^2 de fundos de silício permeáveis a gás (G-Rex 100, comercialmente disponíveis da Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), 5×10^6 ou 10×10^6 TIL pode ser cultivada em 400 mL de meio 50/50, suplementado com 5% de soro AB humano, 3000 IU por mL de IL-2 e 30 ng por mL de anti-CD3 (OKT-3). Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO_2 . No Dia 5, 250 mL de sobrenadante podem ser removidos e colocados em garrafas centrífugas e centrifugadas a 1500 rpm (revoluções por minuto; $491 \times g$) durante 10 minutos. Os grânulos TIL podem ser recolocados em suspensão com 150 mL de meio fresco com 5% de soro AB humano, 3000 IU por mL de IL-2 e adicionado de volta aos frascos G-Rex 100 original. Quando TILs são expandidos em série em frascos G-Rex 100, no Dia 7 os TILs em cada frasco G-Rex 100 podem ser colocados em suspensão nos 300 mL de meios presentes em cada frasco e a suspensão de célula pode ser dividida em 3 alíquotas 100 mL que podem ser usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Depois 150 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU por mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO_2 e depois de 4 dias 150 mL de AIM-V com 3000 IU por mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco G-Rex 100. As células podem ser colhidas no Dia 14 de cultura.

[00239] Em uma modalidade, os TILs podem ser preparados como segue. Fragmentos de tumor de 2 mm^3 são cultivados em meios completos (CM) compreendendo de meio AIM-V (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado com 2 mM de glutamina (Mediatech, Inc.

Manassas, VA), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen Life Technologies), 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen Life Technologies), 5% de soro AB humano inativado por calor (Valley Biomedical, Inc. Winchester, VA) e 600 IU/mL de rhIL-2 (Chiron, Emeryville, CA). Para a digestão enzimática de tumores líquidos, os espécimes de tumor são cortados em cubos em RPMI-1640, lavados e centrifugados a 800 rpm durante 5 minutos de 15 a 22°C e recolocados em suspensão em tampão de digestão enzimática (0,2 mg/mL de Colagenase e 30 unidades/ml de DNase em RPMI-1640) seguido pela rotação durante a noite na temperatura ambiente. Os TILs estabelecidos a partir de fragmentos podem ser desenvolvidos durante 3 a 4 semanas em CM e expandidos frescos ou criopreservados em soro HAB inativado por calor com 10% de sulfóxido de dimetila (DMSO) e armazenados a -180°C até o momento de estudo. Os linfócitos associados a tumor (TAL) obtidos a partir de coleções de ascite foram semeados a 3×10^6 células/poço de uma placa de 24 poços em CM. O TIL cultivado foi inspecionado dia sim dia não usando um microscópio invertido de baixa potência.

Uma Modalidade Exemplar do Processo de Fabricação de TIL (o “Processo 2A”)

[00240] Em uma outra modalidade, um processo de fabricação/expansão de TIL exemplar conhecido como processo 2A é esquematicamente ilustrado na FIG. 22. Em certos aspectos, os presentes métodos produzem TILs que são capazes de ciclos de replicação aumentados na administração a um sujeito/paciente e como tal pode prover benefícios terapêuticos adicionais em relação aos TILs mais antigos (isto é, TILs que passaram ainda por mais rodadas de replicação antes da administração a um sujeito/paciente). Os traços de TILs mais jovens foram descritos na literatura, por exemplo 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), todas as quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

[00241] Como aqui debatido, a presente invenção pode incluir uma etapa que diz respeito à reestimulação de TILs criopreservados para aumentar a sua atividade metabólica e assim a saúde relativa antes do transplante em um paciente e métodos de testar a dita saúde metabólica. Como geralmente aqui resumido, os TILs são geralmente recolhidos de uma amostra do paciente e manipulados para expandir o seu número antes do transplante em um paciente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser opcionalmente geneticamente manipulados como debatido abaixo.

[00242] Em algumas modalidades, os TILs podem ser criopreservados. Uma vez descongelados, eles também podem ser reestimulados para aumentar o seu metabolismo antes da infusão em um paciente.

[00243] Em algumas modalidades, a primeira expansão (incluindo processos aludidos como o pré-REP) é encurtada em comparação com os métodos de expansão convencionais para 7 a 14 dias e a segunda expansão (incluindo processos aludidos como o REP) é encurtada para 7 a 14 dias, como debatido em detalhes abaixo assim como nos exemplos e figuras.

[00244] A FIG. 23 ilustra um processo 2A exemplar. Como ilustrado na FIG. 14 e ainda explicado em detalhes abaixo, em algumas modalidades, a primeira expansão (Etapa B) é encurtada para 11 dias e a segunda expansão (Etapa D) é encurtada para 11 dias. Em algumas modalidades, a combinação da primeira e segunda expansões (Etapa B e Etapa D) é encurtada para 22 dias, como aqui debatido. Como será avaliado, o processo ilustrado na FIG. 23 e descrito abaixo é exemplar e os métodos aqui descritos abrangem alterações e adições às etapas descritas assim como quaisquer combinações.

Uma modalidade exemplar deste processo é descrita no pedido PCT nº PCT/US2018/012633, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

ETAPA A: Amostra de tumor de paciente obtida

[00245] No geral, os TILs são inicialmente obtidos a partir de uma amostra de tumor de paciente (“TILs primários”) e depois expandidos em uma população maior para manipulação adicional como aqui descrita, opcionalmente criopreservados, reestimulados como aqui esboçado e opcionalmente avaliados quanto ao fenótipo e parâmetros metabólicos como uma indicação da saúde do TIL.

[00246] Uma amostra de tumor de paciente pode ser obtida usando métodos conhecidos na técnica, geralmente por intermédio de excisão cirúrgica, biópsia de agulha, aferese ou outro meio para a obtenção de uma amostra que contenha uma mistura de tumor e células de TIL. No geral, a amostra de tumor pode ser de qualquer tumor sólido, incluindo tumores primários, tumores invasivos ou tumores metastáticos. A amostra de tumor também pode ser um tumor líquido, tal como um tumor obtido de uma malignidade hematológica. O tumor sólido pode ser de qualquer tipo de câncer, incluindo, mas não limitados a mamário, pancreático, prostático, colorretal, pulmonar, cerebral, renal, estomacal e dérmico (incluindo, mas não limitados a carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal e melanoma). Em algumas modalidades, TILs úteis são obtidos de tumores de melanoma malignos, visto que estes foram relatados ter níveis particularmente altos de TILs. Em algumas modalidades, o tumor é maior do que cerca de 1,5 cm, porém menor do que cerca de 4 cm. Em algumas modalidades, o tumor é menor do que 4 cm.

[00247] Uma vez obtida, a amostra de tumor é geralmente fragmentada usando dissecação pronunciada em pedaços pequenos dentre 1 a cerca de 8 mm³, com cerca de 2 a 3 mm³ sendo particularmente úteis. Os TILs são

cultivados destes fragmentos usando digestões enzimáticas de tumor. Tais digestões de tumor podem ser produzidas pela incubação em meios enzimáticos (por exemplo, tampão 1640 do Roswell Park Memorial Institute (RPMI), 2 mM de glutamato, 10 mg/mL de gentamicina, 30 unidades/mL de DNase e 1,0 mg/mL de collagenase) seguidos pela dissociação mecânica (por exemplo, usando um dissociador de tecido). As digestões de tumor podem ser produzidas colocando-se o tumor em meio enzimático e dissociando mecanicamente o tumor durante aproximadamente 1 minuto, seguido pela incubação durante 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂, seguido pelos ciclos repetidos de dissociação mecânica e incubação sob as condições precedentes até que apenas pedaços de tecido pequenos estejam presentes. No final deste processo, se a suspensão celular contiver um grande número de células sanguíneas vermelhas ou células mortas, uma separação de gradiente de densidade usando polissacarídeo hidrofílico ramificado FICOLL pode ser realizada para remover estas células. Métodos alternativos conhecidos na técnica podem ser usados, tais como aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº 2012/0244133 A1, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. Qualquer um dos métodos precedentes pode ser usado em qualquer uma das modalidades aqui descritas para os métodos de expandir TILs ou métodos de tratar um câncer.

[00248] No geral, a suspensão de célula colhida é chamada de uma “população de célula primária” ou uma população de célula “recém colhida”.

[00249] Em uma modalidade, TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de digestões enzimáticas de tumor e fragmentos de tumor obtidos de pacientes.

[00250] Em algumas modalidades, os TILs, são obtidos de fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é obtido de dissecação pronunciada. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm³ e 10 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de

tumor está entre cerca de 1 mm³ e 8 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 1 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 2 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 3 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 4 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 5 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 6 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 7 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 8 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 9 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 10 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 8 a 27 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 10 a 25 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 15 a 25 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 8 a 20 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 15 a 20 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 8 a 15 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 8 a 10 mm³.

[00251] Em algumas modalidades, o número de fragmentos de tumor é de cerca de 40 a cerca de 50 fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, o número de fragmentos de tumor é de cerca de 40 fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, o número de fragmentos de tumor é de cerca de 50 fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, o tamanho do fragmento de tumor é de cerca de 8 a 27 mm³ e existem menos do que cerca de 50 fragmentos de tumor.

[00252] Em algumas modalidades, os TILs, são obtidos das digestões de tumor. Em algumas modalidades, as digestões de tumor foram geradas pela incubação no meio enzimático, por exemplo, mas não limitados a RPMI 1640, 2 mM de GlutaMAX, 10 mg/mL de gentamicina, 30 U/mL de DNase e 1,0

mg/mL de collagenase, seguida pela dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de colocar o tumor no meio enzimático, o tumor pode ser mecanicamente dissociado durante aproximadamente 1 minuto. A solução pode ser depois incubada durante 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂ e depois mecanicamente rompido mais uma vez durante aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado mais uma vez durante 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂, o tumor pode ser mecanicamente rompido uma terceira vez durante aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, depois do terceiro rompimento mecânico se pedaços grandes de tecido foram presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais foram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37°C em 5% de CO₂. Em algumas modalidades, no término da incubação final se a suspensão celular conteve um grande número de células sanguíneas vermelhas ou células mortas, uma separação de gradiente de densidade usando Ficoll pode ser realizada para remover estas células.

B. Etapa B: Primeira Expansão

[00253] Depois da dissecação ou digestão de fragmentos de tumor na Etapa A, as células resultantes são cultivadas no soro contendo IL-2 sob condições que favoreçam o crescimento de TILs em relação ao tumor e outras células. Em algumas modalidades, as digestões de tumor são incubadas em poços de 2 mL em meios compreendendo soro AB humano inativado com 6000 IU/mL de IL-2. Esta população de célula primária é cultivada durante um período de dias, geralmente de 3 a 14 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de cerca de 1×10^8 células TIL volumosas. Em algumas modalidades, esta população de célula primária é cultivada durante um período de 7 a 14 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de cerca de 1×10^8 células TIL volumosas. Em algumas modalidades, esta população de célula primária é cultivada durante um período de 10 a 14 dias, resultando em uma população de TIL volumosa,

geralmente de cerca de 1×10^8 células TIL volumosas. Em algumas modalidades, esta população de célula primária é cultivada durante um período de cerca de 11 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de cerca de 1×10^8 células TIL volumosas. Em algumas modalidades, esta população de célula primária é cultivada durante um período de cerca de 11 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de menos do que ou igual à cerca de 200×10^6 células TIL volumosas.

[00254] Em uma modalidade preferida, a expansão de TILs pode ser realizada usando uma etapa inicial de expansão de TIL volumosa (Etapa B como retratada na FIG. 23, que pode incluir processos aludidos como pré-REP) como descrita abaixo e aqui, seguida por uma segunda expansão (Etapa D, incluindo processos aludidos como etapas de protocolo de expansão rápida (REP)) como descritos abaixo sob a Etapa D e aqui, seguida pela criopreservação opcional e seguida por uma segunda Etapa D (incluindo processos aludidos como etapas de reestimulação de REP) como descrito abaixo e aqui. Os TILs obtidos a partir deste processo podem ser opcionalmente distinguidos quanto às características fenotípicas e parâmetros metabólicos como aqui descritos.

[00255] Em modalidades onde as culturas de TIL são iniciadas em placas de 24 poços, por exemplo, usando grupo de cultura de célula de 24 poços de fundo chato Costar (Corning Incorporated, Corning, NY, cada poço pode ser semeado com 1×10^6 células de tumor digeridas ou um fragmento de tumor em 2 mL de meio completo (CM) com IL-2 (6000 IU/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA). Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 10 mm^3 .

[00256] Em algumas modalidades, CM para a Etapa B consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com 10% de soro AB humano, 25 mM de HEPES e 10 mg/mL de gentamicina. Em modalidades onde as

culturas são iniciadas em frascos permeáveis a gás com uma capacidade de 40 mL e um fundo de silício permeável a gás de 10 cm² (por exemplo, G-Rex 10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Fig. 1), cada frasco foi carregado com 10 a 40 x 10⁶ células de tumor viáveis digeridas ou 5 a 30 fragmentos de tumor em 10 a 40 mL de CM com IL-2. Tanto o G-Rex 10 quanto as placas de 24 poços foram incubados em um incubador umidificado a 37°C em 5% de CO₂ e 5 dias depois do início da cultura, metade dos meios foram removidos e recolocados com CM fresco e IL-2 e depois do dia 5, metade dos meios foram trocados a cada 2 a 3 dias.

[00257] Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende ainda IL-2. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 3000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1000 IU/mL, cerca de 1500 IU/mL, cerca de 2000 IU/mL, cerca de 2500 IU/mL, cerca de 3000 IU/mL, cerca de 3500 IU/mL, cerca de 4000 IU/mL, cerca de 4500 IU/mL, cerca de 5000 IU/mL, cerca de 5500 IU/mL, cerca de 6000 IU/mL, cerca de 6500 IU/mL, cerca de 7000 IU/mL, cerca de 7500 IU/mL, ou cerca de 8000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende entre 1000 e 2000 IU/mL, entre 2000 e 3000 IU/mL, entre 3000 e 4000 IU/mL, entre 4000 e 5000 IU/mL, entre 5000 e 6000 IU/mL, entre 6000 e 7000 IU/mL, entre 7000 e 8000 IU/mL, ou entre 8000 IU/mL de IL-2.

[00258] Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão (incluindo processos aludidos como o pré-REP; Etapa B) é encurtado para 3 a 14 dias, como debatido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 7 a 14 dias, como debatido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4 e 5. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 10 a 14 dias, como debatido nos Exemplos. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 11 dias, como debatido nos Exemplos.

[00259] Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 assim como combinações das mesmas podem ser incluídas durante os processos da Etapa B como aqui descritos.

[00260] Em algumas modalidades, a Etapa B é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é utilizado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um único biorreator é utilizado. Em algumas modalidades, o único biorreator utilizado é por exemplo um GREX-10 ou um GREX-100.

C. Etapa C: Transição da Primeira Expansão para a Segunda Expansão

[00261] Em algumas modalidades, a população de TIL volumosa da Etapa B pode ser criopreservada imediatamente, usando métodos conhecidos na técnica e aqui descritos. Alternativamente, a população de TIL volumosa pode ser submetida a uma segunda expansão (REP) e depois criopreservada como debatido abaixo.

[00262] Em algumas modalidades, os TILs da Etapa B não são armazenados e os TILs da Etapa B procedem diretamente da Etapa D. Em algumas modalidades, a transição ocorre em um sistema fechado, como ainda aqui descrito.

D. Etapa D: Segunda Expansão

[00263] Em algumas modalidades, a população de célula TIL é expandido em número depois da colheita e processamento volumoso inicial (isto é, depois da Etapa A e Etapa B). Isto é aqui aludido como a segunda expansão, que pode incluir processos de expansão geralmente aludidos na técnica como um processo de expansão rápida (REP). A segunda expansão é geralmente realizada usando meios de cultura compreendendo vários componentes, incluindo células alimentadoras, uma fonte de citocina e um anticorpo anti-CD3, em um recipiente permeável a gás. Em algumas modalidades, a segunda expansão pode incluir ampliar de modo a aumentar o número de TILs obtidos na segunda expansão.

[00264] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão pode ser realizada em um recipiente permeável a gás usando os métodos da presente divulgação. Por exemplo, TILs podem ser rapidamente expandidos usando estimulação de receptor de célula T não específico na presença de interleucina-2 (IL-2) ou interleucina-15 (IL-15). O estímulo de receptor de célula T não específico pode incluir, por exemplo, cerca de 30 ng/ml de OKT3, um anticorpo monoclonal anti-CD3 de camundongo (comercialmente disponível da Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA). TILs podem ser rapidamente expandidos ainda mais na estimulação dos TILs *in vitro* com um ou mais antígenos, incluindo porções antigênicas dos mesmos, tal(is) como epítipo(s), do câncer, que pode(m) ser opcionalmente expressos a partir de um vetor, tal como um peptídeo de ligação a antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), por exemplo, 0,3 µM de MART-1:26-35 (27 L) ou gp100:209-217 (210M), opcionalmente na presença de um fator de crescimento de célula T, tal como 300 IU/mL de IL-2 ou IL-15. Outros antígenos adequados podem incluir, por exemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno canceroso da tirosinase, MAGE-A3, SSX-2 e VEGFR2, ou porções antigênicas dos mesmos. TIL também pode ser rapidamente expandido pela reestimulação com o(s) mesmo(s) antígeno(s) do câncer pulsado sobre células que apresentam antígeno expressando HLA-A2. Alternativamente, os TILs podem ser reestimulados ainda com, por exemplo, linfócitos irradiados, autólogos ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2.

[00265] Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende ainda IL-2. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 3000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1000 IU/mL, cerca de 1500 IU/mL, cerca de 2000 IU/mL, cerca de 2500 IU/mL, cerca de 3000 IU/mL, cerca de 3500 IU/mL, cerca de 4000 IU/mL, cerca de 4500 IU/mL, cerca de 5000 IU/mL, cerca de 5500 IU/mL, cerca de 6000 IU/mL, cerca de 6500 IU/mL,

cerca de 7000 IU/mL, cerca de 7500 IU/mL, ou cerca de 8000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende entre 1000 e 2000 IU/mL, entre 2000 e 3000 IU/mL, entre 3000 e 4000 IU/mL, entre 4000 e 5000 IU/mL, entre 5000 e 6000 IU/mL, entre 6000 e 7000 IU/mL, entre 7000 e 8000 IU/mL, ou entre 8000 IU/mL de IL-2.

[00266] Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende o anticorpo OKT3. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 30 ng/mL de anticorpo OKT3. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende cerca de 0,1 ng/mL, cerca de 0,5 ng/mL, cerca de 1 ng/mL, cerca de 2,5 ng/mL, cerca de 5 ng/mL, cerca de 7,5 ng/mL, cerca de 10 ng/mL, cerca de 15 ng/mL, cerca de 20 ng/mL, cerca de 25 ng/mL, cerca de 30 ng/mL, cerca de 35 ng/mL, cerca de 40 ng/mL, cerca de 50 ng/mL, cerca de 60 ng/mL, cerca de 70 ng/mL, cerca de 80 ng/mL, cerca de 90 ng/mL, cerca de 100 ng/mL, cerca de 200 ng/mL, cerca de 500 ng/mL e cerca de 1 µg/mL of OKT3 anticorpo. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende entre 0,1 ng/mL e 1 ng/mL, entre 1 ng/mL e 5 ng/mL, entre 5 ng/mL e 10 ng/mL, entre 10 ng/mL e 20 ng/mL, entre 20 ng/mL e 30 ng/mL, entre 30 ng/mL e 40 ng/mL, entre 40 ng/mL e 50 ng/mL e entre 50 ng/mL e 100 ng/mL de anticorpo OKT3.

[00267] Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 assim como combinações das mesmas podem ser incluídas durante a segunda expansão nos processos da Etapa D como aqui descritos.

[00268] Em algumas modalidades, a segunda expansão pode ser conduzida em um meio de cultura de célula suplementado compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras que apresentam antígeno.

[00269] Em algumas modalidades as células alimentadoras que apresentam antígeno (APCs) são PBMCs. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs e/ou células que apresentam antígeno na expansão rápida e/ou na segunda expansão é de cerca de 1 para 25, cerca de 1 para 50, cerca

de 1 para 100, cerca de 1 para 125, cerca de 1 para 150, cerca de 1 para 175, cerca de 1 para 200, cerca de 1 para 225, cerca de 1 para 250, cerca de 1 para 275, cerca de 1 para 300, cerca de 1 para 325, cerca de 1 para 350, cerca de 1 para 375, cerca de 1 para 400, ou cerca de 1 para 500. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 para 50 e 1 para 300. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 para 100 e 1 para 200.

[00270] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão são realizados em frascos com os TILs volumosos sendo misturados com um excesso de 100 ou 200 vezes de células alimentadoras inativadas, 30 mg/mL de anticorpo OKT3 anti-CD3 e 3000 IU/mL de IL-2 em 150 ml de meios. A substituição de meios é feita (geralmente substituição de 2/3 dos meios por intermédio de respiração com meios frescos) até que as células sejam transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. As câmaras de crescimento alternativas incluem frascos GRex e recipientes permeáveis a gás como mais completamente debatido abaixo.

[00271] Em algumas modalidades, a segunda expansão (também aludida como o processo REP) é encurtada para 7 a 14 dias, como debatido nos Exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a segunda expansão é encurtada para 11 dias.

[00272] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão podem ser realizados usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gás como previamente descrito (Tran, *et al.*, *J. Immunother.* **2008**, *31*, 742-51; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, *26*, 332-42) ou vidraria de cultura permeáveis a gás (frascos G-Rex). Para a expansão rápida de TIL e/ou segunda expansão em frascos T-175, 1×10^6 TILs colocados em suspensão em 150 mL de meios podem ser adicionados a cada frasco T-175. Os TILs podem ser cultivados em uma mistura 1 para 1 de meio CM e AIM-V, suplementado com 3000 IU por

mL de IL-2 e 30 ng por ml de anti-CD3. Os frascos T-175 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO₂. Metade dos meios pode ser trocada no dia 5 usando meio 50/50 com 3000 IU por mL de IL-2. No dia 7 as células de dois frascos T-175 podem ser combinadas em uma bolsa de 3 L e 300 mL de AIM V com 5% de soro AB humano e 3000 IU por mL de IL-2 foram adicionados aos 300 ml de suspensão de TIL. O número de células em cada bolsa foi contado a cada dia ou dois e meios frescos foram adicionados para manter a contagem de célula entre 0,5 e 2,0 x 10⁶ células/mL.

[00273] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão pode ser realizada em frascos permeáveis a gás de capacidade de 500 ml com fundos de silício permeáveis a gás de 100 cm (G-Rex 100, comercialmente disponível da Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), 5 x 10⁶ ou 10 x 10⁶ TILs podem ser cultivados com PBMCs em 400 mL de meio 50/50, suplementado com 5% de soro AB humano, 3000 IU por mL de IL-2 e 30 ng por ml de anti-CD3 (OKT3). Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO₂. No dia 5, 250 mL de sobrenadante pode ser removido e colocado em garrafas de centrifuga e centrifugados a 1500 rpm (491 x g) durante 10 minutos. As pelotas de TIL podem ser recolocadas em suspensão com 150 mL de meio fresco com 5% de soro AB humano, 3000 IU por mL de IL-2 e adicionados de volta para os frascos G-Rex 100 originais. Quando TILs são expandidos em série em frascos G-Rex 100, no dia 7 os TILs em cada G-Rex 100 podem ser colocados em suspensão nos 300 mL de meios presentes em cada frasco e a suspensão celular pode ser dividida em 3 alíquotas de 100 mL que podem ser usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Depois 150 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU por mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO₂ e depois de 4 dias 150 mL de AIM-V com 3000 IU por mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco G-Rex 100. As células podem ser colhidas no dia

14 de cultura.

[00274] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão são realizados em frascos com os TILs volumosos sendo misturados com um excesso de 100 ou 200 vezes de células alimentadoras inativadas, 30 mg/mL de anticorpo de OKT3 anti-CD3 e 3000 IU/mL de IL-2 em 150 ml de meios. A substituição de meios é feita (geralmente substituição de 2/3 dos meios por intermédio de respiração com meios frescos) até que as células fossem transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. As câmaras de crescimento alternativas incluem frascos GRex e recipientes permeáveis a gás como mais completamente debatido abaixo.

[00275] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão são realizadas e compreendem ainda uma etapa em que TILs são selecionados quanto à reatividade de tumor mais alta. Qualquer método de seleção conhecido na técnica pode ser usado. Por exemplo, os métodos descritos na Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº 2016/0010058 A1, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência, podem ser usados para a seleção de TILs quanto à reatividade de tumor mais alta.

[00276] REP e/ou a segunda expansão de TIL podem ser realizados usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gás como anteriormente descritos (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) ou frascos G-Rex permeáveis a gás. Em algumas modalidades, REP e/ou a segunda expansão são realizados usando frascos. Em algumas modalidades, REP é realizado usando frascos G-Rex permeáveis a gás. Para TIL REP e/ou a segunda expansão em frascos T-175, cerca de 1×10^6 TIL são colocados em suspensão em cerca de 150 mL de meios e isto é adicionado a cada frasco T-175. Os TILs são cultivados com PBMC alogênicas irradiadas (50 Gy) como células “alimentadoras” em uma razão de 1 para 100 e as células foram cultivadas em uma mistura 1 para 1 de meio CM e AIM-V (meio 50/50),

suplementado com 3000 IU/mL de IL-2 e 30 ng/mL de anti-CD3. Os frascos T-175 são incubados a 37°C em 5% de CO₂. Em algumas modalidades, metade dos meios é trocada no dia 5 usando meio 50/50 com 3000 IU/mL de IL-2. Em algumas modalidades, no dia 7, as células de 2 frascos T-175 são combinadas em uma bolsa de 3 L e 300 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU/mL de IL-2 são adicionados aos 300 mL de suspensão de TIL. O número de células em cada bolsa pode ser contado a cada dia ou dois e meios frescos podem ser adicionados para manter a contagem de célula entre cerca de 0,5 e cerca de 2,0 x 10⁶ células/mL.

[00277] Para REP e/ou a segunda expansão de TIL em frascos com capacidade de 500 mL com fundos de silício permeáveis a gás de 100 cm² (G-Rex 100, Wilson Wolf), cerca de 5 x 10⁶ ou 10x 10⁶ TILs são cultivados com PBMC alogênica irradiada em uma razão de 1 para 100 em 400 mL de meio 50/50, suplementados com 3000 IU/mL de IL-2 e 30 ng/ mL de anti-CD3. Os frascos G-Rex 100 são incubados a 37°C em 5% de CO₂. Em algumas modalidades, no dia 5, 250 mL de sobrenadante são removidos e colocados em garrafas de centrífuga e centrifugadas a 1500 rpm (491g) durante 10 minutos. Os grânulos de TIL podem ser depois recolocados em suspensão com 150 mL de meio fresco 50/50 com 3000 IU/ mL de IL-2 e adicionados de volta para os frascos G-Rex 100 originais. Em modalidades onde TILs são expandidos em série nos frascos G-Rex 100, no dia 7 os TILs em cada G-Rex 100 são colocados em suspensão nos 300 mL de meios presentes em cada frasco e a suspensão celular foi dividida em três alíquotas de 100 mL que são usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Depois 150 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU/mL de IL-2 são adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 são incubados a 37°C em 5% de CO₂ e depois de 4 dias 150 mL de AIM-V com 3000 IU/mL de IL-2 são adicionados a cada frasco G-Rex 100. As células são colhidas no dia 14 da cultura.

1. Células Alimentadoras e Células Apresentadoras de Antígeno

[00278] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descritos (Etapa D, incluindo REP) requerem um excesso de células alimentadoras durante a expansão REP e/ou durante a segunda expansão de TIL. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de unidades de sangue integral padrão de doadores de sangue saudáveis. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como a separação de gradiente de Ficoll-Paque.

[00279] No geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por intermédio de irradiação ou tratamento térmico e usadas nos procedimentos REP, como descrito nos exemplos, em particular no exemplo 14, que provê um protocolo exemplar para avaliar a incompetência de replicação das PBMCs alogênicas irradiadas.

[00280] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes de replicação e aceitas para o uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis no dia 14 for menor do que o número de célula viável inicial colocado em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (isto é, no dia de início da segunda expansão).

[00281] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes de replicação e aceitas para o uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e dia 14 não aumentaram do número de célula viável inicial colocado em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (isto é, o dia de início da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 ng/ml de anticorpo de OKT3 e 3000 IU/ml de IL-2.

[00282] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes de replicação e aceitas para o uso nos procedimentos de

expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e dia 14 não aumentaram do número de célula viável inicial colocado em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (isto é, no dia de início da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 5 a 60 ng/ml de anticorpo de OKT3 e 1000 a 6000 IU/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 10 a 50 ng/ml de anticorpo de OKT3 e 2000 a 5000 IU/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 20 a 40 ng/ml de anticorpo de OKT3 e 2000 a 4000 IU/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 25 a 35 ng/ml de anticorpo de OKT3 e 2500 a 3500 IU/ml de IL-2.

[00283] Em uma modalidade, as células artificiais que apresentam antígeno são usadas no estágio de REP como uma substituição no lugar, ou em combinação com PBMCs.

2. Citocinas

[00284] Os métodos de expansão aqui descritos geralmente usam meios de cultura com altas doses de uma citocina, em particular IL-2, como é conhecido na técnica.

[00285] Alternativamente, usar combinações de citocinas para a expansão rápida e ou segunda expansão de TILs é adicionalmente possível, com combinações de duas ou mais de IL-2, IL-15 e IL-21 como é geralmente resumido na Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2017/0107490 A1, Publicação Internacional nº WO 2015/189356, Publicação do Pedido de Patente norte-americano nº US 2017/0107490 e Publicação Internacional nº WO 2015/189357, cada uma das quais é por meio deste expressamente incorporadas por referência em suas totalidades. Assim, as combinações possíveis incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, com o uso particular verificado por último em muitas

modalidades. O uso de combinações de citocinas especificamente favorece a geração de linfócitos e em particular células T como aqui descrito.

3. Anticorpos Anti-CD3

[00286] Em algumas modalidades, os meios de cultura usados nos métodos de expansão aqui descritos (incluindo REP) também incluem um anticorpo anti-CD3. Um anticorpo anti-CD3 em combinação com IL-2 induz a ativação de célula T e a divisão de célula na população de TIL. Este efeito pode ser observado com anticorpos de tamanho natural assim como fragmentos Fab e F(ab')₂, com o primeiro sendo geralmente preferido; ver, por exemplo, Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985**, 135, 1719, incorporada a este por referência em sua totalidade.

[00287] Como será avaliado por aqueles na técnica, existem vários anticorpos anti-CD3 humanos adequados que encontram uso na invenção, incluindo anticorpos policlonais e monoclonais anti-CD3 humano de vários mamíferos, incluindo, mas não limitados a anticorpos de murino, ser humano, primatas, rato e caninos. Em modalidades particulares, o anticorpo de OKT3 anti-CD3 é usado (comercialmente disponível da Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

E. Etapa E: Colher TILs

[00288] Depois da segunda etapa de expansão, as células podem ser colhidas. Em algumas modalidades os TILs são colhidos depois de um, dois, três, quatro ou mais segundas etapas de expansão.

[00289] Os TILs podem ser colhidos em qualquer maneira apropriada e estéril, incluindo por exemplo pela centrifugação. Os métodos para colheita de TIL são bem conhecidos na técnica e qualquer um de tais métodos pode ser utilizado com o presente processo. Em algumas modalidades, TILs são colhidos usando um sistema automatizado. Em algumas modalidades, TILs são colhidos usando um sistema semiautomatizado. Em algumas modalidades, TILs são colhidos usando um sistema semiautomatizado. Em algumas

modalidades, os TILs da segunda expansão são colhidos usando uma máquina semiautomatizada. Em algumas modalidades, o sistema LOVO é utilizado (comercialmente disponível da Benchmark Electronics, por exemplo). Em algumas modalidades, a etapa de colheita inclui lavar os TILs, formular os TILs, e/ou aliquotar os TILs. Em algumas modalidades, as células são opcionalmente congeladas depois de colher ou como parte da colheita.

F. Etapa F: Formulação Final/Transferência para Bolsa de Infusão

[00290] Depois que as Etapas A até E são completas, as células são transferidas a um recipiente para o uso na administração a um paciente.

[00291] Em uma modalidade, TILs expandidos usando APCs da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. TILs expandidos usando PBMCs da presente divulgação podem ser administrados por qualquer por intermédio de adequada como conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas como uma única infusão intra-arterial ou intravenosa, que preferivelmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

G. Etapas de Expansão Adicionais

[00292] Como será avaliado, qualquer uma das etapas A até F descritas acima pode ser repetida qualquer número de vezes e pode além disso ser conduzida em ordens diferentes do que descritas acima.

[00293] Em algumas modalidades, uma ou mais das etapas de expansão podem ser repetidas antes da Etapa F da Formulação Final. Tais etapas de expansão adicionais podem incluir os elementos da primeira e/ou segunda etapas de expansão descritas acima (por exemplo, incluem os componentes descritos no meio de cultura de célula). As etapas de expansão adicionais podem incluir ainda elementos adicionais, incluindo componentes adicionais no meio de cultura de célula que são suplementados no meio de

cultura de célula antes e/ou durante as etapas de expansão adicionais.

[00294] Em outras modalidades, qualquer uma das etapas de expansão descritas na FIG. 14 e nos parágrafos acima pode ser precedida ou seguida por uma etapa de criopreservação em que as células produzidas durante uma etapa de expansão são preservadas usando métodos conhecidos na técnica para a armazenagem até necessário para as etapas remanescentes do processo de fabricação/expansão.

Composições Farmacêuticas, Dosagens e Regimes de Dosagem para TILs, MILs e PBLs

[00295] Em uma modalidade, TILs expandidos usando métodos da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. Os TILs expandidos usando métodos da presente divulgação podem ser administrados por qualquer por intermédio de adequada como conhecido na técnica. Preferivelmente, os TILs são administrados como uma infusão única intra-arterial ou intravenosa, que preferivelmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem a administração intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[00296] Qualquer dose adequada de TILs pode ser administrada. Preferivelmente, de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$ TILs são administrados, com uma média em torno de $7,8 \times 10^{10}$ TILs, particularmente se o câncer for uma malignidade hematológica. Em uma modalidade, cerca de $1,2 \times 10^{10}$ a cerca de $4,3 \times 10^{10}$ de TILs são administrados.

[00297] Em algumas modalidades, o número dos TILs provido nas composições farmacêuticas da invenção é de cerca de 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , $3 \times$

10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} e 9×10^{13} . Em uma modalidade, o número dos TILs provido nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de 1×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9 a 5×10^9 , 5×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^{10} a 5×10^{10} , 5×10^{10} a 1×10^{11} , 5×10^{11} a 1×10^{12} , 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13} . Em uma modalidade da invenção, o número de TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 4×10^8 a cerca de $2,5 \times 10^9$. Em uma outra modalidade, o número de TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção é $9,5 \times 10^8$. Em uma outra modalidade, o número de TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção é $4,1 \times 10^8$. Em uma outra modalidade, o número de TILs provido nas composições farmacêuticas da invenção é de $2,2 \times 10^9$.

[00298] Em uma modalidade da invenção, o número de TILs provido nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de $0,1 \times 10^9$ a cerca de 15×10^9 TILs, de cerca de $0,1 \times 10^9$ a cerca de 15×10^9 TILs, de cerca de $0,12 \times 10^9$ a cerca de 12×10^9 TILs, de cerca de $0,15 \times 10^9$ a cerca de 11×10^9 TILs, de cerca de $0,2 \times 10^9$ a cerca de 10×10^9 TILs, de cerca de $0,3 \times 10^9$ a cerca de 9×10^9 TILs, de cerca de $0,4 \times 10^9$ a cerca de 8×10^9 TILs, de cerca de $0,5 \times 10^9$ a cerca de 7×10^9 TILs, de cerca de $0,6 \times 10^9$ a cerca de 6×10^9 TILs, de cerca de $0,7 \times 10^9$ a cerca de 5×10^9 TILs, de cerca de $0,8 \times 10^9$ a cerca de 4×10^9 TILs, de cerca de $0,9 \times 10^9$ a cerca de 3×10^9 TILs, ou de cerca de 1×10^9 a cerca de 2×10^9 TILs.

[00299] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção é menor do que, por exemplo, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%,

15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00300] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção é maior do que 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% p/p, p/v, ou v/v da composição farmacêutica.

[00301] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,0001% a cerca de 50%, cerca de 0,001% a cerca de 40%, cerca de 0,01% a cerca de 30%, cerca de 0,02% a cerca de 29%, cerca de 0,03% a cerca de 28%, cerca de 0,04% a cerca de 27%, cerca de 0,05% a cerca de 26%, cerca de 0,06% a cerca de 25%, cerca de 0,07% a cerca de 24%, cerca de 0,08% a cerca de 23%, cerca de 0,09% a cerca de 22%, cerca de 0,1% a cerca de 21%, cerca de 0,2% a cerca de 20%, cerca de 0,3% a cerca de 19%, cerca de 0,4% a

cerca de 18%, cerca de 0,5% a cerca de 17%, cerca de 0,5% a cerca de 16%, cerca de 0,7% a cerca de 15%, cerca de 0,8% a cerca de 14%, cerca de 0,9% a cerca de 12% ou cerca de 1% a cerca de 10% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00302] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,001% a cerca de 10%, cerca de 0,01% a cerca de 5%, cerca de 0,02% a cerca de 4,5%, cerca de 0,03% a cerca de 4%, cerca de 0,04% a cerca de 3,5%, cerca de 0,05% a cerca de 3%, cerca de 0,06% a cerca de 2,5%, cerca de 0,07% a cerca de 2%, cerca de 0,08% a cerca de 1,5%, cerca de 0,09% a cerca de 1%, cerca de 0,1% a cerca de 0,9% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00303] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção é igual a ou menor do que 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,55 g, 0,5 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, ou 0,0001 g.

[00304] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção é maior do que 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, 0,5 g, 0,55 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, ou 10 g.

[00305] Os TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção são eficazes em uma ampla faixa de dosagem. A dosagem exata dependerá da por intermédio de administração, da forma na qual o composto é administrado, do gênero e idade do sujeito a ser tratado, do peso corporal do sujeito a ser tratado e da preferência e experiência do médico atendente. As dosagens clinicamente estabelecidas dos TILs também podem ser usadas se apropriado. As quantidades das composições farmacêuticas administradas usando os métodos aqui, tais como as dosagens de TILs, serão dependentes do ser humano ou mamífero que é tratado, da severidade do distúrbio ou condição, da taxa de administração, da disposição dos ingredientes farmacêuticos ativos e do julgamento do médico prescrevente.

[00306] Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser pela injeção, por exemplo, injeção intravenosa. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em doses múltiplas. A dosagem pode ser uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, ou mais do que seis vezes por ano. A dosagem pode ser uma vez ao mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana, ou uma vez a cada segundo dia. A administração de TILs pode continuar enquanto necessários.

[00307] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs é de cerca de 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , $7 \times$

10^{13} , 8×10^{13} e 9×10^{13} . Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de 1×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9 a 5×10^9 , 5×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^{10} a 5×10^{10} , 5×10^{10} a 1×10^{11} , 5×10^{11} a 1×10^{12} , 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13} .

[00308] Em uma modalidade da invenção, a dose clínica de MILs útil para os pacientes com leucemia mieloide aguda (AML) está na faixa de cerca de 4×10^8 a cerca de $2,5 \times 10^9$ MILs. Em uma outra modalidade, o número de MILs providos nas composições farmacêuticas da invenção é de $9,5 \times 10^8$ MILs. Em uma outra modalidade, o número de MILs provido nas composições farmacêuticas da invenção é $4,1 \times 10^8$. Em uma outra modalidade, o número de MILs provido nas composições farmacêuticas da invenção é de $2,2 \times 10^9$.

[00309] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 4,3 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 3,5 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3,2 mg/kg, cerca de 0,35 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,3 mg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 1,3 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 1,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1 mg/kg, cerca de 0,55 mg/kg a cerca de 0,85 mg/kg, cerca de 0,55 mg/kg a cerca de 0,8 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 0,75 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,85 mg/kg a cerca de 2 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 1,85 mg/kg, cerca de 1,15 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 1,3 mg/kg mg a cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 1,35 mg/kg a cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2,15 mg/kg a cerca de 3,5 mg/kg, cerca de 2,3 mg/kg a cerca de 3,4 mg/kg, cerca de 2,4 mg/kg a cerca de 3,3 mg/kg, cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 3,15 mg/kg, cerca de 2,7 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, cerca de 2,8 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, ou cerca de 2,85 mg/kg a cerca de 2,95 mg/kg.

[00310] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg, cerca de 10 mg a cerca de 300 mg, cerca de 20 mg a cerca de 250 mg, cerca de 25 mg a cerca de 200 mg, cerca de 1 mg a cerca de 50 mg, cerca de 5 mg a cerca de 45 mg, cerca de 10 mg a cerca de 40 mg, cerca de 15 mg a cerca de 35 mg, cerca de 20 mg a cerca de 30 mg, cerca de 23 mg a cerca de 28 mg, cerca de 50 mg a cerca de 150 mg, cerca de 60 mg a cerca de 140 mg, cerca de 70 mg a cerca de 130 mg, cerca de 80 mg a cerca de 120 mg, cerca de 90 mg a cerca de 110 mg, ou cerca de 95 mg a cerca de 105 mg, cerca de 98 mg a cerca de 102 mg, cerca de 150 mg a cerca de 250 mg, cerca de 160 mg a cerca de 240 mg, cerca de 170 mg a cerca de 230 mg, cerca de 180 mg a cerca de 220 mg, cerca de 190 mg a cerca de 210 mg, cerca de 195 mg a cerca de 205 mg, ou cerca de 198 a cerca de 207 mg.

[00311] Uma quantidade eficaz dos TILs pode ser administrada em doses únicas ou múltiplas por qualquer um dos modos aceitos de administração de agentes tendo utilidades similares, incluindo as vias intranasais e transdérmicas, pela injeção intra-arterial, intravenosamente, intraperitonealmente, parenteralmente, intramuscularmente, subcutaneamente, topicamente, pelo transplante ou injeção direta dentro do tumor, ou pela inalação.

Métodos de tratar cânceres

[00312] As composições e combinações de TILs, PBLs e/ou MILs (e populações dos mesmos) descritas acima podem ser usadas em um método para tratar distúrbios hiperproliferativos. Em uma modalidade preferida, elas são para o uso no tratamento de cânceres. Em uma modalidade preferida, a invenção provê um método para tratar um câncer, em que o câncer é uma malignidade hematológica, tal como um tumor líquido. Em uma modalidade preferida, a invenção provê um método para tratar um câncer, em que o câncer é uma malignidade hematológica selecionada do grupo consistindo em

leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

[00313] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar um câncer, em que o câncer é uma malignidade hematológica que responde à terapia com inibidores de PD-1 e/ou PD-L1 incluindo pembrolizumab, nivolumab, durvalumab, avelumab ou atezolizumab.

[00314] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar um câncer com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) compreendendo as etapas de:

(a) obter um tumor de um paciente pela resseção, biópsia, aspiração com agulha, ou aferese, o tumor compreendendo uma primeira população de TILs;

(b) opcionalmente fragmentar ou dissociar o tumor para obter fragmentos de tumor e contatar os fragmentos de tumor com um primeiro meio de cultura de células;

(c) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2;

(d) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas; e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(e) colher a terceira população de TILs; e

(f) administrar uma porção terapeuticamente eficaz of a terceira população de TILs a um paciente com o câncer;

em que o tumor é um tumor líquido e em que o câncer é uma malignidade hematológica.

[00315] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar um câncer com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) compreendendo as etapas de:

(a) obter um tumor de um paciente pela resseção, biópsia, aspiração com agulha, ou aferese, o tumor compreendendo uma primeira população de TILs;

(b) opcionalmente fragmentar ou dissociar o tumor para obter fragmentos de tumor e contatar os fragmentos de tumor com um primeiro meio de cultura de células;

(c) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2;

(d) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira

população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas; e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(e) colher a terceira população de TILs; e

(f) administrar uma porção terapeuticamente eficaz of a terceira população de TILs a um paciente com o câncer;

em que o tumor é um tumor líquido e em que o câncer é uma malignidade hematológica selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

[00316] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar um câncer com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) compreendendo as etapas de:

(a) pré-tratar um paciente com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK;

(b) obter um tumor de um paciente pela resseção, biópsia, aspiração com agulha, ou aferese, o tumor compreendendo uma primeira

população de TILs;

(c) opcionalmente fragmentar ou dissociar o tumor para obter fragmentos de tumor e contatar os fragmentos de tumor com um primeiro meio de cultura de células;

(d) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2;

(e) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas; e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(f) colher a terceira população de TILs; e

(g) administrar uma porção terapêuticamente eficaz of a terceira população de TILs a um paciente com o câncer;

em que o tumor é um tumor líquido e em que o câncer é uma malignidade hematológica.

[00317] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar um câncer com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) compreendendo as etapas de:

(a) pré-tratar um paciente com um regime compreendendo um inibidor da cinase ou um inibidor de ITK;

(b) obter um tumor de um paciente pela resseção, biópsia, aspiração com agulha, ou aferese, o tumor compreendendo uma primeira

população de TILs;

(c) opcionalmente fragmentar ou dissociar o tumor para obter fragmentos de tumor e contatar os fragmentos de tumor com um primeiro meio de cultura de células;

(d) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2;

(e) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas; e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(f) colher a terceira população de TILs; e

(g) administrar uma porção terapêuticamente eficaz of a terceira população de TILs a um paciente com o câncer;

em que o tumor é um tumor líquido e em que o câncer é uma malignidade hematológica selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo,

síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

[00318] Em uma modalidade da invenção, TILs são expandidos usando Método MIL 1 e administrados a um paciente de acordo com a presente invenção.

[00319] Em uma modalidade da invenção, TILs são expandidos usando Método MIL 2 e administrados a um paciente de acordo com a presente invenção para tratar câncer.

[00320] Em uma modalidade da invenção, TILs são expandidos usando Método MIL 3 e administrados a um paciente de acordo com a presente invenção para tratar câncer.

[00321] Em uma modalidade da invenção, TILs expandidos usando Método MIL 1, Método MIL 2, ou Método MIL 3 são administrados a um paciente de acordo com a presente invenção para tratar AML.

[00322] Em uma modalidade da invenção, TILs são expandidos usando Método PBL 2 e administrados a um paciente de acordo com a presente invenção para tratar câncer.

[00323] Em uma modalidade da invenção, TILs são expandidos usando Método PBL 2 e administrados a um paciente de acordo com a presente invenção para tratar câncer.

[00324] Em uma modalidade da invenção, TILs são expandidos usando Método PBL 2 e administrados a um paciente de acordo com a presente invenção para tratar câncer.

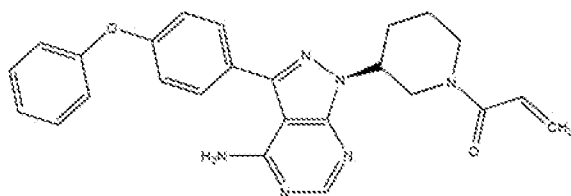
[00325] Em uma modalidade da invenção, TILs expandidos usando Método PBL 1, Método PBL 2, ou Método PBL 3 são administrados a um paciente de acordo com a presente invenção para tratar CLL.

[00326] Em qualquer uma das modalidades precedentes da invenção,

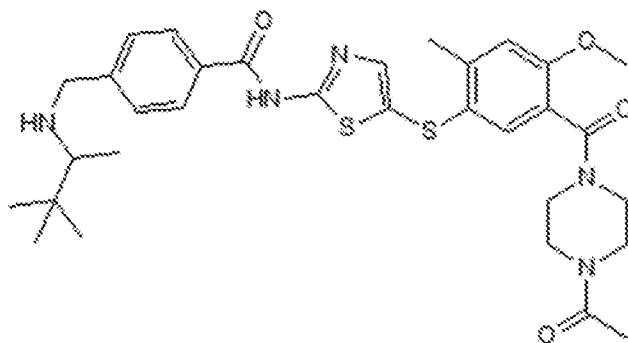
pré-tratamento com um inibidor da cinase é descrito. Em uma modalidade, o inibidor da cinase é selecionada do grupo consistindo em imatinib, dasatinib, ibrutinib, bosutinib, nilotinib, erlotinib, ou outro inibidor das cinases, inibidor das tirosinas cinases, ou inibidor das serina/treonina cinases conhecidos na técnica. Em uma modalidade, os regimes de pré-tratamento regimes com um inibidor da cinase são como conhecidos na técnica e/ou como prescritos por um médico.

[00327] Em qualquer uma das modalidades precedentes da invenção, o pré-tratamento com um inibidor da cinase de célula T indutível por IL-2 (ITK) é descrito. A cinase de célula T indutível pela Interleucina-2 (ITK) é uma tirosina cinase não receptora expressa nas células T e regula vários caminhos. Qualquer inibidor de ITK conhecido na técnica pode ser usado em modalidades da presente invenção (ver, por exemplo, Lo, *et al.*, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 20: 459-469 (2010); Vargas, *et al.*, Scandinavian Journal of Immunology, 78(2): 130-139 (2013); WO2015112847; WO2016118951; WO2007136790, US20120058984A1 e Patentes norte-americanas nº 9.531.689 e 9.695.200; todas das quais são aqui incorporadas por referência em sua totalidade). Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é um inibidor de ITK covalente que se liga covalentemente e irreversivelmente ao ITK. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é um inibidor de ITK alostérico que se liga ao ITK. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em inibidores de ITK com base em aminotiazol, 5-aminometilbenzimidazóis, inibidores de ITK com base em 3-Aminopirid-2-onas, inibidores de ITK com base em (4 ou 5-aryl)pirazolil-indol, inibidores de ITK com base em benzimidazol, inibidores de ITK com base em aminobenzimidazol, inibidores de ITK com base em aminopirimidina, inibidores de ITK com base em aminopiridina, inibidores de ITK com base em diazodiazina, inibidores de ITK com base em triazol, inibidores de ITK

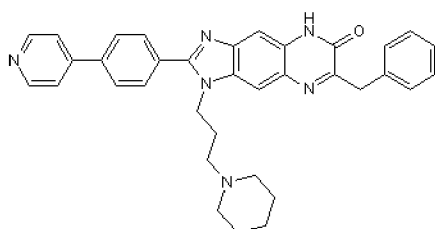
com base em 3-aminopiridi-2-onas, inibidores de ITK com base em indolilindazol, inibidores de ITK com base em indol, inibidores de ITK com base em aza-indol, inibidores com base em pirazolil-indol, inibidores de ITK com base em tienopirazol, inibidores de ITK heterocíclicos e inibidores de ITK alvejando cisteína-442 na bolsa de ATP (tal como ibrutinib), inibidores de ITK com base em aza-benzimidazol, inibidores de ITK com base em benzotiazol, inibidores de ITK com base em indol, inibidores de ITK com base em piridona, inibidores de ITK com base em pirimidina substituída com sulfoximina, inibidores de ITK com base em arilpiridinona e quaisquer outros inibidores de ITK conhecidos na técnica. Em uma modalidade da invenção, os regimes de pré-tratamento com um inibidor de ITK são como conhecidos na técnica e/ou como prescritos por um médico. Em uma modalidade da invenção, o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em:



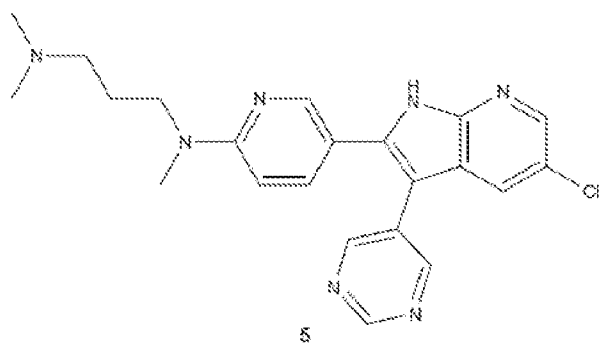
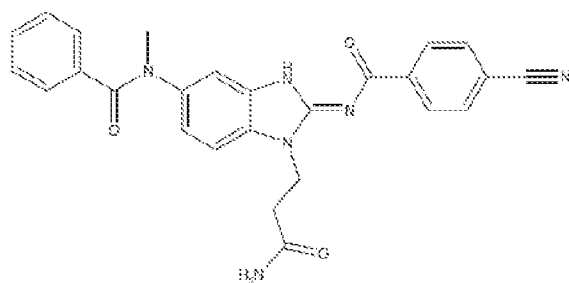
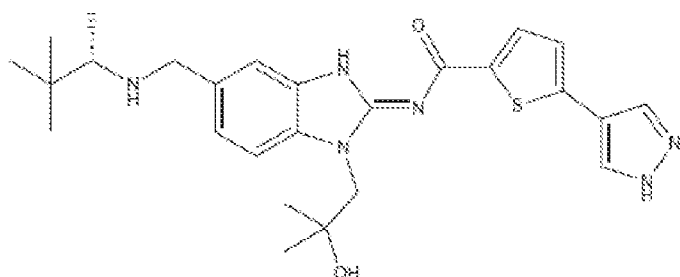
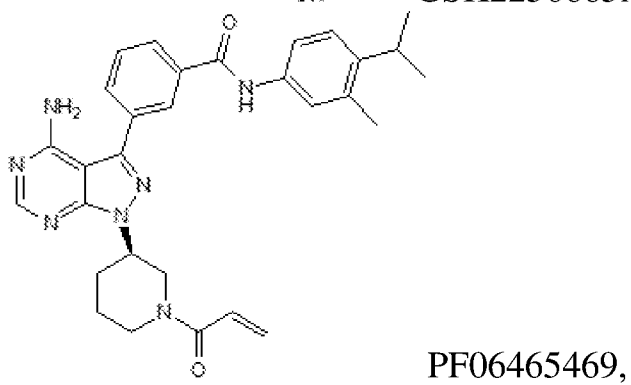
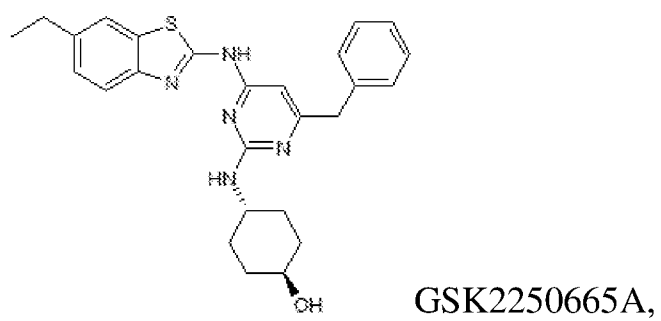
ibrutinib,

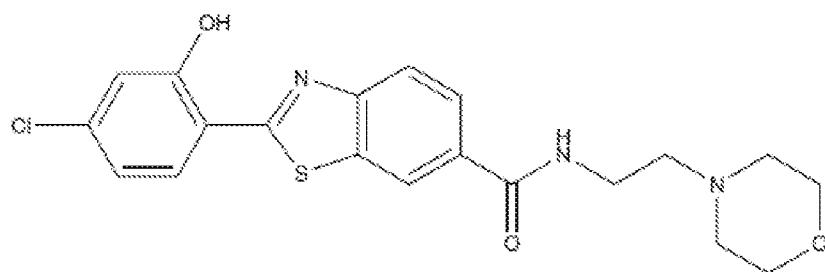
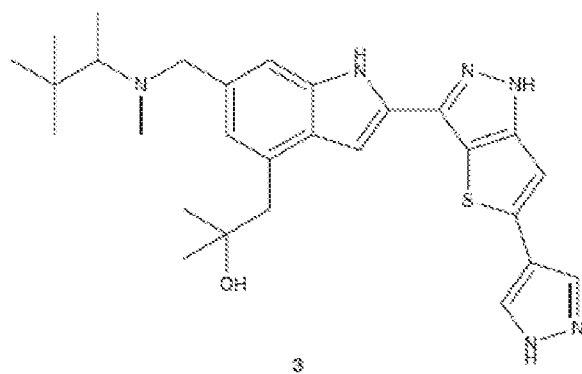
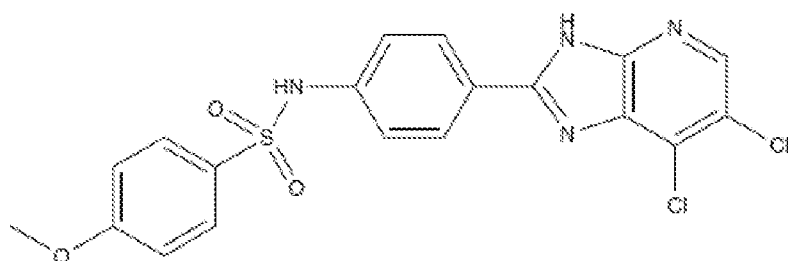
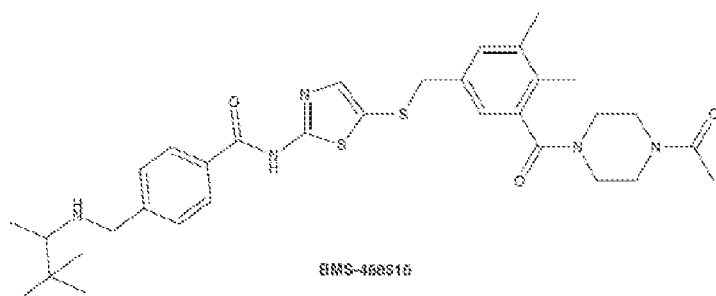
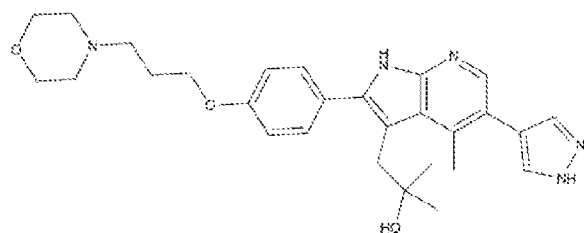


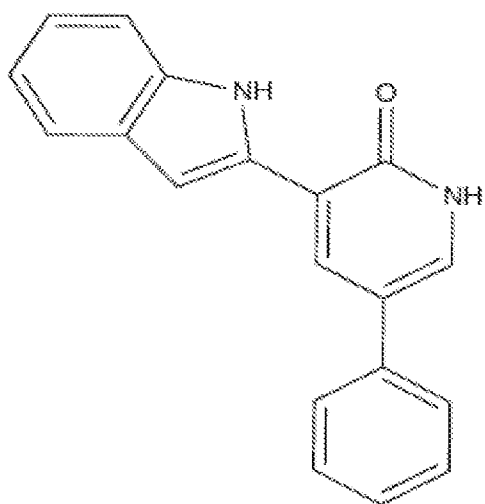
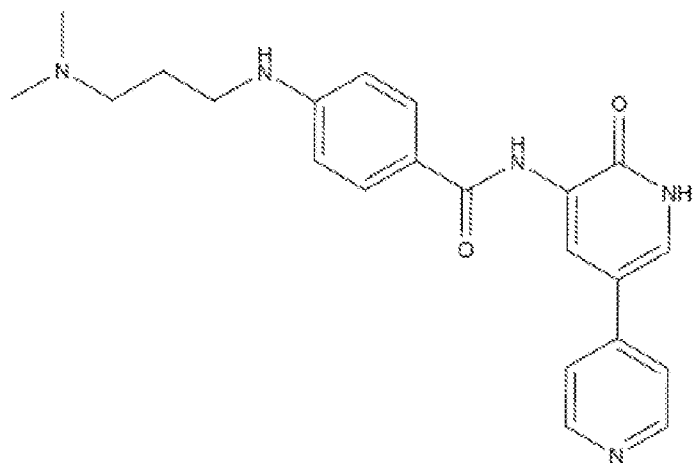
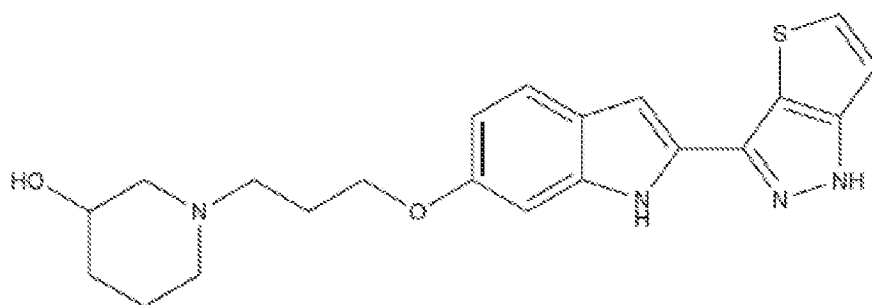
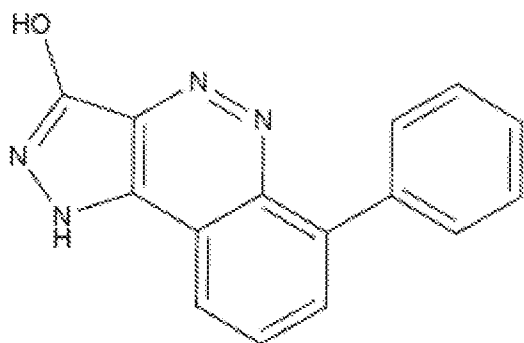
BMS509744,

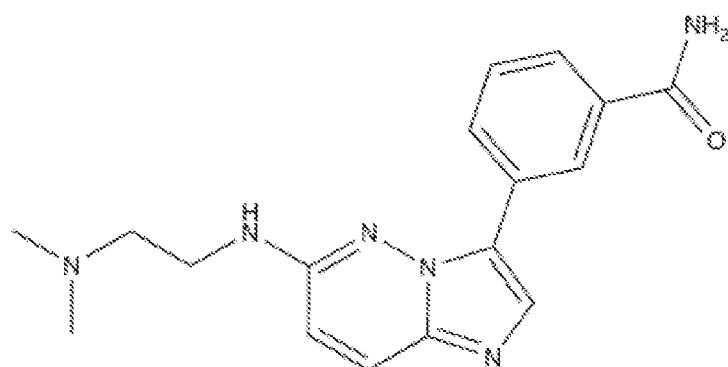
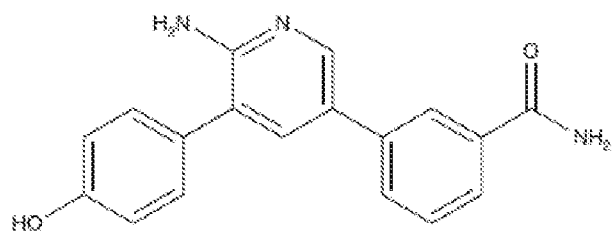
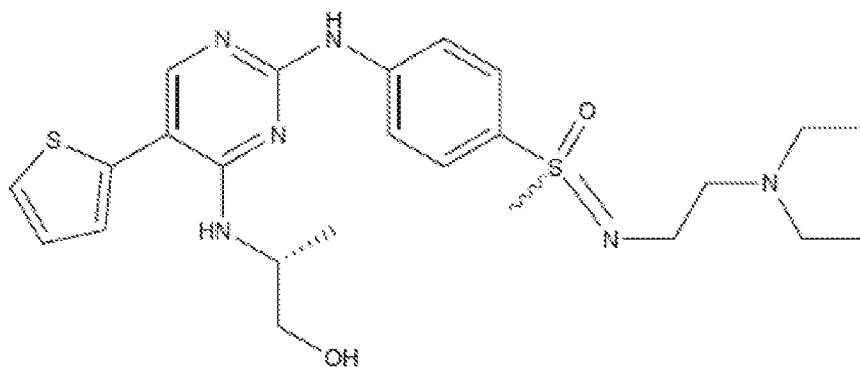
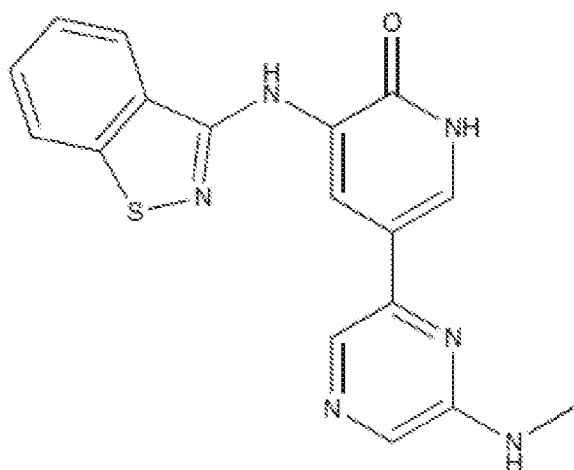


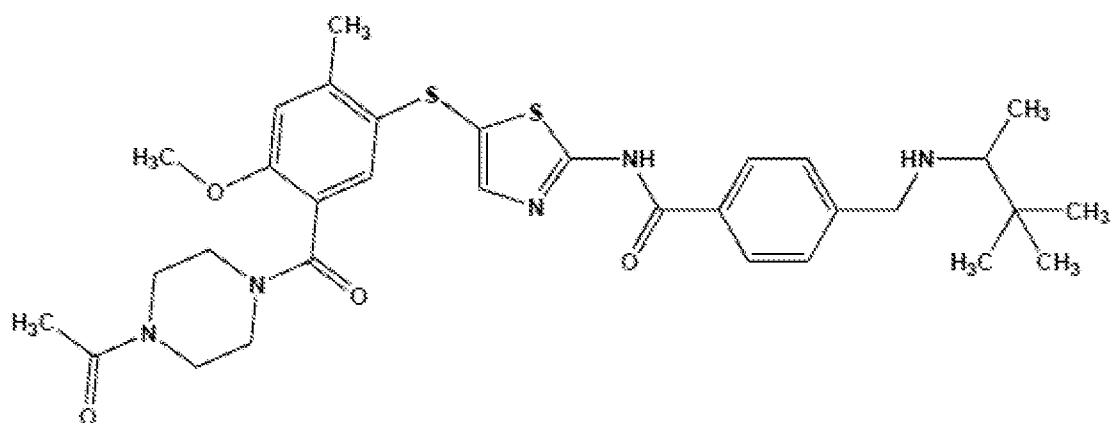
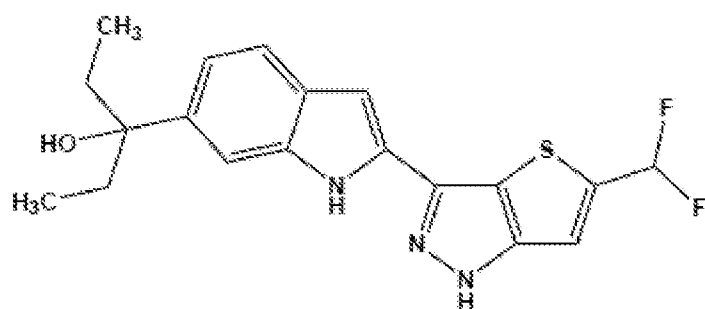
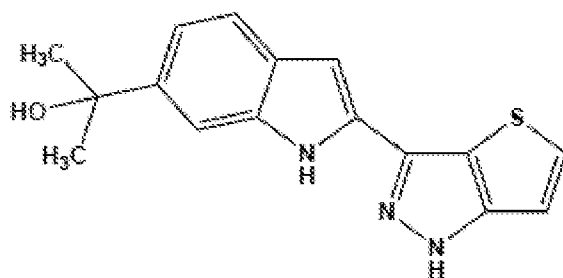
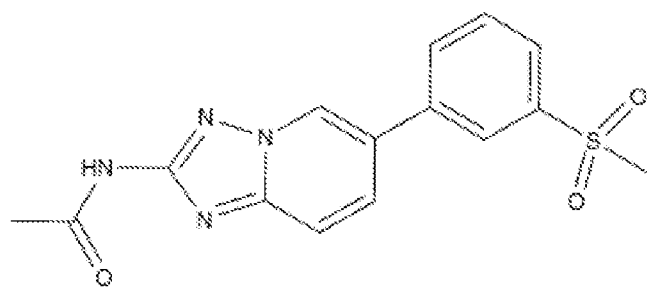
CTA056,











(Boehringer Ingelheim de Moriarty, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett, 18: 5537–40 (2008)), Composto 19 (Boehringer Ingelheim de Moriarty, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 18: 5537–40 (2008)), Composto 27 (Boehringer Ingelheim de Moriarty, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 18: 5537–40 (2008)), Composto 26 (Boehringer Ingelheim de Winters, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 18: 5541–4 (2008)), Composto 37 (Boehringer Ingelheim de Cook, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 19: 773–7 (2009)), Composto 41 (Boehringer Ingelheim de Cook, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 19: 773–7 (2009)), Composto 48 (Boehringer Ingelheim de Cook, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 19: 773–7 (2009)), Composto 51 (Boehringer Ingelheim de Cook, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 19: 773–7 (2009)), Composto 10n (Boehringer Ingelheim de Riete, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 19: 1588–91 (2009)), Composto 10o (Boehringer Ingelheim de Riete, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 19: 1588–91 (2009)), Composto 7v (Vertex de Charrier, *et al.*, J Med Chem., 54: 2341–50 (2011)), Composto 7w (Vertex de Charrier, *et al.*, J Med Chem., 54: 2341–50 (2011)), Composto 7x (Vertex de Charrier, *et al.*, J Med Chem., 54: 2341–50 (2011)), Composto 7y (Vertex de Charrier, *et al.*, J Med Chem., 54: 2341–50 (2011)), Composto 44 (Bayer Schering Pharma de vonBonin, *et al.*, Exp Dermatol., 20: 41–7 (2011)), Composto 13 (Nycomed de Velankar, *et al.*, Bioorg Med Chem., 18: 4547–59 (2010)), Composto 24 (Nycomed de Velankar, *et al.*, Bioorg Med Chem., 18: 4547–59 (2010)), Composto 34 (Nycomed de Velankar, *et al.*, Bioorg Med Chem., 18: 4547–59 (2010)), Composto 10o (Nycomed de Herdemann, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 21: 1852–6 (2011)), Composto 3 (Sanofi US de McLean, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 22: 3296–300 (2012)), Composto 7 (Sanofi US de McLean, *et al.*, Bioorg Med Chem Lett., 22: 3296–300 (2012), e/ou outros inibidores da cinase, inibidores da tirosina cinase, ou inibidores da serina/treonina cinase conhecidos na técnica, assim como quaisquer combinações dos mesmos.

[00328] Em qualquer uma das modalidades precedentes, os regimes de

pré-tratamento compreendendo ibrutinib (comercialmente disponível como IMBRUVICA e que tem o nome químico 1-[(3*R*)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il]-1-piperidinil]-2-propen-1-ona) podem incluir administrar oralmente uma cápsula de 140 mg q.d., oralmente administrar duas cápsulas de 140 mg q.d., oralmente administrar três cápsulas de 140 mg q.d., ou oralmente administrar quatro cápsulas de 140 mg q.d., por uma duração de cerca de um dia, dois dias, três dias, quatro dias, cinco dias, seis dias, sete dias, oito dias, nove dias, dez dias, onze dias, doze dias, duas semanas, três semanas, um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses, ou seis meses. Nas modalidades precedentes, os regimes de pré-tratamento compreendendo ibrutinib também podem compreender administrar oralmente uma dose de ibrutinib selecionada do grupo consistindo em 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 425 mg, 450 mg e 500 mg, em que a administração ocorre uma vez ao dia, duas vezes ao dia, três vezes ao dia, ou quatro vezes ao dia e em que a duração de administração é selecionada do grupo consistindo em cerca de um dia, dois dias, três dias, quatro dias, cinco dias, seis dias, sete dias, oito dias, nove dias, dez dias, onze dias, doze dias, duas semanas, três semanas, um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses e seis meses.

[00329] Em qualquer uma das modalidades precedentes, o câncer a ser tratado é uma malignidade hematológica selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma

múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

[00330] A eficácia dos métodos e composições aqui descritos no tratamento, prevenção e/ou controle das doenças ou distúrbios indicados pode ser testada usando vários modelos de animal conhecidos na técnica.

Linfodepleção Não Mieloablativa com Quimioterapia

[00331] Em uma modalidade, a invenção provê um método para tratar um câncer com uma população de TILs, em que um paciente é pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa antes de uma infusão de TILs de acordo com a presente divulgação. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é um ou mais agentes quimioterapêuticos. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d durante 2 dias (dias 27 e 26 antes da infusão de TIL) e fludarabina 25 mg/m²/d durante 5 dias (dias 27 a 23 antes da infusão de TIL). Em uma modalidade, depois da quimioterapia não mieloablativa e infusão de TIL (no dia 0) de acordo com a presente divulgação, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 intravenosamente a 720.000 IU/kg a cada 8 horas até a tolerância fisiológica.

[00332] As verificações experimentais indicam que a linfodepleção antes da transferência adotiva de linfócitos T específicos de tumor desempenha um papel chave no realce da eficácia do tratamento pela eliminação de células T reguladoras e elementos de competição do sistema imune (“depósitos de citocina”). Consequentemente, algumas modalidades da invenção utilizam uma etapa de linfodepleção (algumas vezes também aludida como “condicionamento imunossupressivo”) no paciente antes da introdução dos TILs reREP da invenção.

[00333] No geral, a linfodepleção é obtida usando a administração de fludarabina ou ciclofosfamida (a forma ativa sendo aludida como

mafosfamida) e combinações das mesmas. Tais métodos são descritos em 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, todas das quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

[00334] Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma concentração de 0,5 µg/mL a 10 µg/mL de fludarabina. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma concentração de 1 µg/mL de fludarabina. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado durante 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, ou 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma dosagem de 10 mg/kg/dia, 15 mg/kg/dia, 20 mg/kg/dia, 25 mg/kg/dia, 30 mg/kg/dia, 35 mg/kg/dia, 40 mg/kg/dia, ou 45 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado durante 2 a 7 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado durante 4 a 5 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado durante 4 a 5 dias a 25 mg/kg/dia.

[00335] Em algumas modalidades, a mafosfamida, a forma ativa da ciclofosfamida, é obtida em uma concentração de 0,5 µg/mL a 10 µg/mL pela administração de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, a mafosfamida, a forma ativa de ciclofosfamida, é obtida em uma concentração de 1 µg/mL pela administração de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, o tratamento de ciclofosfamida é administrado durante 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, ou 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada em uma dosagem de 100 mg/m²/dia, 150 mg/m²/dia, 175 mg/m²/dia, 200 mg/m²/dia, 225 mg/m²/dia, 250 mg/m²/dia, 275 mg/m²/dia, ou 300 mg/m²/dia. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada intravenosamente (isto é, i.v.). Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado durante 2 a 7 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas

modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado durante 4 a 5 dias a 250 mg/m²/dia i.v. Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado durante 4 dias a 250 mg/m²/dia i.v.

[00336] Em algumas modalidades, a linfodepleção é realizada administrando-se a fludarabina e a ciclofosfamida juntas a um paciente. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada a 25 mg/m²/dia i.v. e a ciclofosfamida é administrada a 250 mg/m²/dia i.v. em 4 dias.

[00337] Em uma modalidade, a linfodepleção é realizada pela administração de ciclofosfamida em uma dose de 60 mg/m²/dia durante dois dias seguida pela administração de fludarabina em uma dose de 25 mg/m²/dia durante cinco dias. Diversos métodos de expandir TILs obtidos a partir da medula óssea ou sangue periférico são aqui descritos. Em uma modalidade da invenção, a linfodepleção é realizada pela administração de ciclofosfamida em uma dose de 60 mg/m²/dia durante dois dias seguida pela administração de fludarabina em uma dose de 25 mg/m²/dia durante cinco dias. Diversos métodos de expandir TILs obtidos a partir da medula óssea ou sangue periférico são aqui descritos.

EXEMPLOS

[00338] As modalidades aqui abrangidas são agora descritas com referência aos seguintes exemplos. Estes exemplos são providos apenas para o propósito de ilustração e a divulgação aqui abrangida não deve de nenhum modo ser interpretada como sendo limitada a estes exemplos, mas ao invés deve ser interpretada abranger quaisquer e todas as variações que se tornem evidentes como um resultado das divulgações aqui providas.

Exemplo 1 – Expansão de TILs de Linfoma de não Hodgkins

[00339] Os TILs foram expandidos a partir de cinco tumores de linfoma de não Hodgkin (um tumor de linfoma de célula do manto, três tumores de linfoma folicular e um tumor difuso grande de linfoma de célula B do tipo ABC) com as patologias dadas na FIG. 1, usando IL-2 durante 11 a 14

dias em um estágio pré-REP, seguida pelo REP subsequente durante 14 dias usando IL-2, anticorpo mitogênico anti-CD3 e alimentadores de célula mononuclear de sangue periférico (PBMC) alogênicas irradiadas. Os TILs foram gerados com êxito de todos os 5 tumores de linfoma com índice de expansão máximo de 680 vezes, significativamente mais altos do que anteriormente observados usando outros métodos. Schwartzentruber, *et al.*, *Blood* **1993**, 82, 1204-1211. Além disso, a população média de célula T CD3⁺ foi de 95% (versus 75% usando o método de Schwartzentruber, *et al.*, *Blood* **1993**, 82, 1204-1211).

[00340] A classificação de célula e a citometria de fluxo foram realizadas usando um sistema FACS CANTO II da Becton, Dickinson & Co. (BD). Um aumento relativo acentuado nas células de memória efetoras que foi comparável com aquele em TILs de melanoma foi observado pela análise de citometria de fluxo (FIG. 2). Um aumento significativo nos subconjuntos de células de memória efetora CD45RA⁺ (TEMRA) ($p = 0,0013$; CD4, CD8) e CD28+CD4⁺ ($p = 0,008$) foi observado em linfoma comparado com culturas de TIL de melanoma (FIG. 3).

[00341] As comparações de marcadores fenotípicos de diferenciação de célula T nos subconjuntos CD4⁺ e CD8⁺ são mostrados na FIG. 4 e FIG. 5, respectivamente. As comparações de marcadores fenotípicos de exaustão de célula T nos subconjuntos CD4⁺ e CD8⁺ são mostrados na FIG. 6 e FIG. 7, respectivamente.

[00342] A FIG. 8 ilustra uma comparação de tipos de célula entre TILs de linfoma de não Hodgkin e TILs de melanoma. Uma tendência crescente no número de células T CD4⁺ em TILs de linfoma comparado aos TILs de melanoma é mostrada.

[00343] A FIG. 9 ilustra resultados do ensaio de lise redirecionado bioluminescente (BRLA). A atividade citolítica mínima de TIL medido pelo BRLA como LU₅₀/10⁶ em 4 horas variou de <1-6 LU₅₀ e em 24 horas, 1 a 39

LU₅₀ em TIL de linfoma comparado ao TIL de melanoma (11-75 LU₅₀, 4 horas).

[00344] A FIG. 10 ilustra resultados do ensaio imunossorvente ligado à enzima de interferon- γ (IFN- γ) (ELISA) para TILs de linfoma versus TILs de melanoma. Mostrando resultados comparáveis. Os resultados de ensaio de ELIsot para os TILs de linfoma são mostrados na FIG. 11 e são comparados com os resultados do mesmo ensaio para TILs de melanoma na FIG. 12. No ensaio de ELIsot, uma ampla faixa de produção de IFN- γ pelos TILs de linfoma foi observada na estimulação com forbol 12-miristato 13-acetato/ionomicina, anticorpo anti-CD3, ou grânulos de CD3/CD28/4-1BB e IFN- γ produzido por alguns TILs de linfoma sob estas condições foi comparável ao IFN- γ produzido pelos TILs de melanoma e em diversos casos, a produção de IFN- γ em TILs de linfoma foi muito mais alta.

[00345] A FIG. 13 ilustra os resultados de uma análise NANOSTRING NCOUNTER (Nanostring Technologies, Inc., Seattle, WA), mostrando que TILs de linfoma expressam níveis mais altos de RORC IL17A (fenótipo TH17) e GATA3 (fenótipo Th2) comparados aos TILs de melanoma. Esta verificação é compatível com a observação de que as células T reativas em linfoma são primariamente TH2 e TH17.

[00346] No geral, os resultados provêm evidência que a terapia com célula de TIL pode ser usada para tratar pacientes com linfoma.

Exemplo 2 – Caracterização Fenotípica e Funcional de Linfócitos Infiltrantes de Medula Óssea (MIL) Cultivados a partir da Medula Óssea de Pacientes AML e Linfócitos do Sangue Periférico (PBL) Cultivados a partir do Sangue Periférico de Pacientes AML

[00347] As amostras de medula óssea e como disponível uma amostra de sangue relacionado foram obtidos de pacientes com leucemia mieloide aguda (AML), incluindo pacientes pré-tratados com pelo menos três rodadas de um regime compreendendo ibrutinib (1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-

fenoxifenil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il]-1-piperidinil]-2-propen-1-ona), acompanhadas pela informação acerca da idade, gênero, estágio, tipo de tumor, sítio de câncer, histórico de tratamento, um relato de patologia não identificado e qualquer um dos testes moleculares realizados (por exemplo, expressão de MSI e expressão de Raf/Ras) do paciente. Os MILs e PBLs foram expandidos usando um do Método MIL 1, Método MIL 2, ou Método MIL 3, ou Método PBL 1, Método PBL 2, ou Método PBL 3 e os MILs e PBLs foram fenotipicamente e funcionalmente distinguidos.

[00348] As FIGS. 36A e 36B ilustram a expansão multiplicativa para MILs e PBLs. A FIG. 36A mostra a expansão multiplicativa para 3 pacientes (MIL1, MIL2, MIL3) e a FIG. 36B mostra a expansão multiplicativa para os PBLs emparelhados para os pacientes 2 e 3 (PBL2, PBL3). MIL1.1 foi expandido usando o Método MIL 1, MIL1.2 foi expandido usando o Método MIL 2 e MIL1.3 foi expandido usando o Método MIL 3 e PBLs foram expandidos usando o Método PBL 3. A expansão multiplicativa de MIL1 mostra aumentos de 25 (MIL1.1), 50 (MIL1.2) e 75 (MIL1.3) vezes para cada amostra dentro de MIL1. Isto preliminarmente demonstra que o Método MIL 3 pode ser um método de expansão preferido. Os dados de expansão multiplicativa de MIL2 e MIL3 parecem insatisfatórios, possivelmente devido ao baixo número de célula de partida. Para comparação, o número de célula de partida para a amostra 3 de paciente MIL1 (MIL1.3) foi de 138.000 células, enquanto que os números de células de partida para MIL2 e MIL3 foram 62.000 e 28.000 respectivamente. A expansão multiplicativa de PBL mostrada na FIG. 36B para MIL2 e MIL3 foi de cerca de 10 vezes e 40 vezes, respectivamente, com número de células de partida similares (338.000 para PBL2 e 336.000 para PBL3).

[00349] As FIGS. 37A e 37B ilustram o número de células produtoras de IFN- λ para MILs (FIG. 37A) e PBLs emparelhados (FIG. 37B). MIL1.3, MIL2 e MIL3 mostram aumentos significantes na secreção de IFN- λ ,

indicando que o Método MIL 3 é um método de expansão preferido. Os dados para PBLs são inconclusivos.

[00350] As FIGS. 38A-38F mostram os subconjuntos $\text{TCR}\alpha\beta^+$, CD4^+ e CD8^+ para MILs e PBLs. As FIGS. 38A e 38D mostram subconjuntos $\text{TCR}\alpha\beta^+$ para MILs (FIG. 38A) expandidos usando todos os 3 métodos (MIL1.1, MIL1.2, MIL1.3) e para PBLs (FIG. 38D) expandidos usando o Método PBL 3. Os dados mostram que os subconjuntos $\text{TCR}\alpha\beta^+$ estão em quase 100% para todos MILs e PBLs, o que indica que o processo de expansão foi bem sucedido na expansão de quase todas as células T. As FIGS 38B e 38E mostram que os subconjuntos CD4^+ são diminuídos para MILs expandidos pelo Método MIL 3 (que correlaciona com o aumento nos subconjuntos CD8^+ na FIG. 38C). Os dados de PBL nas FIGS. 38E e 38F parecem compatíveis com os dados de MIL1.3.

[00351] As FIGS. 39A-D e 40A-D mostram os dados para subconjuntos CD4^+ em MIL (FIG. 39) e PBL (FIG. 40). As FIGS. 39A e 40A mostram os dados para ingênuo ($\text{CCR7}^+/\text{CD45RA}^+$); as FIGS. 39B e 40B mostram os dados para as células T de memória central (CM) ($\text{CCR7}^+/\text{CD45RA}^-$); as FIGS. 39C e 40C mostram os dados para células T de memória efetora (EM) ($\text{CCR7}^-/\text{CD45RA}^-$); e as FIGS. 39D e 40D mostram os dados para as células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) ($\text{CCR7}^-/\text{CD45RA}^+$). Todas as amostras expandidas usando o Método MIL 3 (MIL1.3) e Método PBL 3 (PBL2 e PBL3) são compatíveis com os subconjuntos CD4^+ no comparador, TIL de melanoma.

[00352] As FIGS. 41A-D e 42A-D mostram os dados para os subconjuntos CD8^+ em MIL (FIG. 41) e PBL (FIG. 42). As FIGS. 41A e 42A mostram os dados para ingênuo ($\text{CCR7}^+/\text{CD45RA}^+$); as FIGS. 41B e 42B mostram os dados para as células T de memória central (CM) ($\text{CCR7}^+/\text{CD45RA}^-$); as FIGS. 41C e 42C mostram os dados para células T de memória efetora (EM) ($\text{CCR7}^-/\text{CD45RA}^-$); e as FIGS. 41D e 42D mostram os

dados para as células efectoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+). As amostras expandidas usando o Método MIL 3 (MIL1.3) são compatíveis com subconjuntos CD4 no comparador, TIL de melanoma. Os dados para PBL2 e PBL3 foram usados como um controle.

[00353] As FIGS. 43A e 43B mostram os dados para os subconjuntos CD4CD27 e CD8CD27 para MILs (FIG. 43A) e PBLs (FIG. 43B). As FIGS. 44A e 44B mostram os dados para subconjuntos CD4CD28 e CD8CD28 para MILs (FIG. 44A) e PBLs (FIG. 44B). Os dados para PBLs são mostrados para o Dia 0 e Dia 14 do processo de expansão para cada amostra, quando comparados com TIL de melanoma. Os dados para MILs são mostrados no Dia 0 e Dia 14 apenas para MIL1.3, quando comparados com TIL de melanoma. Os subconjuntos CD28 em MIL e PBL são similares ao TIL de melanoma.

[00354] As FIGS. 45A e 45B representam uma comparação de células PD1+ dentro de cada um dos subconjuntos CD4 e CD8 para MILs (FIG. 45A) e PBLs (FIG. 45B). As FIGS. 46A e 46B representam uma comparação de células LAG3+ dentro de cada um dos subconjuntos de CD4 e CD8 para MILs (FIG. 46A) e PBLs (FIG. 46B). Os dados tanto para PD1+ quanto para LAG3+ mostram uma diminuição substancial na amostra MIL1.3 na medição do Dia 0, enquanto MIL1.1 e MIL1.2 pareceram tender para um aumento tanto para PD1 quanto para LAG3 no Dia 0. Os dados de PBL foram usados como um controle.

[00355] Os experimentos deste Exemplo demonstram que MILs expandidos com o Método MIL 3 tiveram uma expansão multiplicativa mais alta, foram altamente funcionais, tiveram uma proporção mais alta de subconjuntos CD8 e tiveram menos subconjuntos de célula T LAG3+ e PD1+. Os dados também mostraram que os subconjuntos de memória foram similares ao TIL de melanoma. Os dados também mostraram que as amostras criopreservadas pareceram ter expansão multiplicativa mais alta quando

comparadas com amostras frescas. Muitos dos dados para as amostras PBL parecem ser inconclusivos, provavelmente com base no tamanho de amostra pequeno.

Exemplo 3 – Métodos de expandir TILs e Tratar Cânceres com os TILs Expandidos

[00356] A medula óssea é obtida usando aspiração com agulha. A amostra de medula óssea é aspirada dentro de seringas com heparina e armazenadas durante a noite na temperatura ambiente. Depois da armazenagem, os conteúdos das seringas são reunidos juntos dentro de um recipiente estéril e a qualidade testada. A medula óssea é enriquecida quanto às células mononucleares (MNCs) usando meios de separação de linfócito (LSM) e centrifugação com um COBE Spectra. As células no gradiente são coletadas para as células sanguíneas vermelhas e lavadas usando HBSS. As MNCs são criopreservadas usando um crioprotetor com base em *hetastarch* suplementado com 2% de HSA e 5% de DMSO, reservando um pouco das MNCs para o controle de qualidade. O frasco QC é descongelado para determinar o conteúdo de célula CD3⁺ e CD38⁺/138⁺ do produto de MNC.

[00357] A medula óssea é aspirada e fracionada em um gradiente de densidade de Meio de Separação de Linfócito e as células são coletadas quase ao nível da pelota de célula vermelha. Este método de fracionamento substancialmente remove as células sanguíneas vermelhas e neutrófilos, provendo a medula óssea quase completa. O material fracionado resultante é de células T e células de tumor. A medula óssea é submetida a Ficoll e TILs são expandidos usando métodos conhecidos na técnica e qualquer método aqui descrito. Por exemplo, um método exemplar para expandir TILs é representado na FIG. 14. Um método exemplar para expandir TILs e tratar um paciente com câncer com TILs expandidos são mostrados na FIG. 15.

Exemplo 4 – Caracterização Fenotípica e Funcional de Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TIL) Cultivados a partir de Tumores de Linfoma Não Hodgkin

[00358] As metas dos experimentos descritos neste Exemplo incluem determinar se TIL com potencial terapêutico pode ser isolado e cultivado a partir de tumores NHL e comparar as características de TIL derivado de NHL com TIL derivado de melanoma.

[00359] Os materiais e métodos para a extração e expansão de TILs de um paciente são como aqui descritos. Os TILs dos pacientes foram extraídos de um microambiente de tumor supressivo pela resseção cirúrgica de uma lesão, neste caso, tecido de linfônodo. Os TILs foram expandidos usando os processos de expansão aqui divulgados para produzir 10^9 a 10^{11} TILs.

[00360] TILs derivados de NHL (1 linfoma de célula do manto (MCL), 3 linfomas foliculares (FL), 3 linfomas de célula B grandes difusos (DLBCL)) foram analisados quanto aos marcadores de diferenciação contra TILs derivados de melanoma usando a citometria de fluxo. Os TILs foram analisados quanto aos anticorpos anti-CD56, anti-TCRab, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD27 e anti-CD28. Estes anticorpos foram usados como Painel de Diferenciação 1 (DF1). Os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD9, anti-CD38 e anti-HLA-DR, anti-CCR7 e anti-CD45RA foram usados como o painel de diferenciação 2 (DF2). O DF2 foi usado para identificar os seguintes subconjuntos de célula T: Ingênuo (CCR7+/CD45RA+); células T de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+).

[00361] A Figura 16 mostra células T CD4 e CD8 em subpopulações de célula diferentes em tipos de câncer diferentes. Os tipos de câncer de melanoma (preto), célula do manto (vermelho), linfoma de célula B grande difusa (azul) e linfoma folicular (púrpura) foram testados. As Figuras 16A-16D geralmente demonstram uma tendência para o TIL de linfoma ser mais altamente proliferativo e, portanto, ter atividade antitumoral mais alta quando comparado com TIL de melanoma. Igualmente, a Figure 17B mostra que as

células T de linfoma expressando CD4/CD28 têm capacidade proliferativa mais alta do que as células T de melanoma expressando CD4/CD28.

[00362] A produção de interferon gama (IFN γ) pelos TILs foi medida pela estimulação de TILs com DynaBeads[®] revestidos com mAB (CD3, CD28 e CD137), depois usando ELISpot[®] (Immunospot CTL) e enumerada usando o analisador de entrada Immunospot[®] S6 e também pelo ELISA usando o kit de ELISA DuoSet[®] (R&D systems seguindo as instruções do fabricante).

[00363] As Figuras 18A e 18B demonstram que a produção de IFN γ pelo TIL de NHL e TIL de melanoma são similares, indicando uma funcionalidade citotóxica similar entre os dois tipos de TIL.

[00364] O potencial lítico de TILs foi determinado usando o Ensaio de Lise Redirecionado bioluminescente (BRLA). As células P815 transduzidas com vetor lentiviral codificando eGFP e luciferase de vagalume foram usados como células alvo. TILs e células alvo foram cocultivadas durante 4 horas/24 horas na presença de OKT3. Luciferina foi depois adicionada e as células foram incubadas durante 5 minutos. A bioluminescência foi medida usando um luminômetro. A sobrevivência *per cent* e citotoxicidade percentual foram calculados como segue:

$$\% \text{ de Sobrevivência} = (\text{sobrevivência experimental} - \text{mínima}) / (\text{sinal máximo} - \text{sinal mínimo}) \times 100$$

$$\% \text{ de Citotoxicidade} = 100 - (\% \text{ de Sobrevivência})$$

[00365] O potencial lítico de TILs foi expresso como uma unidade lítica, LU50, que representa 50 por cento de citotoxicidade de células alvo induzida pelas células efetoras.

[00366] TILs foram ensaiados para determinar a sua capacidade para matar tumor tanto nos tumores autólogos quanto alogênicos. Os TILs foram misturados com células de linfoma autólogo ou linhagens de célula de melanoma alogênico (linhagem de célula de melanoma 526) em diferentes

razões de célula efetora para célula alvo (razão E:T) – 10:1, 20:1, 50:1, ou 100:1. As células de tumor foram rotuladas com corante CellTrace Violet (ThermoFisher) antes da cocultura. Depois de 24 horas, as células foram tingidas com 7-AAD para determinar a morte celular. A proporção de células de tumor mortas pelos TILs foi representada como células de tumor positivas em 7-AAD que foram ativadas no corante CellTrace Violet versus CD19 para as células de linfoma e CellTrace Violet Vs MCSP para as células de melanoma.

[00367] A Figura 19 mostra que TIL de NHL e TIL de melanoma têm funcionalidade citotóxica similar contra tumores tanto alogênicos quanto autólogos em 4 horas (Figura 19A) e 24 horas (Figura 19B).

[00368] A análise de expressão de gene também foi realizada nos TILs usando o painel nCounter GX Human Immunology V2 (NanoString, Seattle). 100 ng de RNA total foram ensaiados pelas instruções do fabricante. Os dados foram normalizados pelo dimensionamento com média geométrica das sondas de gene de controle embutidas para cada amostra. Os dados foram mapeados contra e comparados com a expressão de gene de melanoma.

[00369] A Figura 21 demonstra os resultados da análise de expressão de gene. O mapa térmico mostra a alteração multiplicativa na expressão do gene em relação ao TIL de melanoma. A expressão de IL17A e RORC a partir de TIL derivado de linfoma teve a expressão mais alta quando comparada com TIL derivado de melanoma.

[00370] No geral, os resultados deste experimento demonstraram que as características funcionais de TIL derivado de linfoma são similares ao TIL derivado de melanoma, indicando que o uso de TIL derivado de linfoma seria bem sucedido no tratamento de cânceres de linfoma.

Exemplo 5 - Caracterização Fenotípica e Funcional de Linfócitos do Sangue Periférico (PBLs) Cultivados a partir do Sangue Periférico de Pacientes Com Leucemia Linfocítica Crônica (CLL).

[00371] As PBMCs foram coletadas de pacientes com CLL pré- e pós-tratamento com três rodadas de ibrutinib.

[00372] As células T foram expandidas usando três métodos diferentes, Método PBL 1, Método PBL 2 e Método PBL 3, como descritos na Figura 24 e aqui em outro lugar. Certas amostras foram derivadas das PBMCs Frescas e certas amostras foram derivadas das PBMC criopreservadas. Uma vez que as células foram expandidas e colhidas, elas foram fenotipadas e funcionalmente distinguidas usando os métodos descritos no Exemplo 4, acima e aqui em outro lugar. As metas deste Exemplo foram determinar um processo de expansão ideal para PBLs e determinar se PBLs expandidas a partir das amostras tratadas com ibrutinib são mais potentes do que PBLs expandidos a partir das amostras não tratadas.

[00373] A expansão multiplicativa de PBL é mostrada na Figura 26. Os resultados para PBLs expandidos usando o Método PBL 1, Método PBL 2 e Método PBL 3 são mostrados. PBLs não tratados (PBL Pré-Rx) mostraram uma expansão média de 179 vezes e PBLs tratados com ibrutinib (PBL Pós-Rx) mostraram uma expansão média de 306 vezes. Os PBLs derivados de PBMC Fresca (PBL) mostraram apenas uma expansão média de 82 vezes. Como entre PBLs e PBLs Pós-Rx, $p=0,006$. Como entre PBLs e PBLs Pré-Rx, $p=0,3$ e como entre PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx, $p=0,1$. No geral, um aumento na expansão multiplicativa média é observada para todos os grupos de PBL Pós-Rx em relação a todos os grupos tanto em PBLs quanto em PBLs Pré-Rx.

[00374] A Figura 27 demonstra células produtoras de interferon-gama (IFN- λ) em PBL, PBL Pré-Rx e PBL Pós-Rx. Para PBL, o número médio de células produtoras de IFN- λ foi cerca de 1864. Para PBL Pré-Rx, o número médio de células produtoras de IFN-g foi de cerca de 7530 e para PBL Pós-Rx, o número médio de células produtoras de IFN- λ foi de cerca de 11984. Como entre PBLs e PBLs Pós-Rx, $p=0,006$. Como entre PBLs e PBLs Pré-

Rx, $p=0,006$ e como entre PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx, $p=0,01$. No geral, um aumento significativo no número médio de células produtoras de IFN- λ é observado para todos os grupos PBL Pós-Rx em relação a todos os grupos tanto em PBLs quanto em PBLs Pré-Rx.

[00375] A caracterização fenotípica foi realizada em cada uma das amostras. A FIG. 28 representa a proporção dos subconjuntos de célula T CD4+ e CD8+ em PBL Pré-Rx e PBL Pós-Rx e usa TIL de melanoma como um comparador. Aqui, os dados mostram que subconjuntos CD4 (mostrados na esquerda) foram comparáveis entre PBL Pré-Rx e PBL Pós-Rx, independente de qual método foi usado para expandir as células. Os subconjuntos CD4 em PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx foram mostrados ser mais altos do que TIL de melanoma ($p=0,0006$ para cada). Os subconjuntos CD8 (mostrados na direita) foram mais baixas tanto no PBL Pré-Rx quanto no PBL Pós-Rx, independente do processo usado para expandir as células. Os subconjuntos CD8 em PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx foram mostrados ser mais baixos do que TIL de melanoma ($p=0,0006$ para cada um). É levantada a hipótese de que os subconjuntos CD8 mais baixos são meramente um derivado do tipo de câncer (isto é, em CLL, subconjuntos CD4 são tipicamente expandidos).

[00376] As Figuras 29A-29D representam uma comparação entre subconjunto de memória CD4 de PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx, usando TIL de melanoma como um comparador. A Figura 29A mostra dados para ingênuo (CCR7+/CD45RA+); a Figura 29B mostra dados para as células T de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); a Figura 29C mostra dados para células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e a Figura 29D mostra dados para células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+). A Figura 29 demonstra que os subconjuntos de memória CD4 para PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx são comparáveis àqueles observados para TIL de melanoma.

[00377] As Figuras 30A-30D representam uma comparação entre subconjunto de memória CD8 de PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx, usando TIL de melanoma como um comparador. A Figura 30A mostra dados para ingênuo (CCR7+/CD45RA+); a Figura 30B mostra dados para as células T de memória central (CM) (CCR7+/CD45RA-); a Figura 30C mostra dados para as células T de memória efetora (EM) (CCR7-/CD45RA-); e a Figura 30D mostra dados para as células efetoras de memória terminalmente diferenciadas (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+). A Figura 30 demonstra que os subconjuntos de memória CD8 para PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx são comparáveis com aqueles observados para TIL de melanoma.

[00378] As Figuras 31A e 31B representam uma comparação de subconjuntos CD27 de células CD4 (Fig. 31A) e células CD8 (Fig. 31B), usando TIL de melanoma como um comparador. Os subconjuntos de célula CD4CD27 foram significativamente mais altos tanto no PBL Pré-Rx ($p=0,03$) quanto no PBL Pós-Rx ($p=0,02$) quando comparados ao TIL de melanoma. Os subconjuntos de célula CD8CD27 foram significativamente mais altos tanto em PBL Pré-Rx ($p=0,002$) quanto em PBL Pós-Rx ($p=0,001$) quando comparados ao TIL de melanoma.

[00379] As Figuras 32A e 32B representam uma comparação de subconjuntos CD28 de células CD4 (Fig. 30A) e células CD8 (Fig. 30B), usando TIL de melanoma como um comparador. Os subconjuntos de célula CD4CD28 e subconjuntos de célula CD8CD28 foram mostrados ser comparáveis tanto em PBL Pré-Rx quanto em PBL Pós-Rx quando comparados ao TIL de melanoma.

[00380] As Figuras 33A e 33B representam uma comparação de subconjuntos LAG3+ dentro das populações CD4+ (FIG. 33A) e CD8+ (FIG. 33B) para PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx. Os dados mostram uma diminuição média significante em subconjuntos LAG3+ tanto nas populações CD4+ ($p=0,06$) quanto nas CD8+ ($p=0,01$) no PBLs Pós-Rx.

[00381] As Figuras 34A e 34B representam uma comparação de subconjuntos PD1+ dentro das populações CD4+ (FIG. 34A) e CD8+ (FIG. 34B) para PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx. Os dados mostram uma diminuição média nos subconjuntos PD1+ tanto na população CD4+ quanto na CD8+ no PBLs Pós-Rx, mas a diminuição não foi significativa.

[00382] As Figuras 35A e 35B mostram resultados de atividade citolítica de PBLs Pré-Rx (FIG. 35A) e PBLs Pós-Rx (FIG. 35B), medido usando um Ensaio de Lise Redirecionado Bioluminescente (BRLA). O ensaio foi realizado usando o Kit de Proliferação de Célula CellTrace® Violet (Invitrogen) como segue: As Células Efetoras, que são os PBLs, foram rotuladas com éster carboxifluorescein succinimidílico (CFSE). As Células Alvo (células de tumor CD19+ autólogas) foram incubadas com mitocina C e depois rotulados com CellTrace® Violet (CTV) de acordo com as instruções do Kit de Proliferação de Célula CellTrace Violet. As células Efetora e Alvo foram incubadas durante 24 horas nas razões de 2:1, 5:1 e 20:1 (células E:T). Os grânulos CountBright foram adicionados, as células foram tingidas com Anexina V – PI e depois analisadas quanto as células CTV+/Anexina-V PI+ (que provê o número de células mortas). Os PBLs Pós-Rx parecem ser mais potentes porque menos células são requeridas para matar 50% das células de tumor alvo (isto é, a LU_{50} é mais baixa para PBLs Pós-Rx do que para PBLs Pré-Rx).

[00383] Os experimentos realizados neste Exemplo demonstram os seguintes resultados: os PBLs expandidos a partir das PBMCs CLL frescas mostraram expansão multiplicativa mais baixa e significativamente menos produção de IFN- λ quando comparados aos PBLs expandidos a partir das PBMC criopreservadas (PBLs Pré-Rx e PBLs Pós-Rx); os PBLs Pós-Rx mostraram expansão multiplicativa compativelmente mais alto e aumento significativo na produção de IFN- λ quando comparados com PBLs Pré-Rx; e tanto PBLs Pré-Rx quanto PBLs Pós-Rx mostraram atividade lítica contra

células de tumor autólogas (CD19+), embora os PBLs Pós-Rx tivessem uma LU₅₀ mais baixa do que os PBLs Pré-Rx.

[00384] Os exemplos apresentados acima são providos para oferecer aqueles de versatilidade comum na técnica uma divulgação e descrição completas de como fazer e usar as modalidades das composições, sistemas e métodos da invenção e não são intencionados a limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. As modificações dos modos descritos acima para realizar a invenção que são óbvias para as pessoas versadas na técnica são intencionadas a estar dentro do escopo das seguintes reivindicações. Todas as patentes e publicações mencionadas no relatório descritivo são indicativas dos níveis de versatilidade daqueles versados na técnica à qual a invenção pertence.

[00385] Todos os cabeçalhos e designações de seção são usados apenas com propósitos de clareza e referência e não devem ser considerados limitantes de nenhum modo. Por exemplo, aqueles versados na técnica avaliarão a utilidade de combinar vários aspectos de cabeçalhos e seções diferentes como apropriado de acordo com o espírito e escopo da invenção aqui descrita.

[00386] Todas as referências aqui citadas são por meio deste aqui incorporadas por referência em suas totalidades e para todos os propósitos ao mesmo grau como se cada publicação ou patente ou pedido de patente individuais fossem específica e individualmente indicados estar incorporados por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

[00387] Muitas modificações e variações deste pedido podem ser feitas sem divergir do seu espírito e escopo, como estará evidente para aqueles versados na técnica. As modalidades específicas e exemplos aqui descritos são oferecidos apenas por via de exemplo e o pedido deve ser limitado apenas pelos termos das reivindicações anexas, junto com o escopo completo de equivalentes para os quais as reivindicações são designadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar um câncer em um paciente com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) opcionalmente pré-tratar um paciente com um regime compreendendo ibrutinib;

(b) obter um tumor líquido;

(c) opcionalmente fragmentar ou dissociar o tumor para obter fragmentos de tumor e contatar os fragmentos de tumor com um primeiro meio de cultura de células;

(d) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs no primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2 e em que a expansão inicial é realizada em um período de 21 dias ou menos;

(e) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 10 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(f) colher a terceira população de TILs; e

(g) administrar uma porção terapêuticamente eficaz da terceira população de TILs a um paciente com o câncer;

em que o câncer é uma malignidade hematológica.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que compreende adicionalmente a adição de um inibidor de ITK, em que o inibidor de ITK é opcionalmente um inibidor de ITK que se liga covalentemente ao ITK.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que um inibidor de ITK é adicionado ao primeiro meio de cultura de células durante a etapa (d), ao segundo meio de cultura de células durante a etapa (e), ou tanto ao primeiro meio de cultura de células durante a etapa (d) quanto ao segundo meio de cultura de células durante a etapa (e).

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em inibidores de ITK com base em aminotiazol, inibidores de ITK com base em benzimidazol, inibidores de ITK com base em aminopirimidina, inibidores de ITK com base em 3-aminopiridin-2-onas, inibidores de ITK com base em indolilindazol, inibidores com base em pirazolil-indol, inibidores de tienopirazol e inibidores de ITK alvejando cisteína-442 na bolsa de ATP.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em ibrutinib, dasatinib, bosutinib, nilotinib, erlotinib BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((*R*)-3-(1-(1-acriloilpiperidin-3-il)-4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-*N*-(3-metil-4-(1-metiletil))benzamida) e combinações dos mesmos.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é ibrutinib.

7. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é adicionado em uma concentração de cerca de 0,1 nM a cerca de 5 µM.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a expansão inicial é realizada em um período dentre 3 dias e 11 dias.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão é realizada em um período dentre 3 dias e 11 dias.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração inicial dentre 1000 IU/mL e 6000 IU/mL no primeiro meio de cultura de células.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração inicial dentre 1000 IU/mL e 6000 IU/mL e o anticorpo OKT-3 está presente em uma concentração inicial de cerca de 30 ng/mL no segundo meio de cultura de células.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a expansão inicial é realizada usando um recipiente permeável a gás.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão é realizada usando um recipiente permeável a gás.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células compreende adicionalmente uma citocina selecionada do grupo consistindo em IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 e combinações das mesmas.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o segundo meio de cultura de células compreende adicionalmente uma citocina selecionada do grupo consistindo em IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 e combinações das mesmas.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de tratar o paciente com um regime de linfodepleção não mieloablativa antes de administrar a terceira população de TILs ao paciente.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o regime de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida em uma dose de 60 mg/m²/dia durante dois dias seguidas pela administração de fludarabina em uma dose de 25 mg/m²/dia durante cinco dias.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de tratar o paciente com um regime de alta dose de IL-2 começando no dia depois da administração da terceira população de TILs ao paciente.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o regime de alta dose de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 IU/kg de aldesleucina, ou um biossimilar ou variante da mesma, administradas como uma infusão intravenosa de bolo em 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-ALL), B-ALL madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

21. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a população de paciente é uma população de paciente pré-

tratada com ibrutinib.

22. Processo para a preparação de uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) de um tumor, o processo caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) fragmentar o tumor;

(b) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs em um primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2 e em que a expansão inicial é realizada em um período de 21 dias ou menos;

(c) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3), células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas; e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos; e

(d) colher a terceira população de TILs;

em que o tumor é um tumor líquido e em que o câncer é uma malignidade hematológica.

23. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a primeira população de TILs é obtida de um tumor ou uma porção do mesmo.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o tumor ou porção do mesmo foi ressecado de um paciente.

25. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a expansão inicial é realizada em um período de 14 dias ou

menos.

26. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a expansão inicial é realizada em um período de 11 dias ou menos.

27. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão é realizada em um período de 11 dias ou menos.

28. Uso de um tumor líquido na fabricação de uma população de linfócitos infiltrantes de tumor, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento de uma malignidade hematológica.

29. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor obtidos da medula óssea ou sangue periférico, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) identificar uma primeira população de TILs de uma amostra de medula óssea ou sangue periférico;

(b) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs em um primeiro meio de cultura de células para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 5 vezes maior em número do que a primeira população de TILs, em que o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2 e em que a expansão inicial é realizada em um período de 21 dias ou menos;

(c) realizar uma segunda expansão da segunda população de TILs em um segundo meio de cultura de células para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da segunda expansão; em que o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 (anticorpo anti-CD3) e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) alogênicas irradiadas e em que a segunda expansão é realizada em um período de 14 dias ou menos;

(d) colher a terceira população de TILs; e

(e) prover a dita terceira população de TILs ao dito paciente.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a expansão inicial é realizada em um período de 11 dias ou menos.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão é realizada em um período de 11 dias ou menos.

32. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração inicial dentre 1000 IU/mL e 6000 IU/mL no primeiro meio de cultura de células.

33. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração inicial dentre 1000 IU/mL e 6000 IU/mL e o anticorpo OKT-3 está presente em uma concentração inicial de cerca de 30 ng/mL no segundo meio de cultura de células.

34. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a expansão inicial é realizada usando um recipiente permeável a gás.

35. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão é realizada usando um recipiente permeável a gás.

36. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células compreende adicionalmente uma citocina selecionada do grupo consistindo em IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 e combinações das mesmas.

37. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o segundo meio de cultura de células compreende adicionalmente uma citocina selecionada do grupo consistindo em IL-4, IL-7,

IL-15, IL-21 e combinações das mesmas.

38. Método para expandir linfócitos de sangue periférico (PBLs) a partir do sangue periférico, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) a partir do sangue periférico, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;

b. isolar PBLs da dita amostra pela seleção e remoção de células B CD19+;

c. opcionalmente cocultivar os ditos PBLs com as ditas células B CD19+;

d. estimular os ditos PBLs em um primeiro meio de cultura de células com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 durante um período de cerca de 2 a cerca de 6 dias em um recipiente permeável a gás;

e. cultivar os PBLs da etapa (d) durante um período de cerca de 2 a cerca de 6 dias com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28;

d. isolar os PBLs ligados ao anticorpo da cultura na etapa (e);

e. remover os anticorpos dos PBLs isolados na etapa (e); e

f. colher os PBLs.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

40. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que depois da etapa (d), mais IL-2 é adicionada e o primeiro meio de cultura de células é trocado com um segundo meio de cultura de células.

41. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que depois da etapa (e), mais IL-2 é adicionada e o segundo meio de cultura é trocado com um terceiro meio de cultura de células.

42. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado

pelo fato de que o segundo meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

43. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o terceiro meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

44. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são diferentes.

45. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são os mesmos.

46. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a razão de células B para PBLs na etapa (c) é de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1 (células B:PBLs).

47. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a razão de células B para PBLs na etapa (c) é selecionada do grupo consistindo em 0,1:1, 1:1 e 10:1 (células B:PBLs).

48. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que há pelo menos cerca de 1×10^5 a cerca de 10×10^5 PBLs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (d).

49. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que há pelo menos cerca de $2,5 \times 10^5$ a 10×10^5 PBLs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (d).

50. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que há pelo menos 5×10^5 PBLs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (d).

51. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração dentre 1000 IU/ml e 6000 IU/ml nas etapas (c) e (d).

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml.

53. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que os anticorpos anti-CD3/anti-CD28 são revestidos sobre grânulos e a razão PBLs:grânulos é de cerca de 1:1 em cada uma das etapas (c) e (d).

54. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a adição de um inibidor de ITK.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que um inibidor de ITK é adicionado durante pelo menos uma da etapa (c), etapa (d) e etapa (e).

56. Método de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em inibidores de ITK com base em aminotiazol, inibidores de ITK com base em benzimidazol, inibidores de ITK com base em aminopirimidina, inibidores de ITK com base em 3-aminopiridin-2-onas, inibidores de ITK com base em indolilindazol, inibidores com base em pirazolil-indol, inibidores de tienopirazol e inibidores de ITK alvejando cisteína-442 na bolsa de ATP.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em ibrutinib, dasatinib, bosutinib, nilotinib, erlotinib BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((*R*)-3-(1-(1-acriloilpiperidin-3-il)-4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-*N*-(3-metil-4-(1-metiletil))benzamida) e combinações dos mesmos.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é ibrutinib.

59. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o método é realizado em um sistema fechado, estéril.

60. Método para expandir linfócitos de sangue periférico (PBLs) a partir de sangue periférico, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. obter uma amostra de PBMCs a partir de sangue periférico de um paciente, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada e o paciente é opcionalmente pré-tratado com um inibidor de ITK;

b. isolar PBLs da dita amostra pela seleção e remoção de células B CD19+ e opcionalmente pré-tratando os ditos PBLs com um inibidor de ITK em uma concentração dentre 0,1 nM e 200 nM;

c. cocultivar os ditos PBLs com as ditas células B CD19+ durante um período dentre 2 a 5 dias;

d. adicionar de cerca de $2,5 \times 10^5$ a cerca de 5×10^5 células a um recipiente permeável a gás em um primeiro meio de cultura de células e estimular os ditos PBLs com 3000 IU/ml de anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 imobilizados sobre grânulos e opcionalmente um inibidor de ITK em uma concentração dentre 0,1 nM e 200 nM, durante um período dentre 3 a 6 dias;

e. trocar o primeiro meio de cultura de células com um segundo meio de cultura de células e mais IL-2 em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml e opcionalmente um inibidor de ITK em uma concentração dentre 0,1 nM e 200 nM;

f. cultivar os PBLs da etapa (e) durante um período adicional dentre 3 a 6 dias com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 imobilizados sobre grânulos e opcionalmente um inibidor de ITK em uma concentração dentre 0,1 nM e 200 nM;

g. trocar o segundo meio de cultura de células com um terceiro meio de cultura de células e adicionar mais IL-2 em uma concentração de 3000 IU/mL e opcionalmente um inibidor de ITK em uma concentração dentre 0,1 nM e 200 nM e cultivar as células durante um período adicional

dentre 2 a 5 dias;

- h. isolar os PBLs ligados ao anticorpo da cultura na etapa (g);
- i. remover os anticorpos dos PBLs isolados na etapa (h); e
- j. colher os PBLs,

em que o inibidor de ITK é um inibidor de ITK que covalentemente se liga a ITK.

61. Método para tratar uma malignidade hematológica, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

- a. obter uma amostra de PBMCs a partir de sangue periférico de um paciente sofrendo de uma malignidade hematológica;
- b. isolar os PBLs da dita amostra pela seleção e remoção de células B CD19+;
- c. opcionalmente cocultivar os ditos PBLs com as ditas células B CD19+;
- d. estimular os ditos PBLs em um primeiro meio de cultura de células com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 durante um período de cerca de 2 a cerca de 6 dias em um recipiente permeável a gás;
- e. cultivar os PBLs da etapa (d) durante um período de cerca de 2 a cerca de 6 dias com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28;
- f. isolar os PBLs ligados ao anticorpo da cultura na etapa (e);
- g. remover os anticorpos dos PBLs isolados na etapa (f); e
- h. colher os PBLs; e
- i. administrar os PBLs ao paciente em uma quantidade terapeuticamente eficaz para tratar a dita malignidade hematológica.

62. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o paciente é pré-tratado com um inibidor de ITK antes da obtenção de uma amostra de PBMC.

63. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em

inibidores de ITK com base em aminotiazol, inibidores de ITK com base em benzimidazol, inibidores de ITK com base em aminopirimidina, inibidores de ITK com base em 3-aminopiridina-2-onas, inibidores de ITK com base em indolilindazol, inibidores com base em pirazolil-indol, inibidores de tienopirazol e inibidores de ITK alvejando cisteína-442 na bolsa de ATP.

64. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é selecionado do grupo consistindo em ibrutinib, dasatinib, bosutinib, nilotinib, erlotinib BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((*R*)-3-(1-(1-acriloilpiperidin-3-il)-4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-*N*-(3-metil-4-(1-metiletil))benzamida) e combinações dos mesmos.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o inibidor de ITK é ibrutinib.

66. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o paciente é pré-tratado com pelo menos três rodadas de um regime de ibrutinib.

67. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-TODOS), B-TODOS madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

68. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a malignidade hematológica é leucemia linfocítica crônica (CLL).

69. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

70. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que depois da etapa (d), mais IL-2 é adicionada e o meio de cultura de células é trocado com um segundo meio de cultura de células.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que depois da etapa (e), mais IL-2 é adicionada e o segundo meio de cultura de células é trocado com um terceiro meio de cultura de células.

72. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o segundo meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

73. Método de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que o terceiro meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

74. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são diferentes.

75. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são os mesmos.

76. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a razão de células B para PBLs na etapa (c) é de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1 (células B:PBLs).

77. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a razão de células B para PBLs na etapa (c) é selecionada do

grupo consistindo em 0,1:1, 1:1 e 10:1 (células B:PBLs).

78. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que há pelo menos de cerca de 1×10^5 a cerca de 10×10^5 PBLs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (d).

79. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que há pelo menos de cerca de $2,5 \times 10^5$ a 10×10^5 PBLs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (d).

80. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que há pelo menos 5×10^5 PBLs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (d).

81. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração dentre 1000 IU/ml e 6000 IU/ml nas etapas (d) e (e).

82. Método de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml.

83. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que os anticorpos anti-CD3/anti-CD28 são revestidos sobre grânulos e a razão de PBLs:grânulo é de cerca de 1:1 em cada uma das etapas (d) e (e).

84. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que os PBLs são administrados em uma quantidade de cerca de $0,1 \times 10^9$ a cerca de 15×10^9 PBLs.

85. Método para expandir linfócitos infiltrantes de medula (MILs) a partir da medula óssea, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) a partir da medula óssea, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;

b. escolher uma fração de célula CD3+, CD33+, CD20+ e

CD14+ (fração de MIL) e uma fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+ e não CD14+ (fração de célula blástica de AML);

c. opcionalmente romper a fração de célula blástica de AML

d. adicionar a fração de célula blástica de AML opcionalmente rompida à fração de célula de MIL em uma razão de número de célula de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1;

e. cultivar uma ou ambas frações de célula em um recipiente permeável a gás em um primeiro meio de cultura de células compreendendo IL-2;

f. estimular os MILs com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 para obter expansão de MILs;

g. reestimular os MILs com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 durante um período adicional de cerca de 2 a cerca de 6 dias;

h. cultivar os MILs com mais IL-2 durante um período adicional de cerca de 1 a cerca de 3 dias; e

i. colher os ditos MILs.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

87. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que depois que a etapa (e) é começada, mais IL-2 é adicionada e o primeiro meio de cultura de células é trocado com um segundo meio de cultura de células.

88. Método de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o segundo meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

89. Método de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são diferentes.

90. Método de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são os mesmos.

91. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que há pelo menos de cerca de 2×10^4 a cerca de 5×10^5 MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e).

92. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que há pelo menos de cerca de $2,8 \times 10^4$ a $3,4 \times 10^5$ MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e).

93. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que há pelo menos 5×10^5 MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e).

94. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração dentre 1000 IU/ml e 6000 IL/ml na etapa (d).

95. Método de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 6000 IU/ml.

96. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml na etapa (f).

97. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o cultivo na etapa (d) é realizado em um período de cerca de 3 dias.

98. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a estimulação na etapa (e) é realizada em um período de cerca de 4 dias.

99. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a estimulação na etapa (f) é realizada em um período de cerca

de 7 dias.

100. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o IL-2 adicional na etapa (g) está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml.

101. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que os anticorpos anti-CD3/anti-CD28 são revestidos sobre grânulos e a razão de MILs:grânulo é de cerca de 1:1 em cada uma das etapas (e) e (f).

102. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a fração de célula opcionalmente rompida é rompida usando um método selecionado do grupo consistindo em sonicação, turbilhonamento, vibração e lise.

103. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a razão do número de célula da fração de célula blástica de AML para a fração de MIL é de cerca de 1:1.

104. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o método é realizado em um sistema fechado, estéril.

105. Método para expandir linfócitos infiltrantes de medula (MILs) a partir da medula óssea, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) a partir da medula óssea, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;

b. escolher uma fração de célula CD3+, CD33+, CD20+ e CD14+ e uma fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+ e não CD14+;

c. romper a fração de célula blástica de AML e adicionar a fração de célula blástica de AML rompida à fração de célula de MIL em uma razão de número de célula de cerca de 1:1;

d. cultivar a fração de célula blástica de AML e a fração de

célula de MIL em um recipiente permeável a gás em um primeiro meio de cultura de células compreendendo IL-2 em uma concentração de cerca de 6000 IU/ml durante um período de cerca de 3 dias;

e. adicionar anticorpos anti-CD3/anti-CD28 imobilizados sobre grânulos à cultura de células em uma razão de cerca de 1:1 (MILs:grânulos) e cultivar os MILs e anticorpos durante um período de cerca de 1 dia;

f. trocar o primeiro meio de cultura de células para um segundo meio de cultura de células compreendendo mais IL-2 em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml;

g. cultivar os grânulos com anticorpo e MILs durante um período adicional de cerca de 3 dias;

h. reestimular os MILs com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 imobilizados sobre grânulos durante um período adicional de pelo menos cerca de 4 dias;

i. trocar o segundo meio de cultura de células para um terceiro meio de cultura de células compreendendo mais IL-2 em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml durante um período adicional de pelo menos cerca de 3 dias; e

j. colher os ditos MILs.

106. Método para tratar uma malignidade hematológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. obter uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) a partir da medula óssea, em que a dita amostra é opcionalmente criopreservada;

b. escolher uma fração de célula CD3+, CD33+, CD20+ e CD14+ (fração de MIL) e uma fração de célula não CD3+, não CD33+, não CD20+ e não CD14+ (fração de célula blástica de AML);

c. opcionalmente romper a fração de célula blástica de AML;

d. adicionar a fração de célula blástica de AML opcionalmente rompida à fração de célula de MIL em uma razão de número de célula de cerca de 0,1:1 a cerca de 10:1;

e. cultivar uma ou ambas frações de célula em um recipiente permeável a gás em um primeiro meio de cultura de células compreendendo IL-2;

f. estimular os MILs com anticorpos anti-CD3/anti-CD28 para obter expansão de MILs;

g. reestimular os MILs com anticorpos IL-2 e anti-CD3/anti-CD28 durante um período adicional de cerca de 2 a cerca de 6 dias;

h. cultivar os MILs com mais IL-2 durante um período adicional de cerca de 1 a cerca de 3 dias;

i. colher os ditos MILs; e

j. administrar os ditos MILs a um paciente em uma quantidade terapeuticamente eficaz para tratar a malignidade hematológica.

107. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada do grupo consistindo em leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma folicular (FL), linfoma de célula B grande difusa (DLBCL), célula B ativada (ABC) DLBCL, célula B do centro germinal (GCB) DLBCL, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin recaído e/ou refratário, leucemia linfoblástica aguda de célula B (B-TODOS), B-TODOS madura, linfoma de Burkitt, macroglobulinemia de Waldenström (WM), mieloma múltiplo, síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielocítica crônica, linfoma do centro folicular, NHL indolente, linfoma de célula B associado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e linfoma de célula B associado com o vírus de Epstein–Barr (EBV).

108. Método de acordo com a reivindicação 107, caracterizado

pelo fato de que a malignidade hematológica é leucemia mieloide aguda (AML).

109. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

110. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que depois que a etapa (e) é realizada, mais IL-2 é adicionada e o primeiro meio de cultura de células é trocado com um segundo meio de cultura de células.

111. Método de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que o segundo meio de cultura de células é selecionado do grupo consistindo em CM-2, CM-4 e AIM-V.

112. Método de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são diferentes.

113. Método de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura de células e o segundo meio de cultura de células são os mesmos.

114. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que há pelo menos de cerca de 2×10^4 a cerca de 5×10^5 MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e).

115. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que há pelo menos de cerca de $2,8 \times 10^4$ a $3,4 \times 10^5$ MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (e).

116. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que há pelo menos 5×10^5 MILs no recipiente permeável a gás no começo da etapa (d).

117. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração dentre 1000 IU/ml

e 6000 IU/ml na etapa (d).

118. Método de acordo com a reivindicação 117, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 6000 IU/ml.

119. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que a IL-2 está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml na etapa (f).

120. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que o cultivo na etapa (e) é realizado em um período de cerca de 3 dias.

121. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que a estimulação na etapa (f) é realizada em um período de cerca de 4 dias.

122. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que a estimulação na etapa (g) é realizada em um período de cerca de 7 dias.

123. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de suplementação de IL-2 adicional realizada depois da etapa (f).

124. Método de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que a IL-2 adicional está presente em uma concentração de cerca de 3000 IU/ml.

125. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que os anticorpos anti-CD3/anti-CD28 são revestidos sobre grânulos e a razão de grânulo:MILs é de cerca de 1:1 em cada uma das etapas (f) e (g).

126. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que os MILs são administrados em uma quantidade de cerca de 4×10^8 a cerca de $2,5 \times 10^9$ MILs.

NHL	Nome do fornecedor	Gênero	Idade	Subtipo de histologia	Grau	Marcadores positivos	Sítio
NHL17001	330-4992	M	73	Linfoma de célula do manto	Típico não agressivo	CD19, CD20, CD5, CYCLIN-D+	vilha esquerda
NHL17002	330-4993	F	53	Linfoma folicular	1	CD20, CD10, BCL2	nível esquerdo III
NHL17003	850-8104	M	63	Linfoma folicular	1-2 de 3	BCL-1, BCL-2, BCL-5, CD3, CD5, CD10, CD20, CD21, CD43, PAX5	braco direito (massa de tecido mole)
NHL17004	310-2799	M	52	Linfoma folicular	Não descrito	CD3, CD5, CD10, CD15, CD20, CD30, CD43, Pax-5, Ki-67	Massa II nível direito, massa posterior direita (excisão)
NHL17005	850-8327	F	33	Linfoma de célula B grande difusa	Linfoma de célula B grande de alto grau	BCL1, BCL2, BCL6, CD3, CD20, C-MYC, CD30, MUM-1	Massa mediastinal

Fig. 1

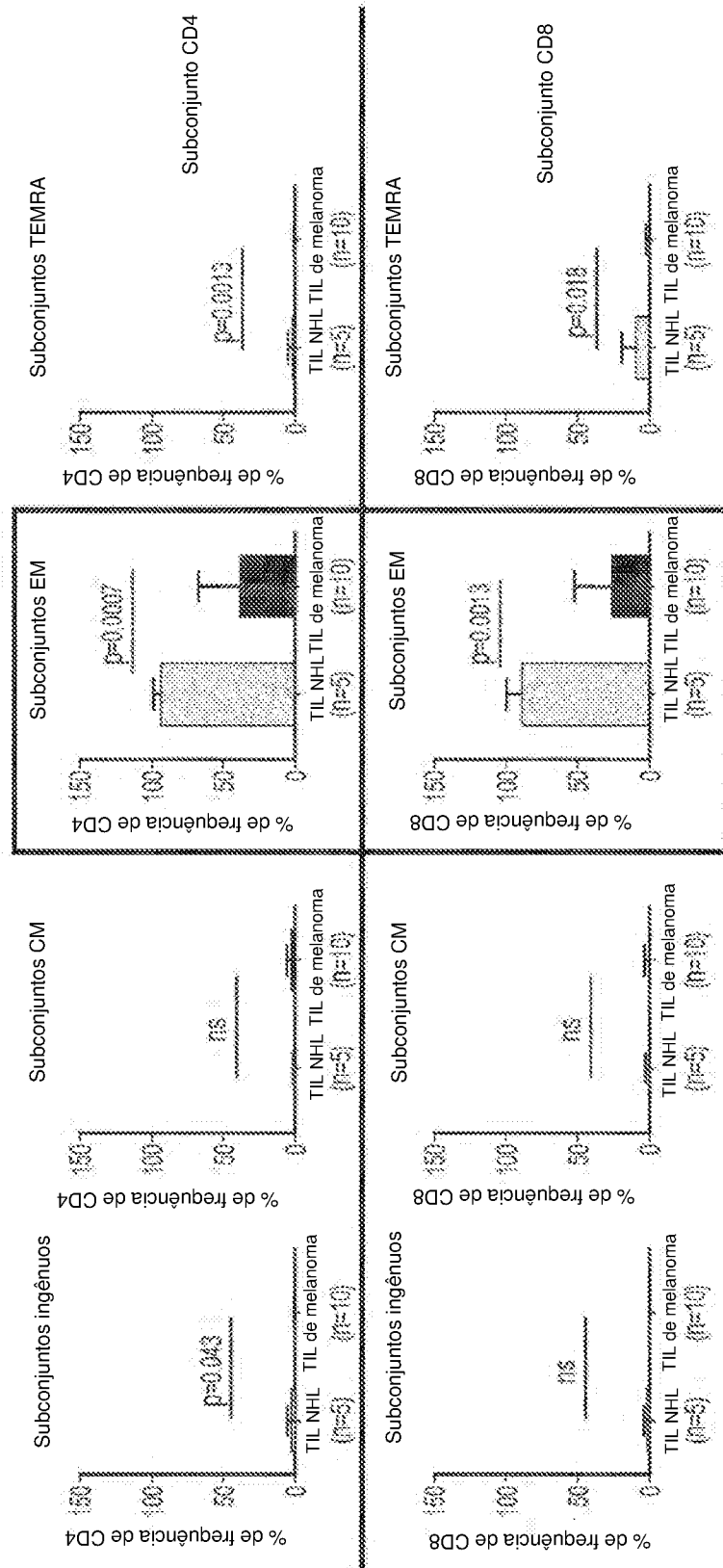


FIG. 2

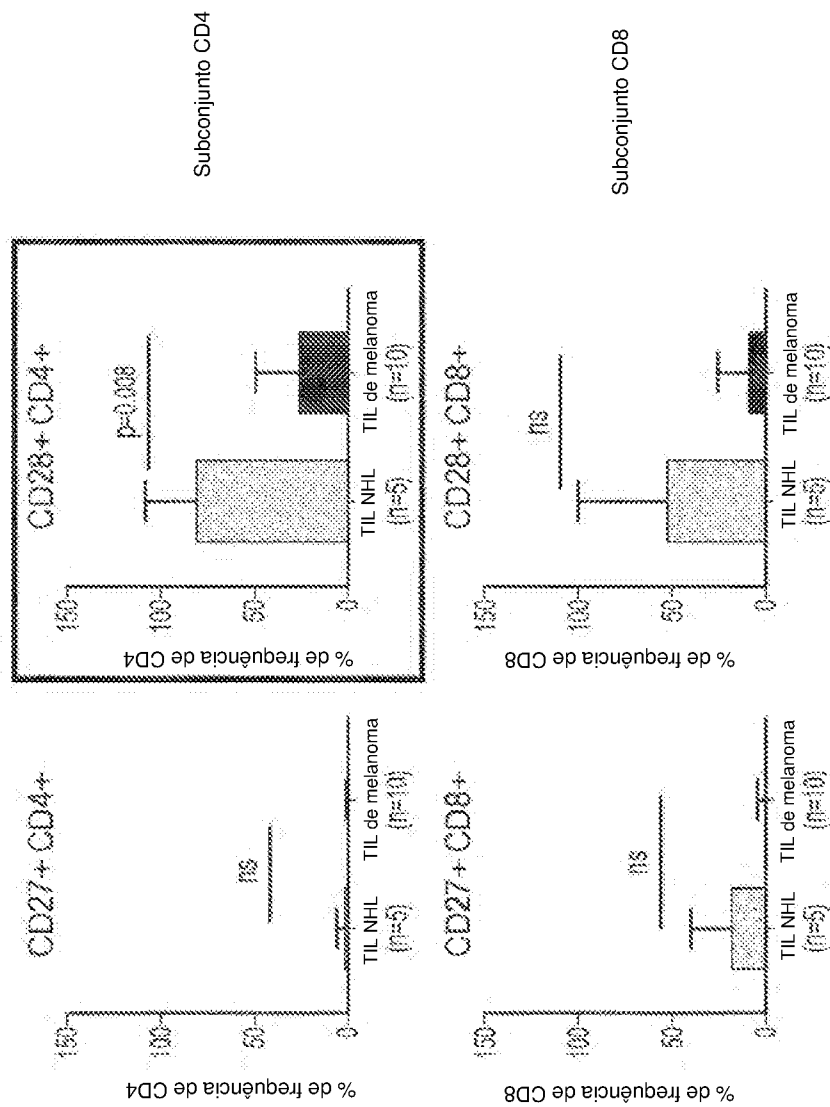


FIG. 3

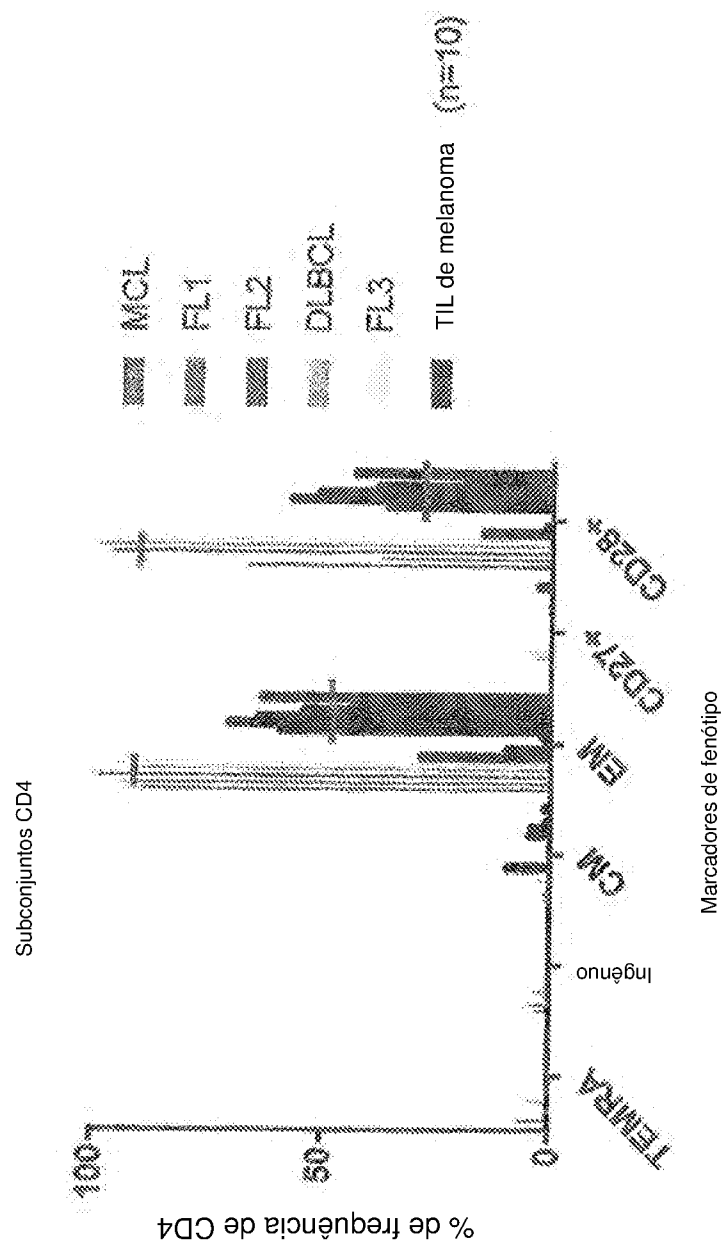


Fig. 4

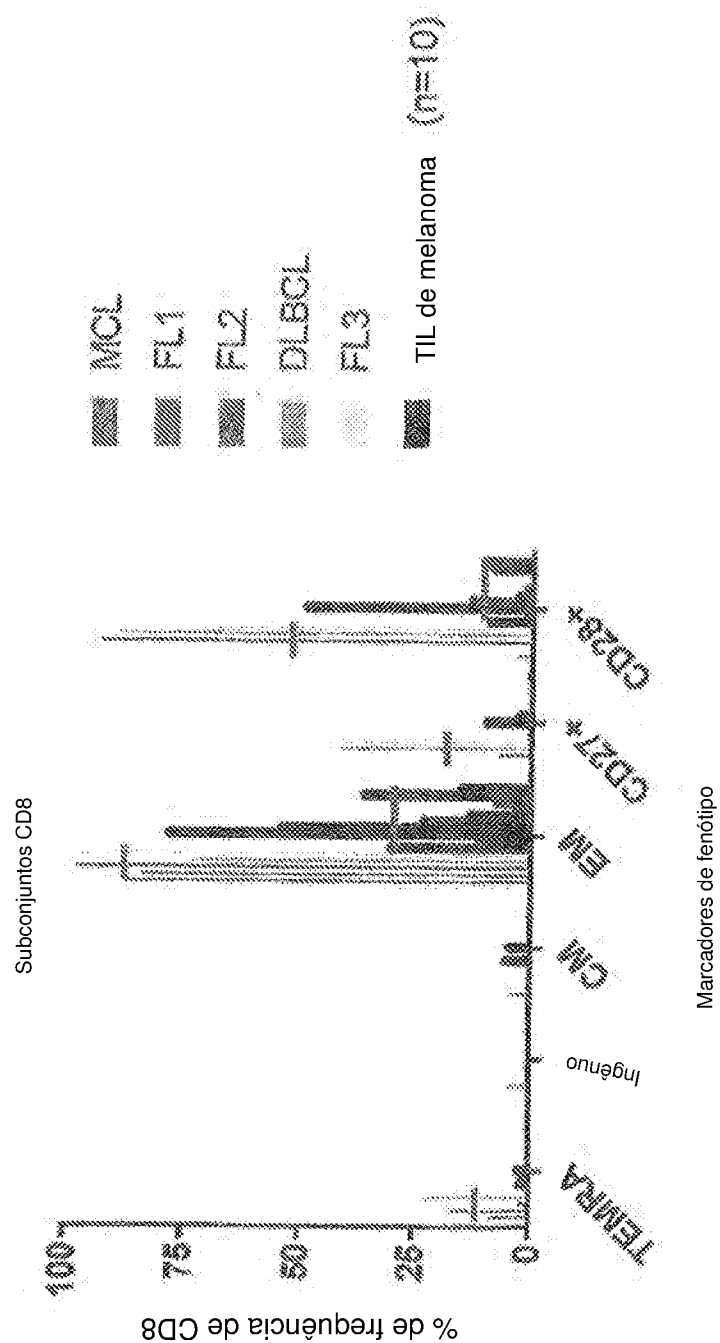


Fig. 5

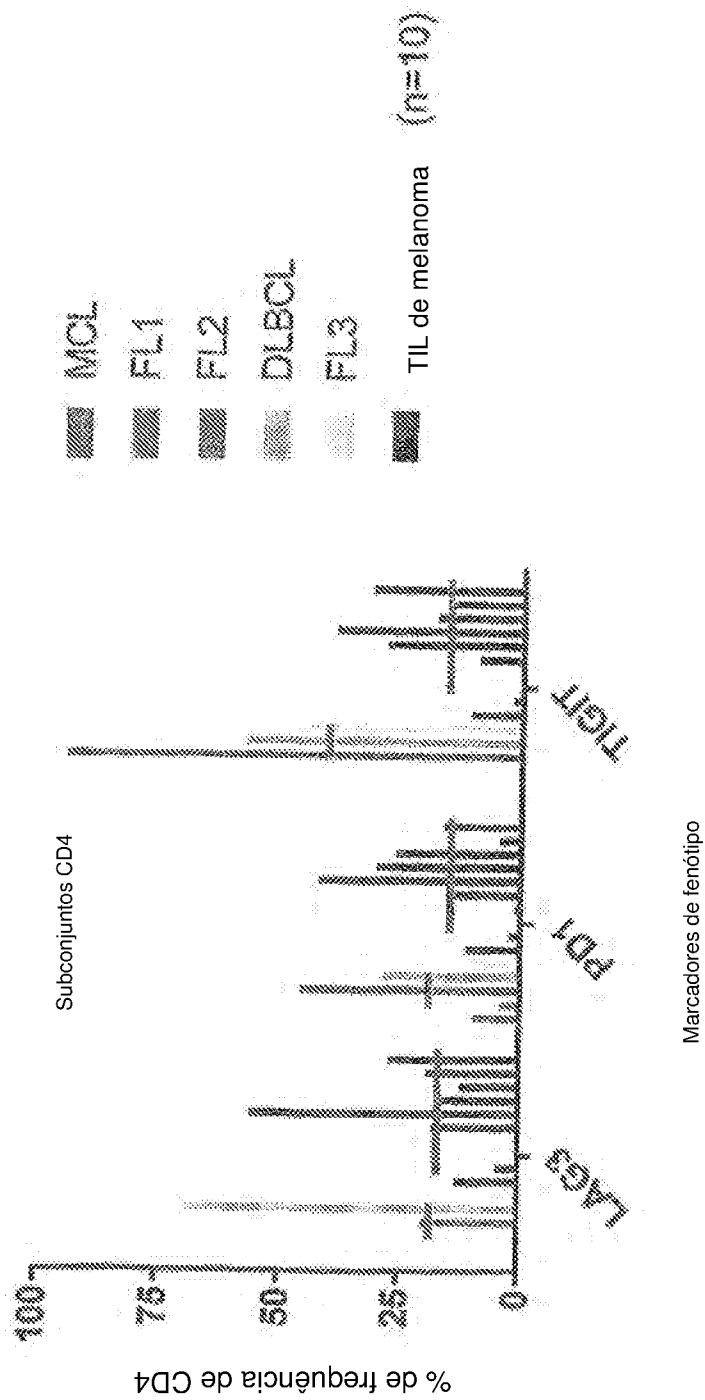


Fig. 6

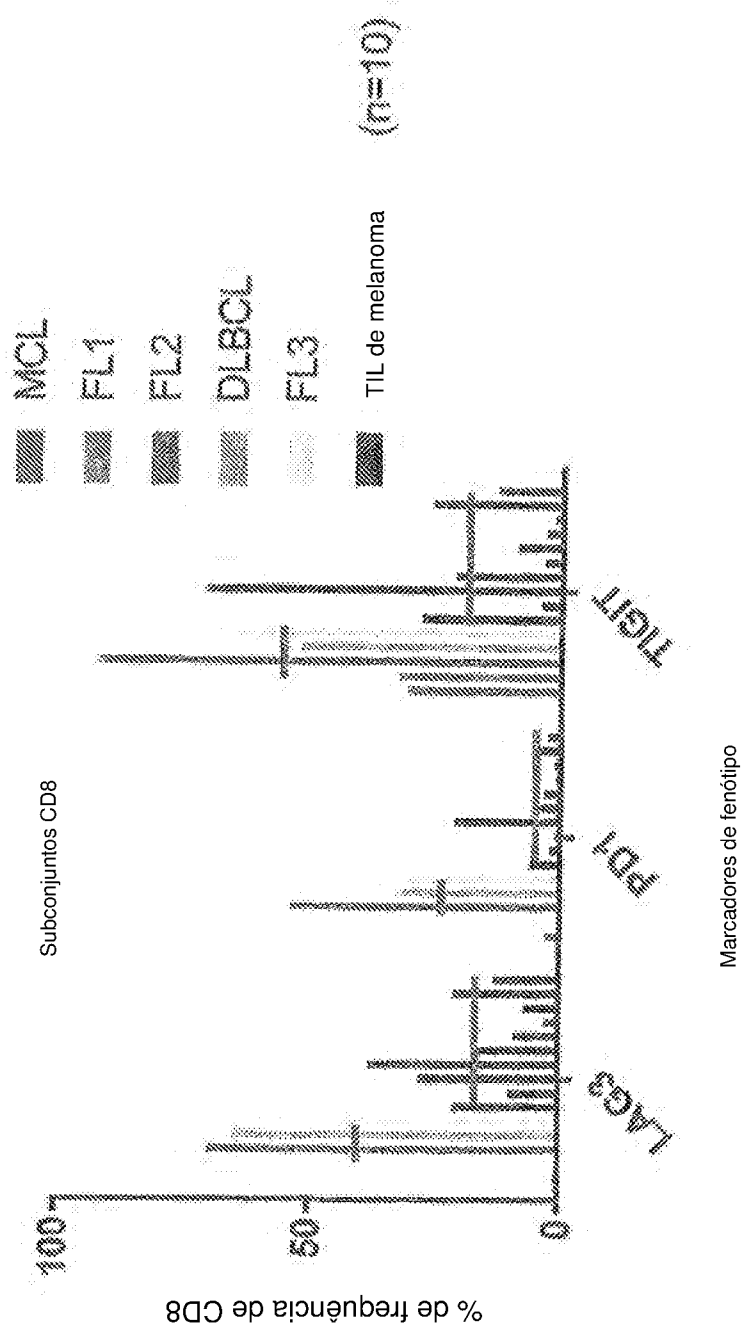


Fig. 7

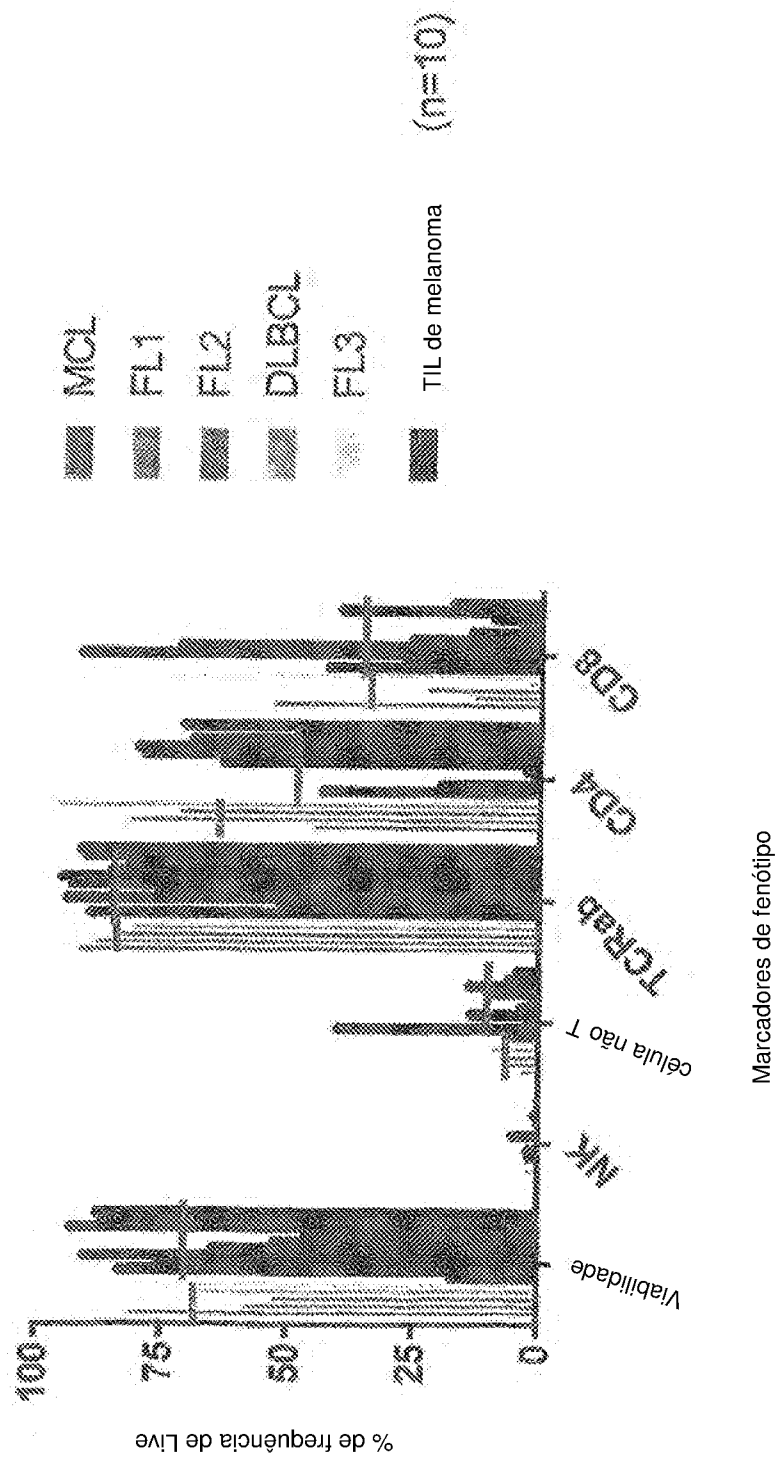


Fig. 8

Tipo de TIL	1	2	3	4	5
TIL de melanoma	6	7	8	9	10
TIL de linfoma	11	12	13	14	15

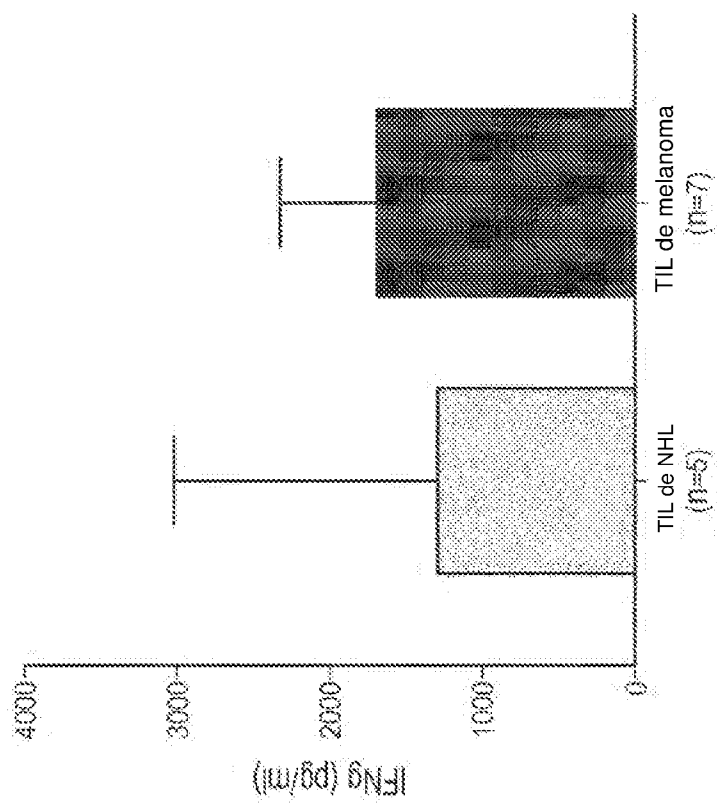


FIG. 10

TIL de linfoma

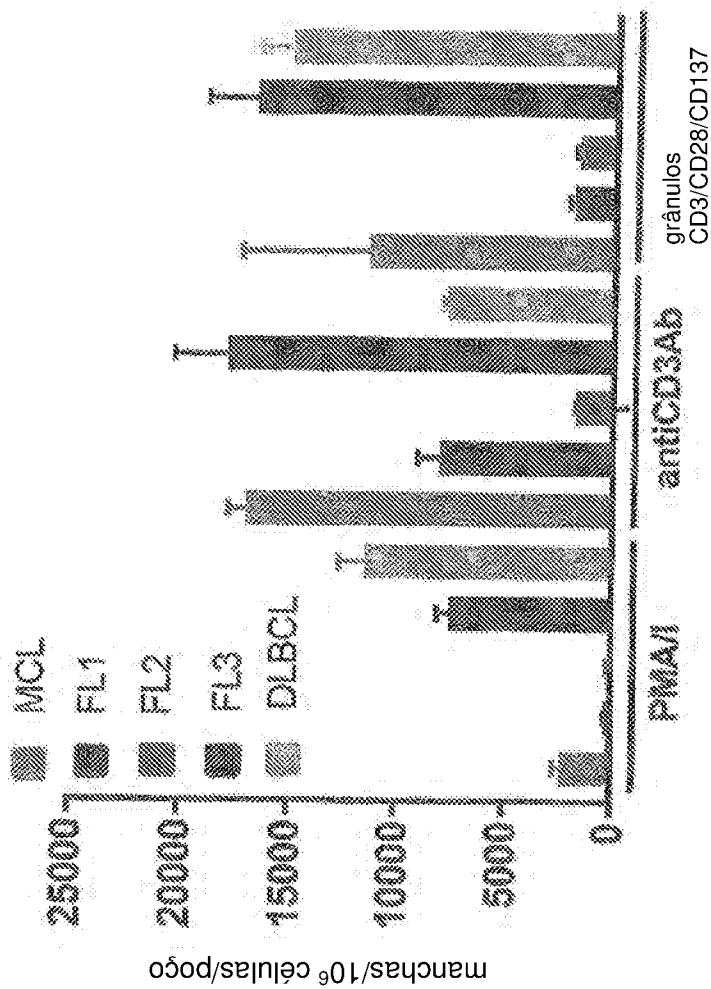


Fig. 12

TIL de melanoma

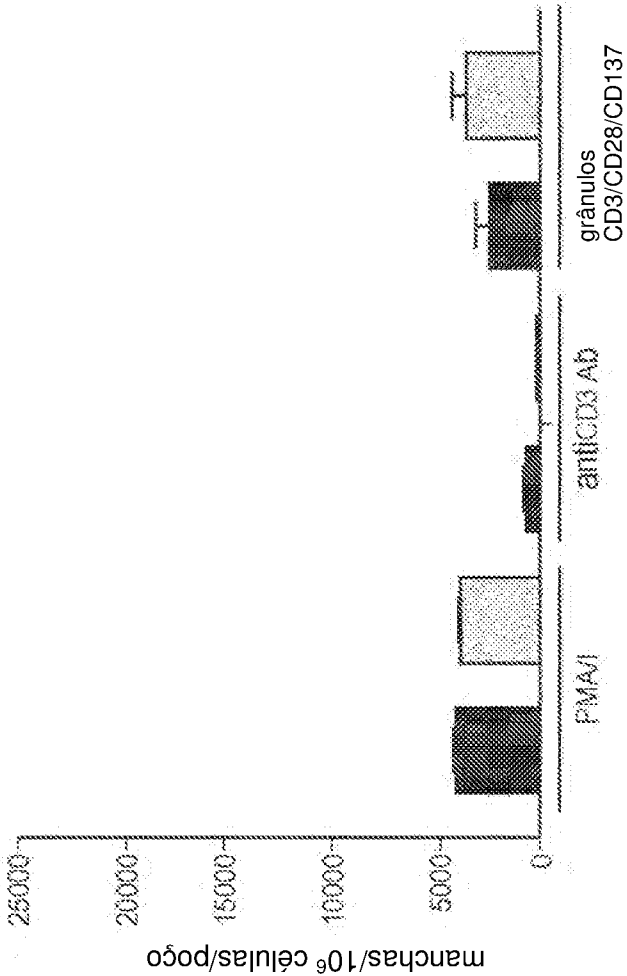
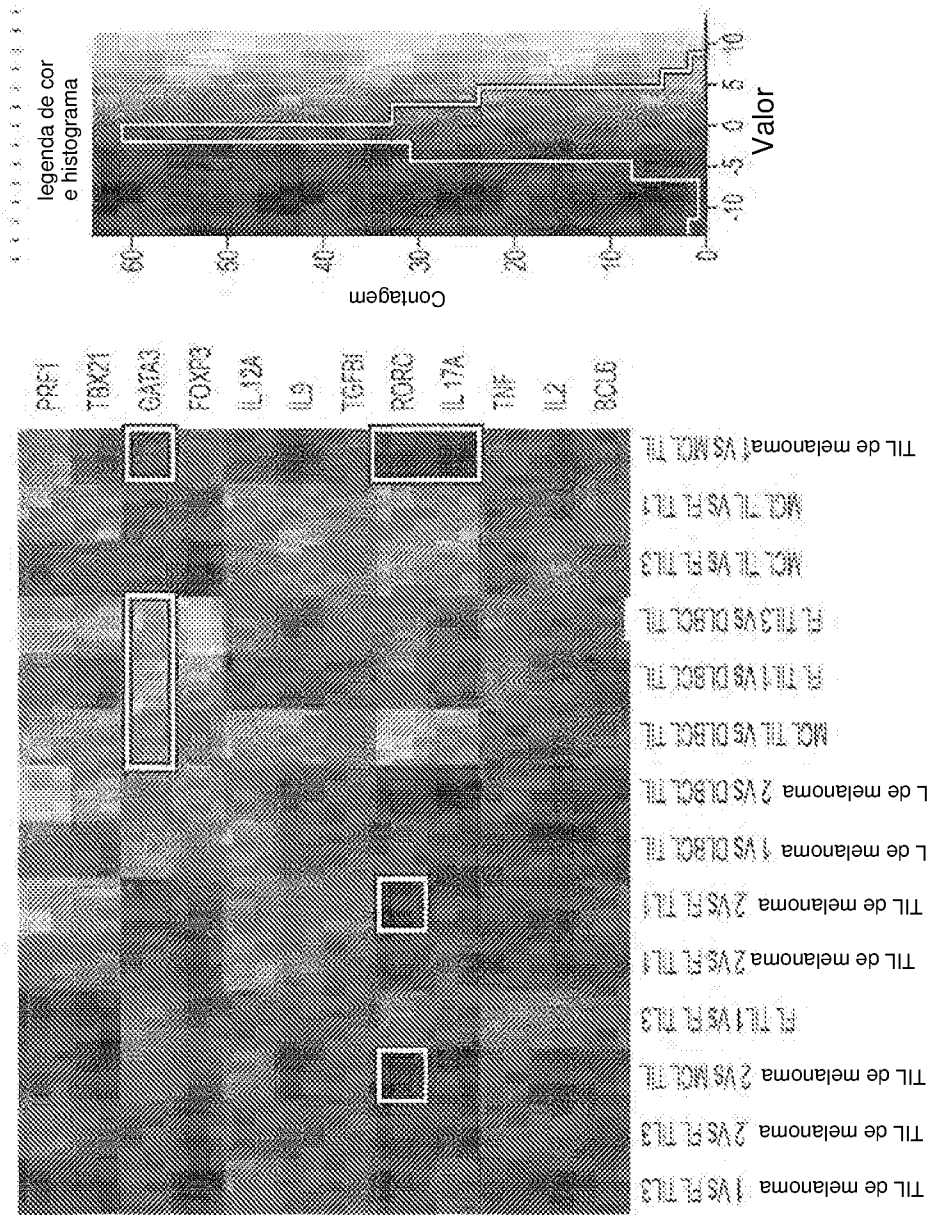


FIG. 12



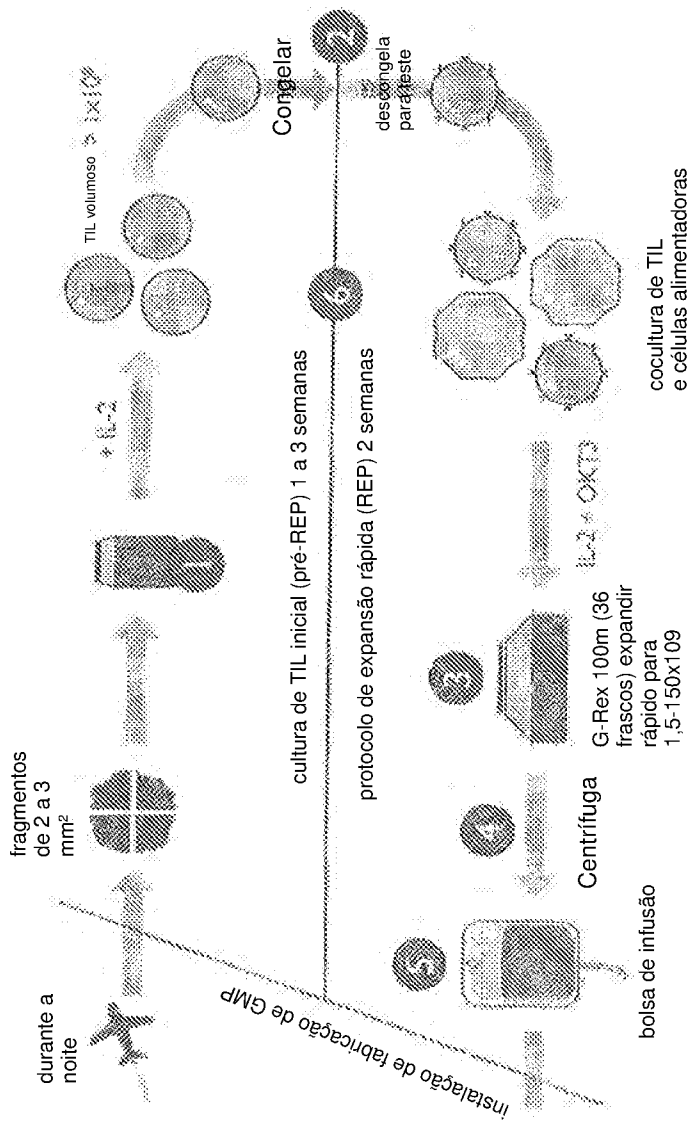


Fig. 14

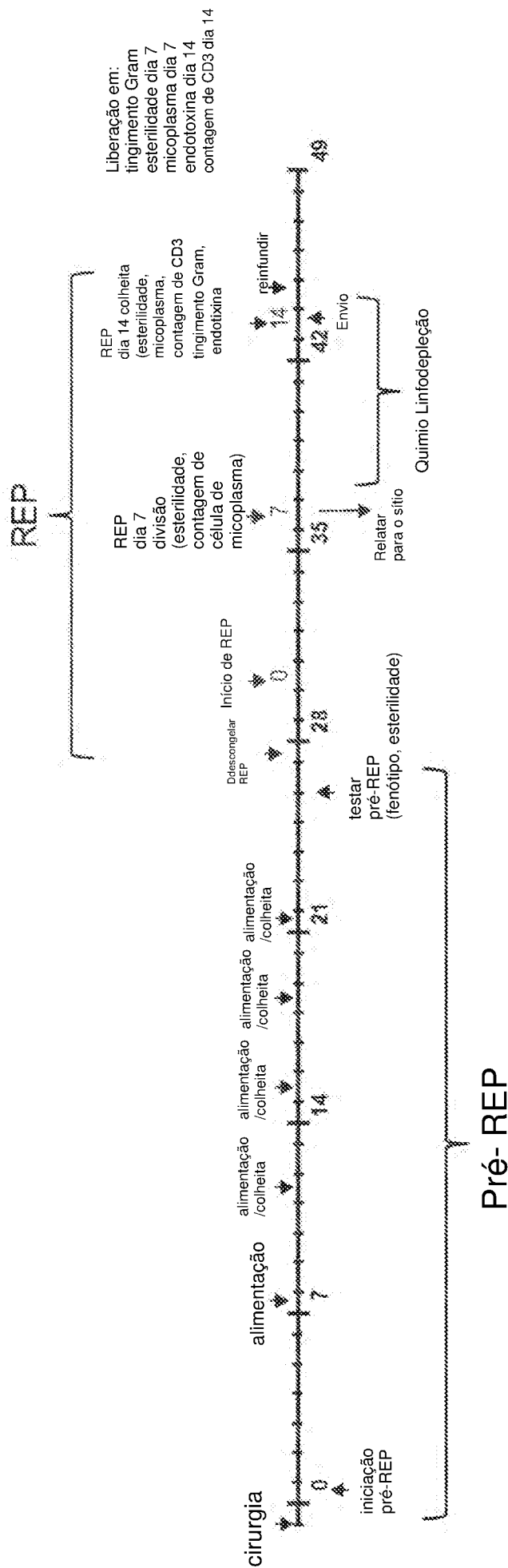


FIG. 15

FIG. 16A

Subconjuntos ingênuos

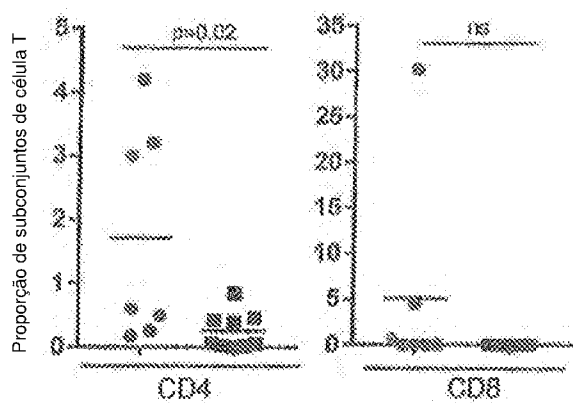


FIG. 16B

Subconjuntos CM

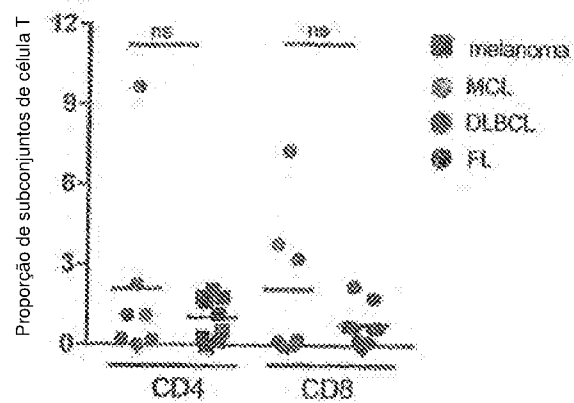


FIG. 16C

Subconjuntos EM

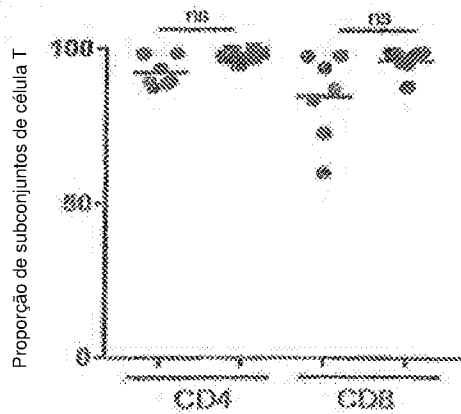


FIG. 16D

Subconjuntos TEMRA

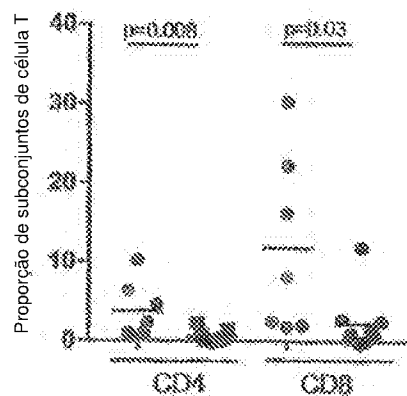


FIG. 17A CD27+

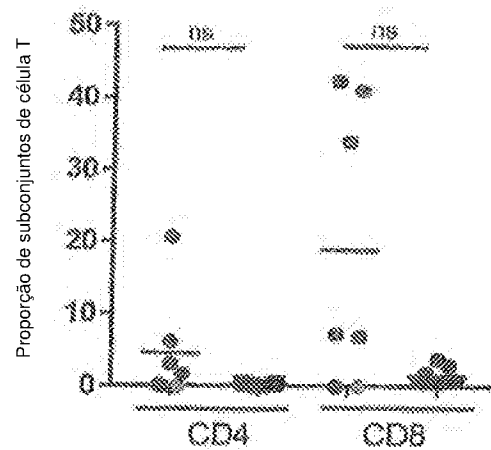


FIG. 17B CD28+

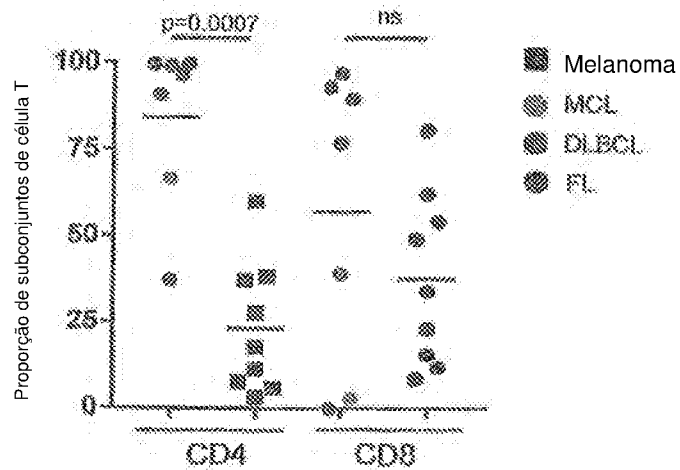


FIG. 18A

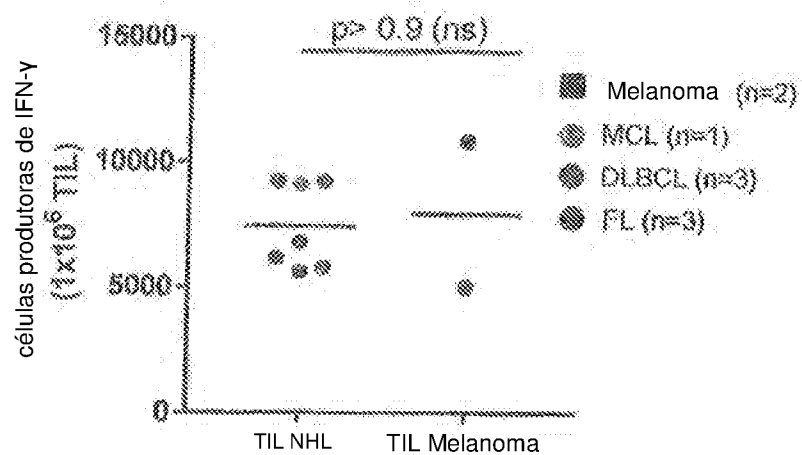


FIG. 18B

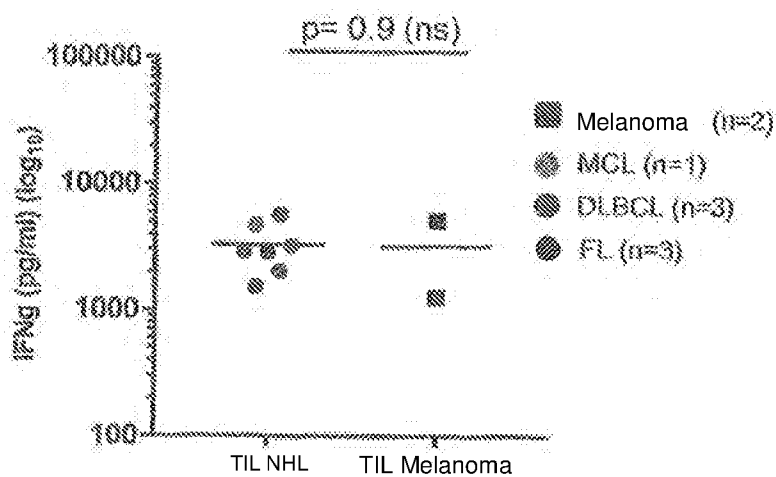


FIG. 19A

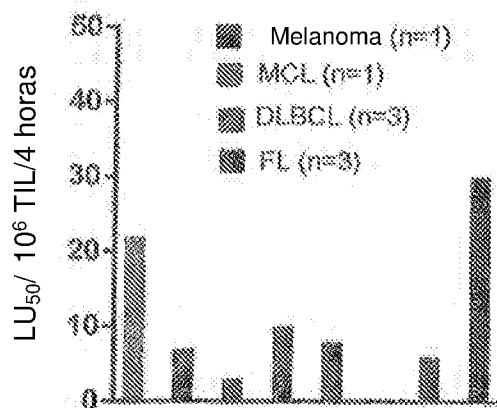
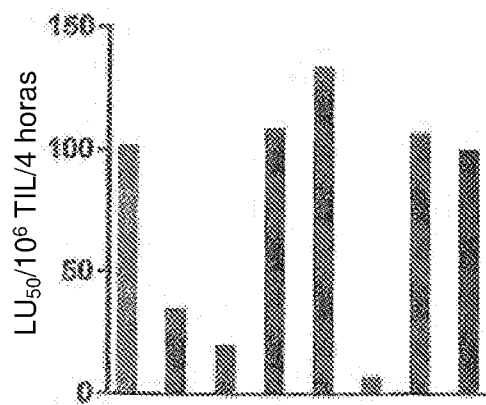


FIG. 19B



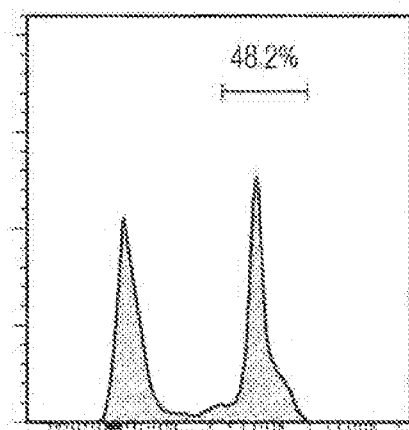


FIG. 20A

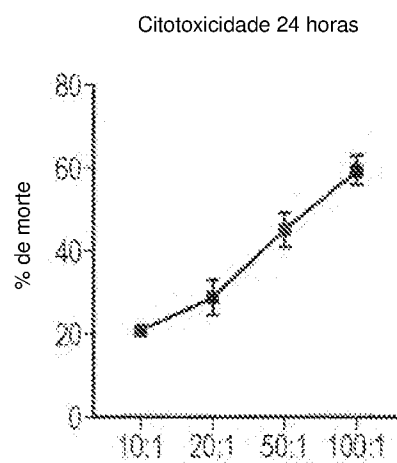


FIG. 20B

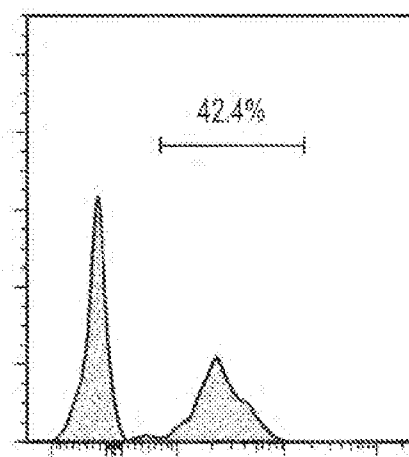


FIG. 20C

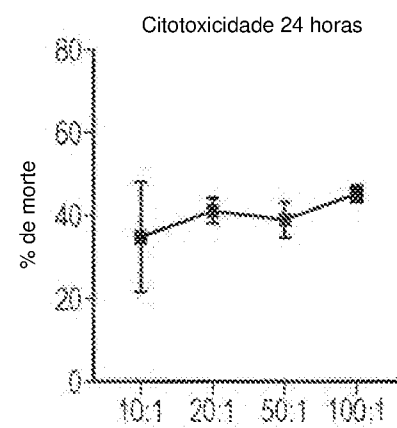


FIG. 20D

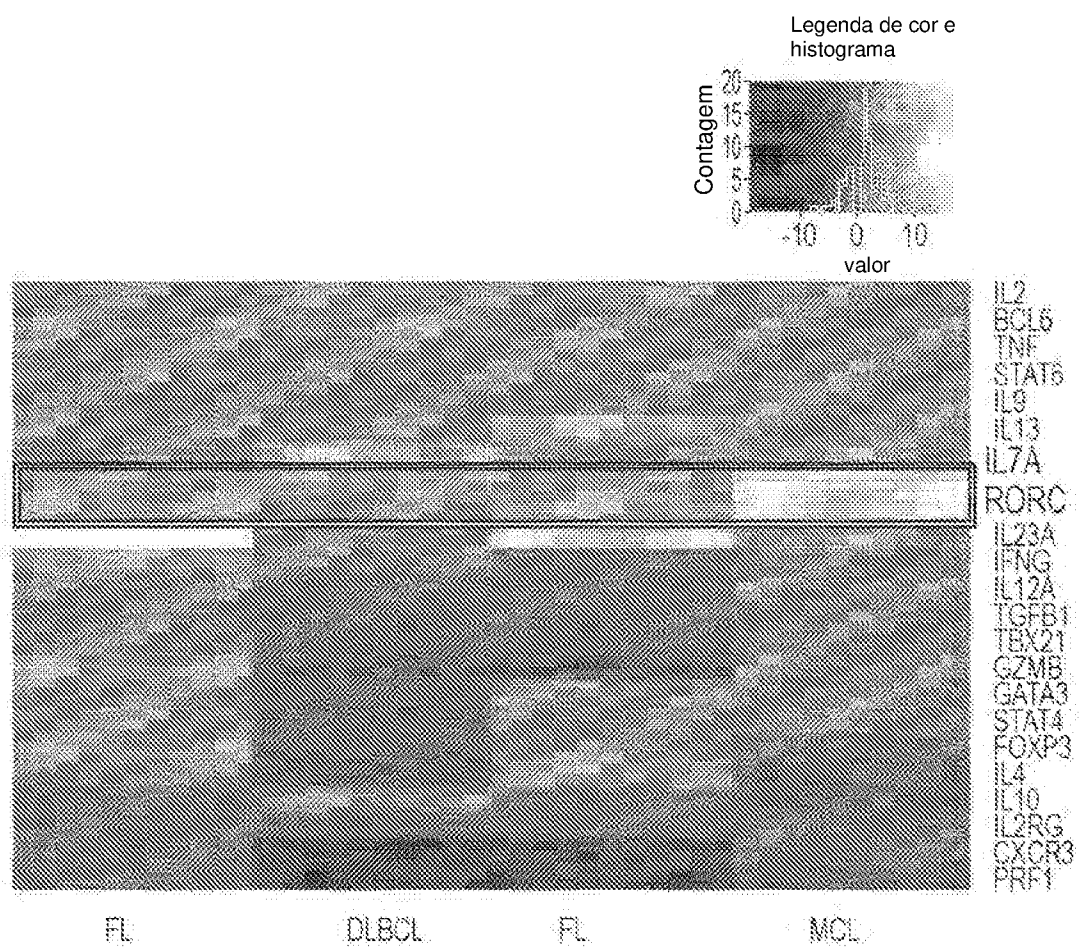


FIG. 21

Processo 2A – Processo de 22 dias, colheita em 2-3 dias/envio

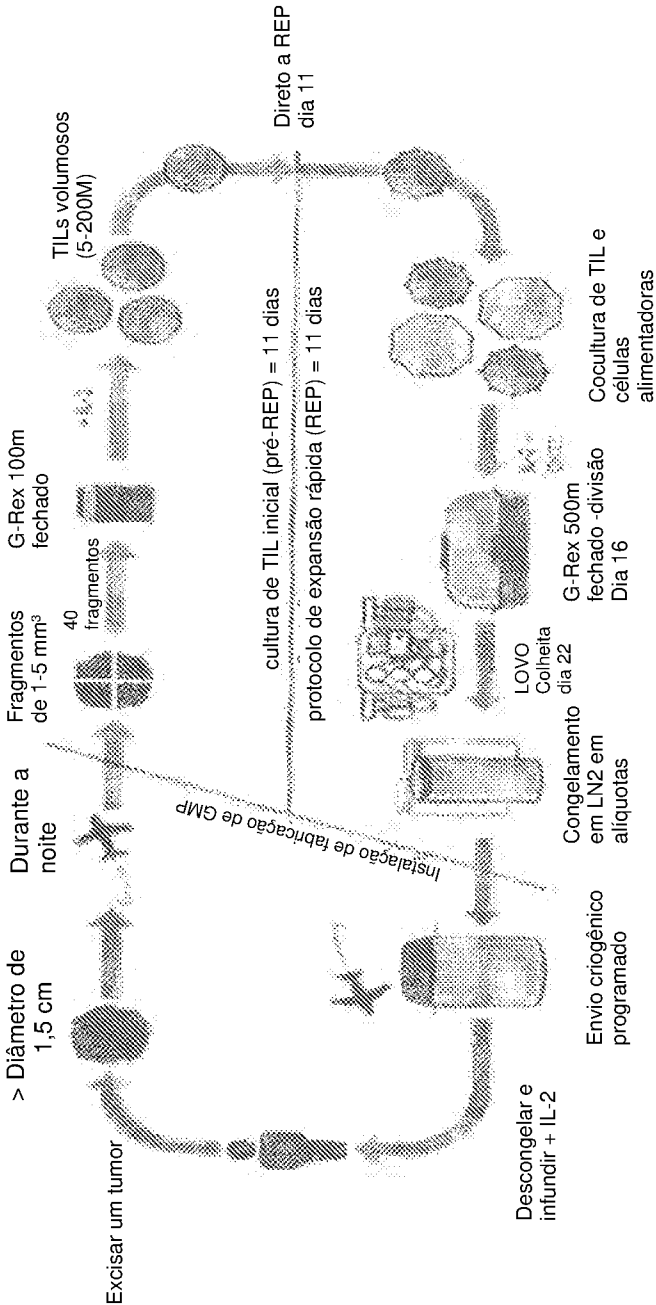


FIG. 22

FIG. 23

Processo 2A: cerca de 22 dias das etapas A-E

1. Etapa A

Obter amostra de tumor do paciente

2. Etapa B

Fragmentação e primeira expansão 3 dias a 14 dias

3. Etapa C

Transição da primeira expansão para a segunda expansão

Nenhuma armazenagem de sistema fechado

4. Etapa D

Segunda expansão
IL-2, OKT-3 e células alimentadoras que apresentam antígeno

Sistema fechado

5. Etapa E

Colher TILS da etapa D

Sistema fechado

6. Etapa F

Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão

(opcionalmente criopreservar)

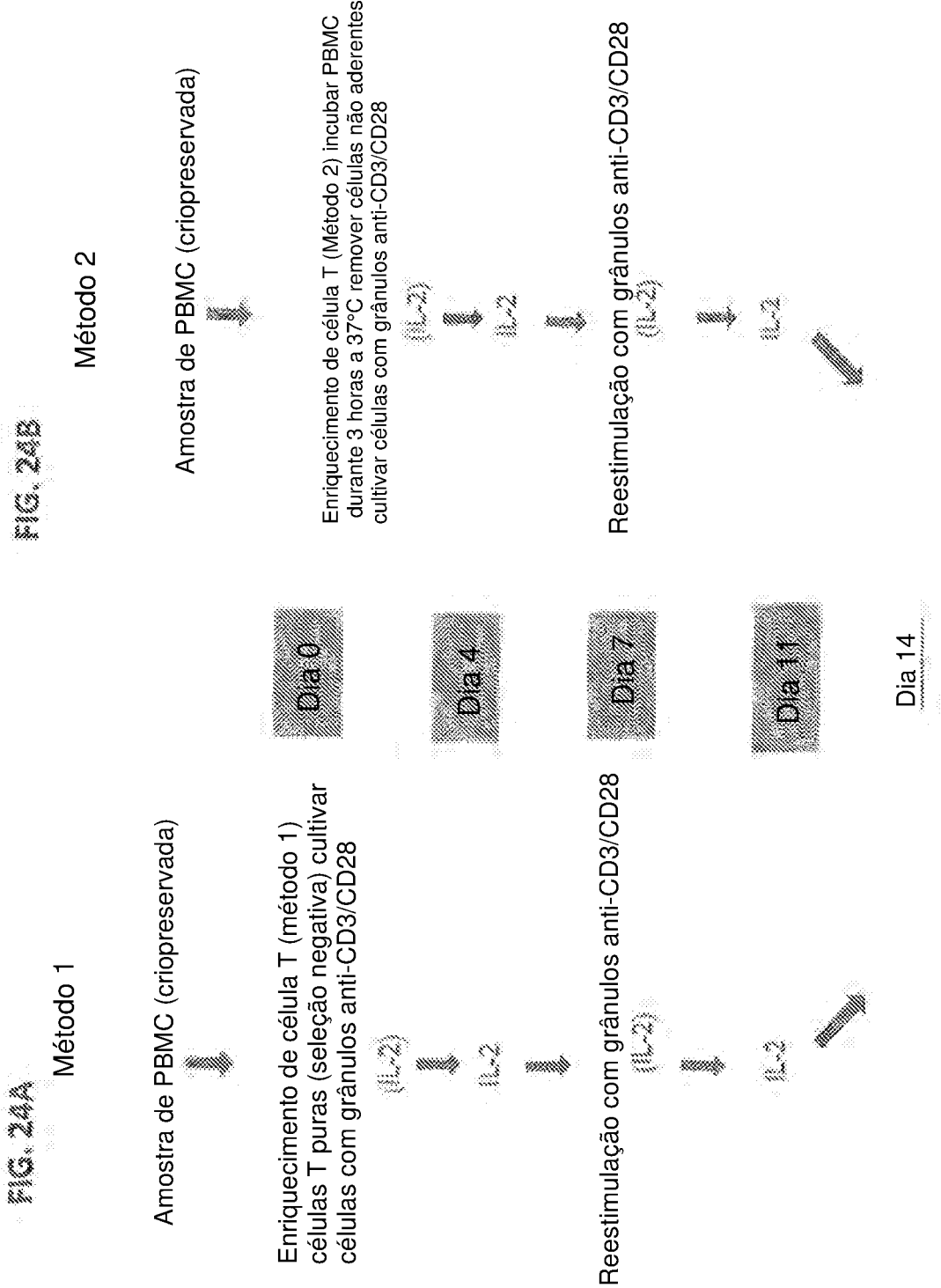
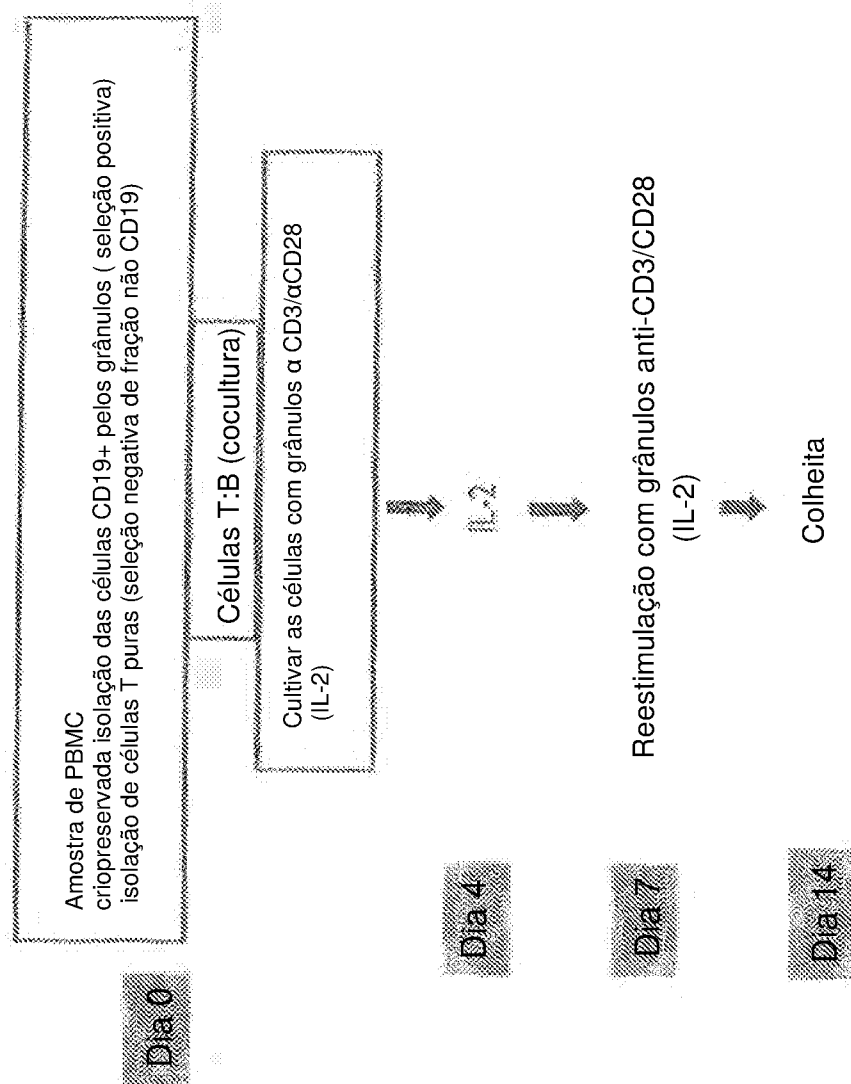
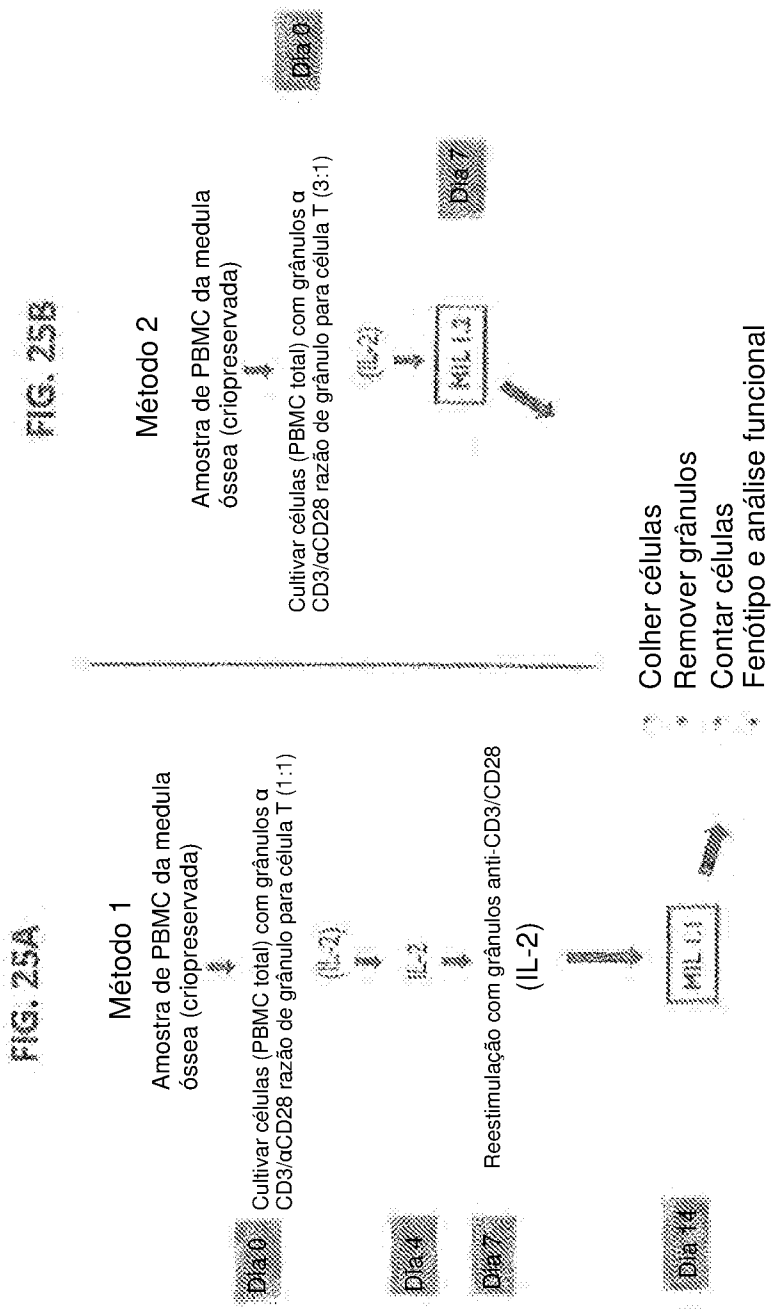


FIG. 24C

Método 3





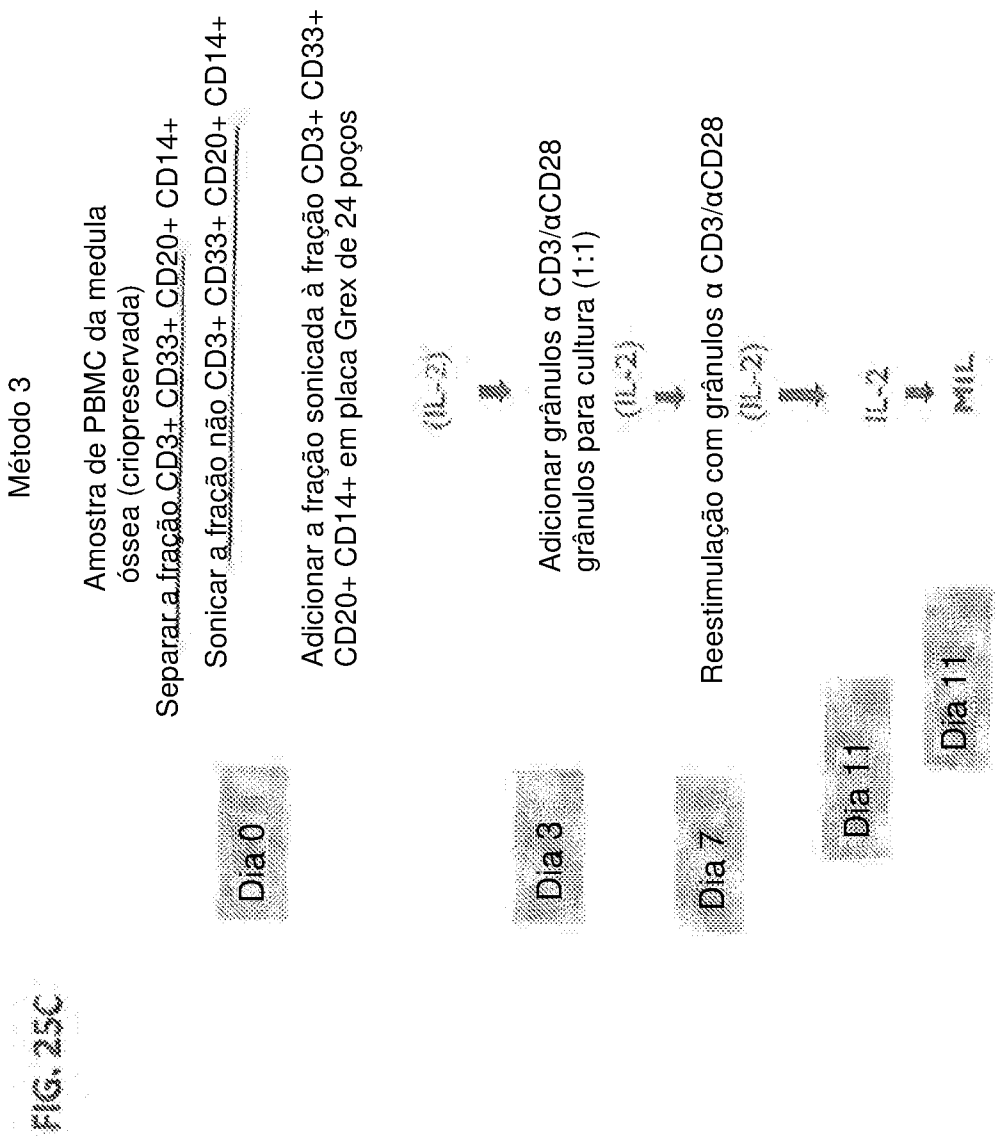


FIG. 26

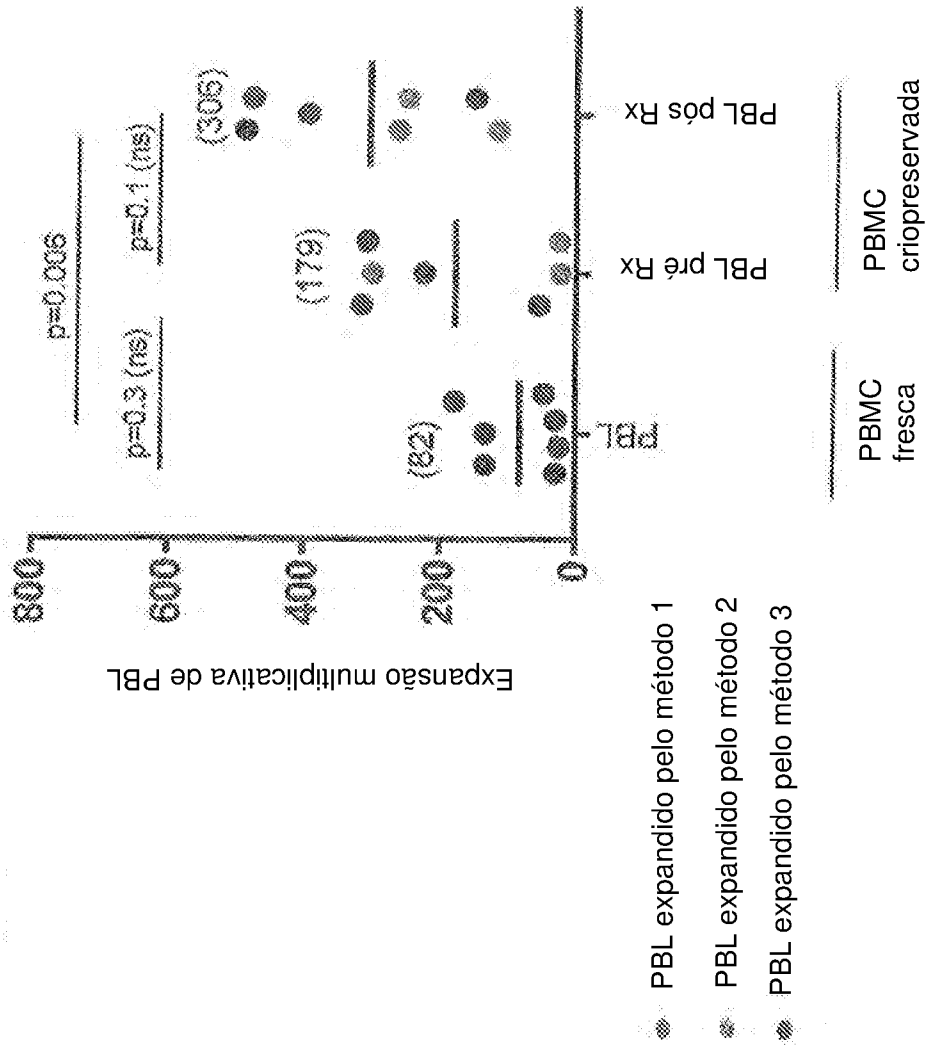
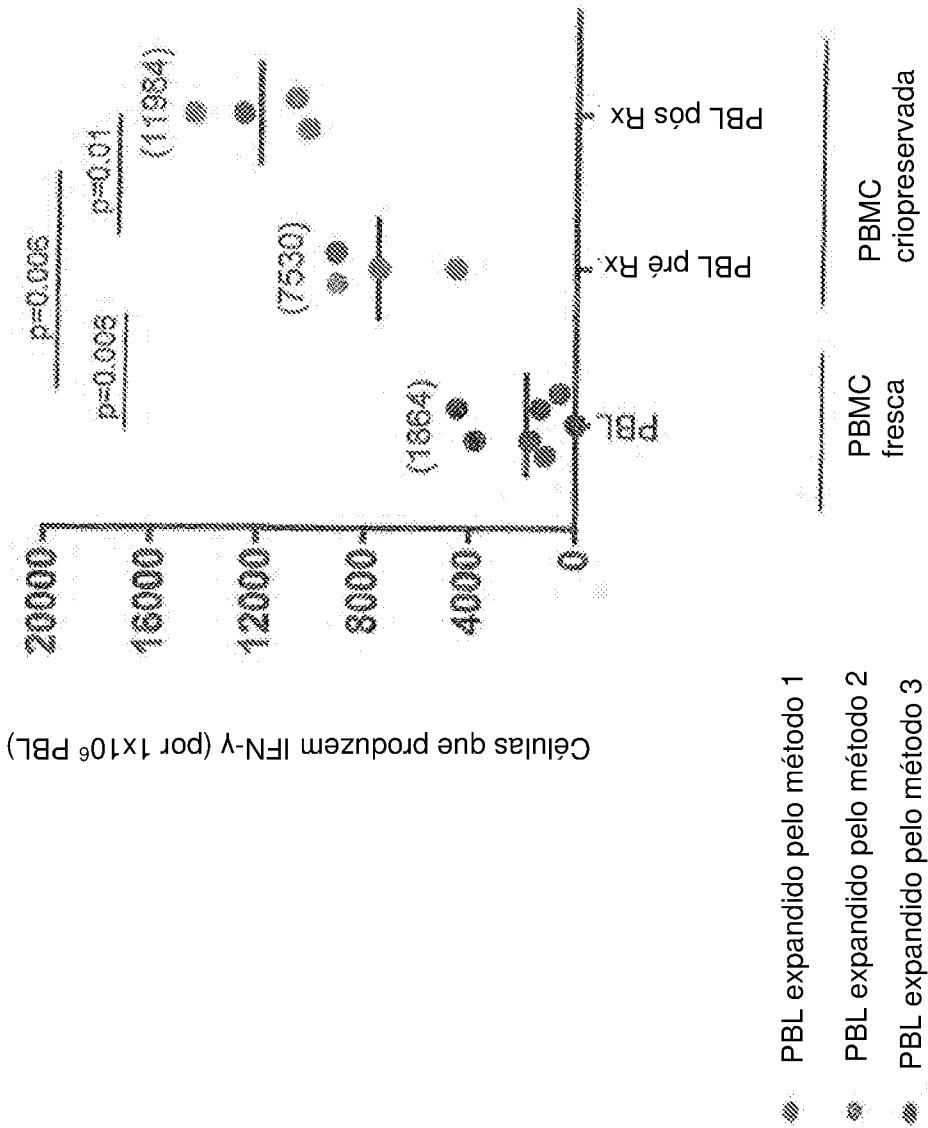


FIG. 27



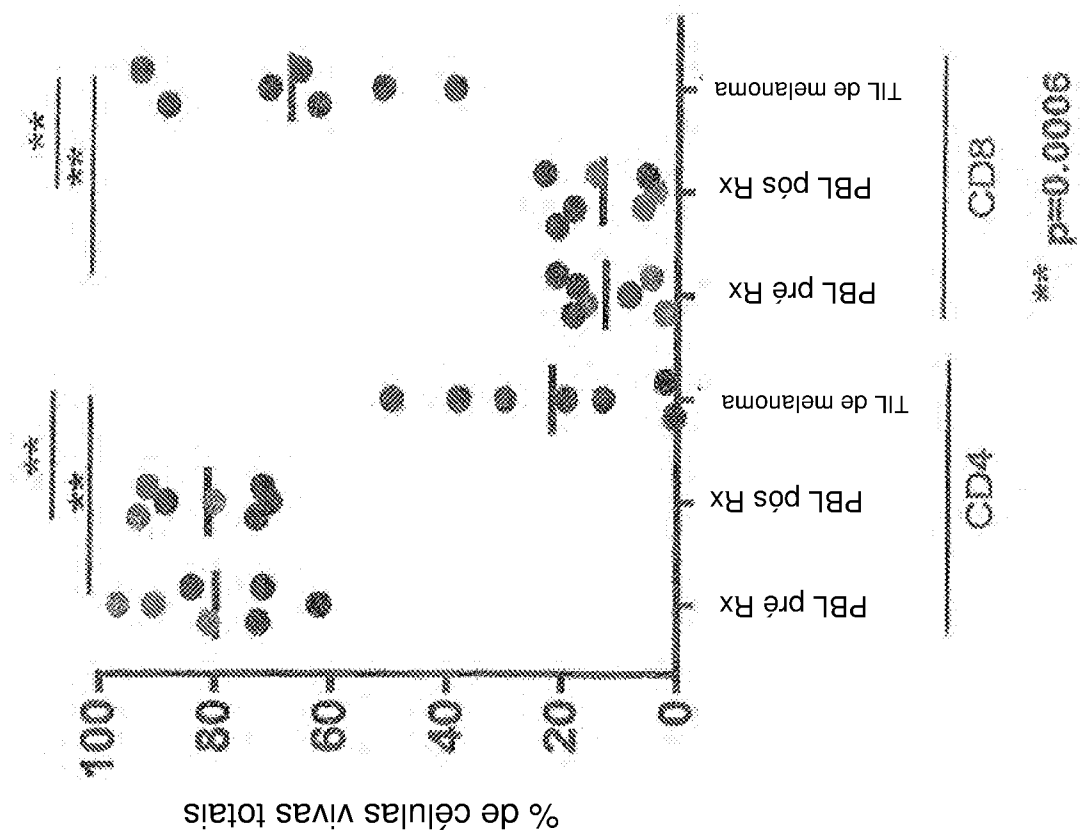
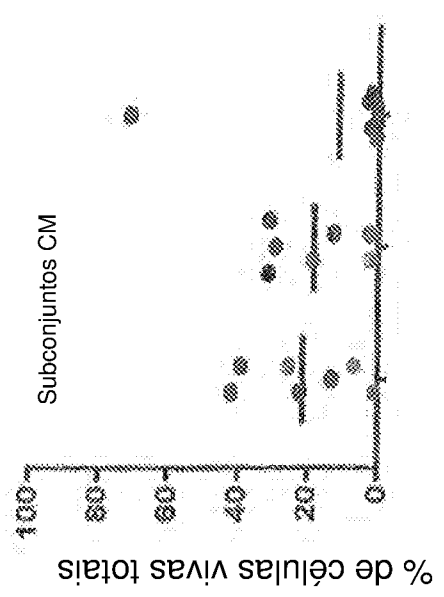
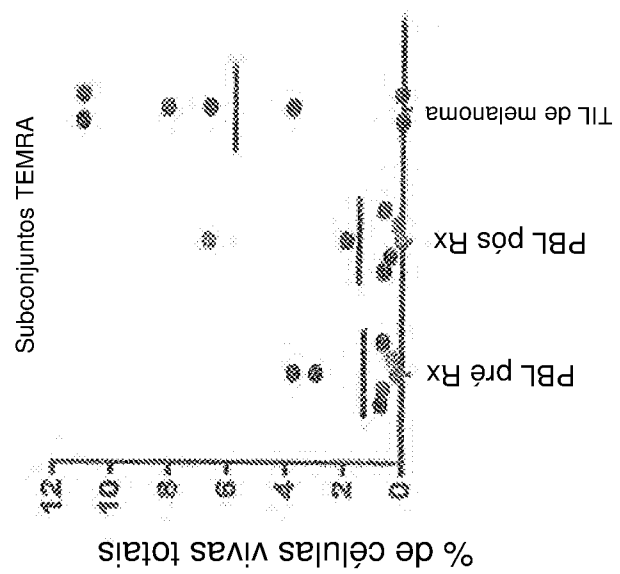
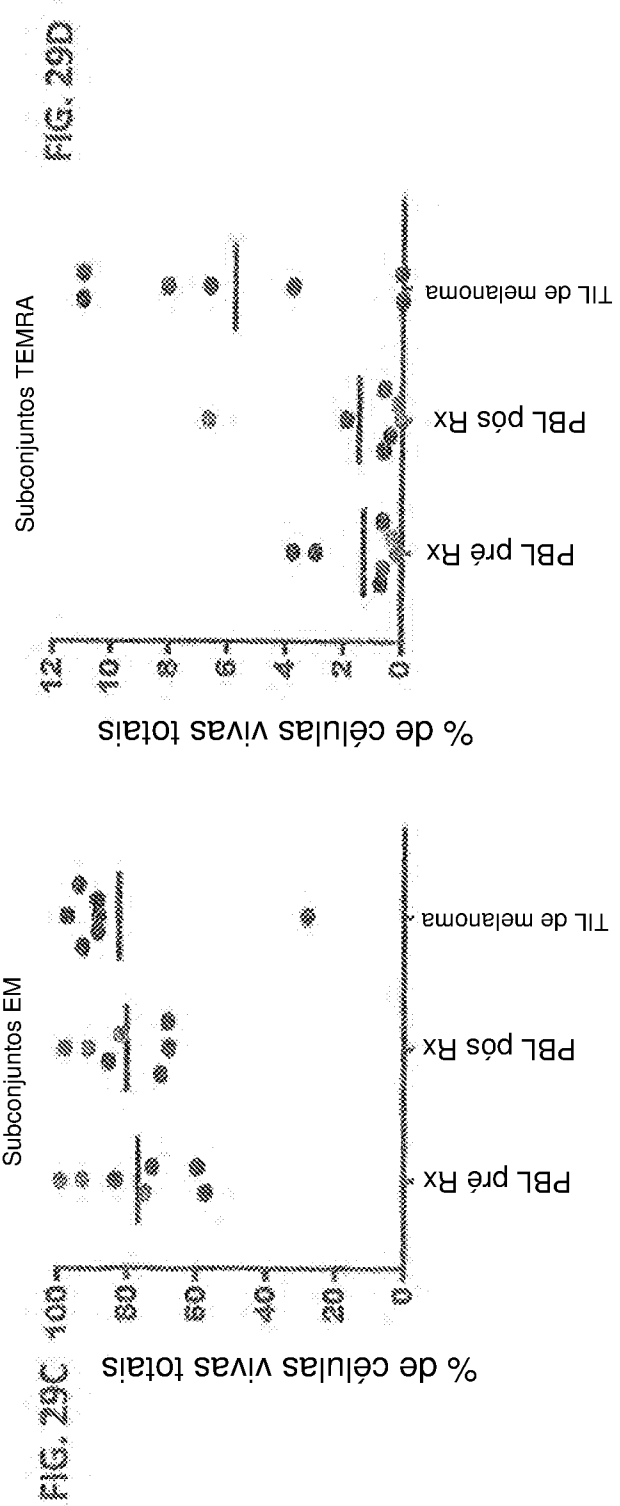
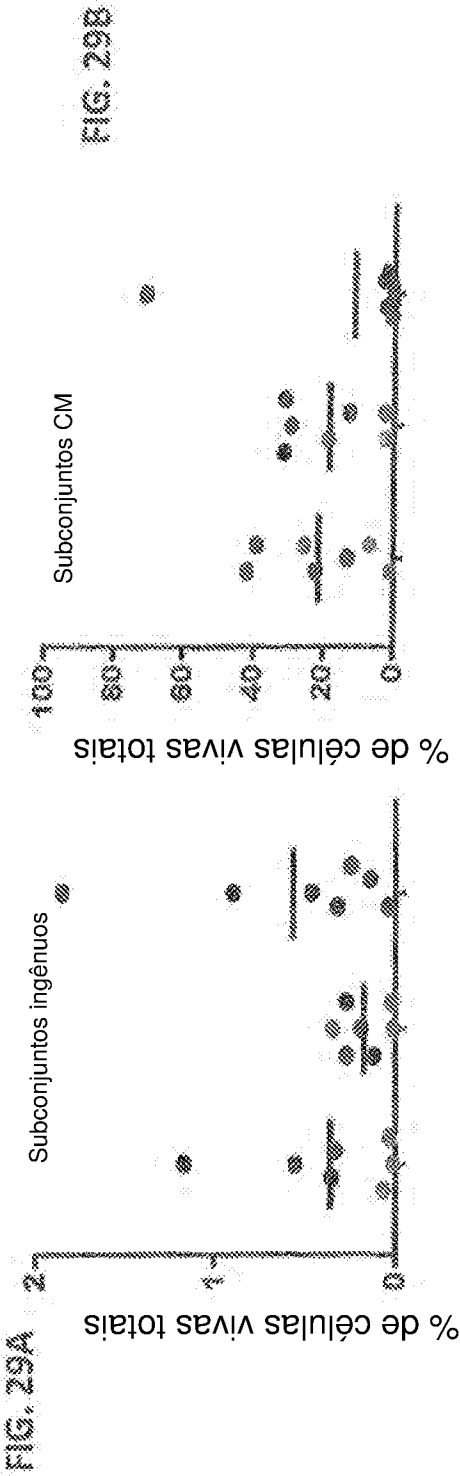
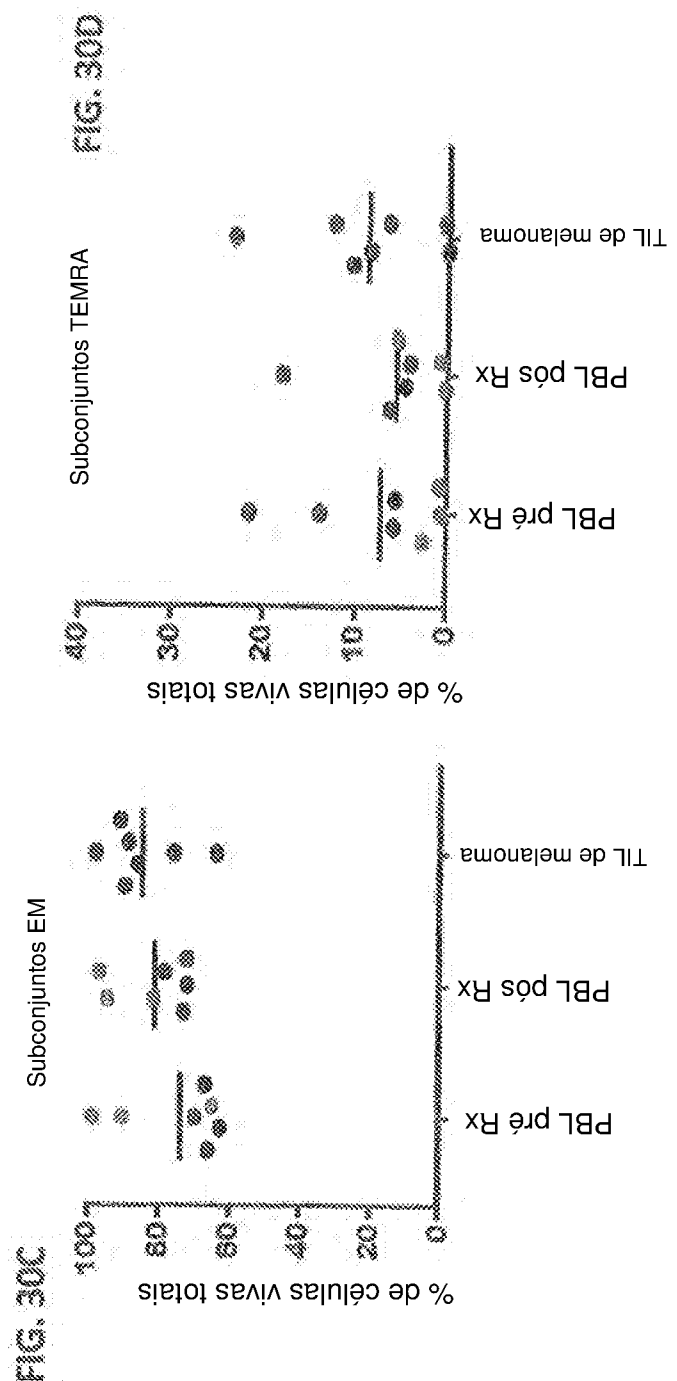
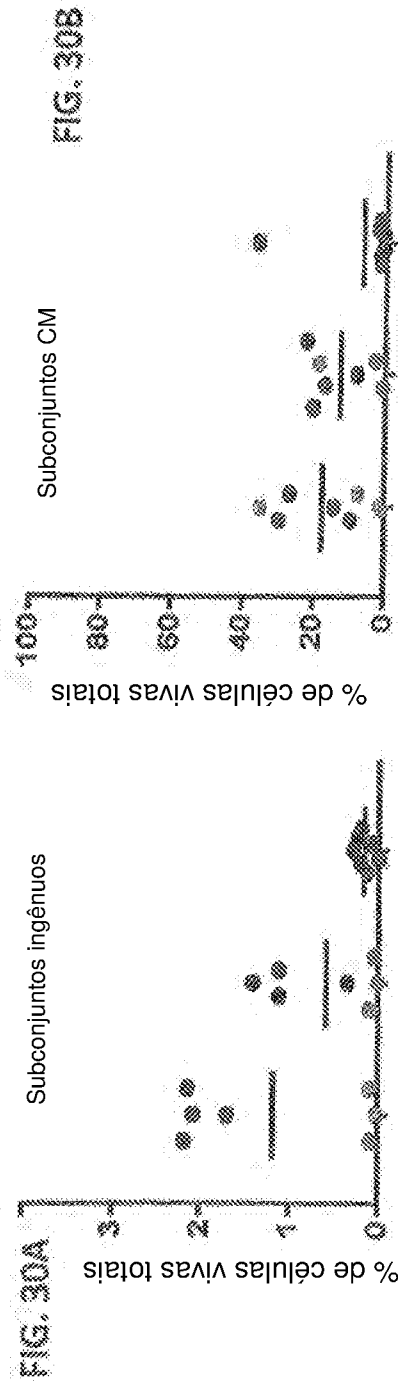
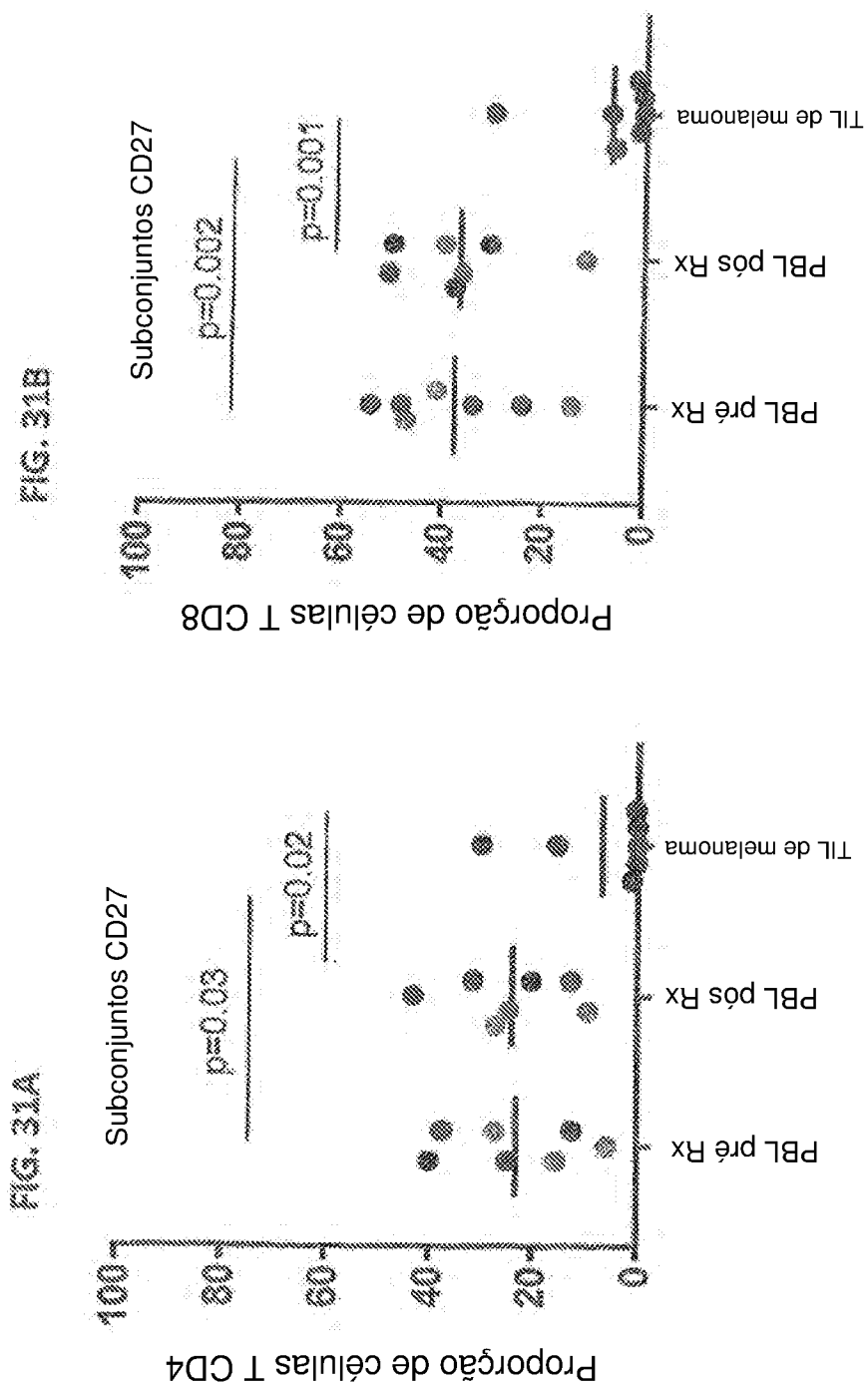
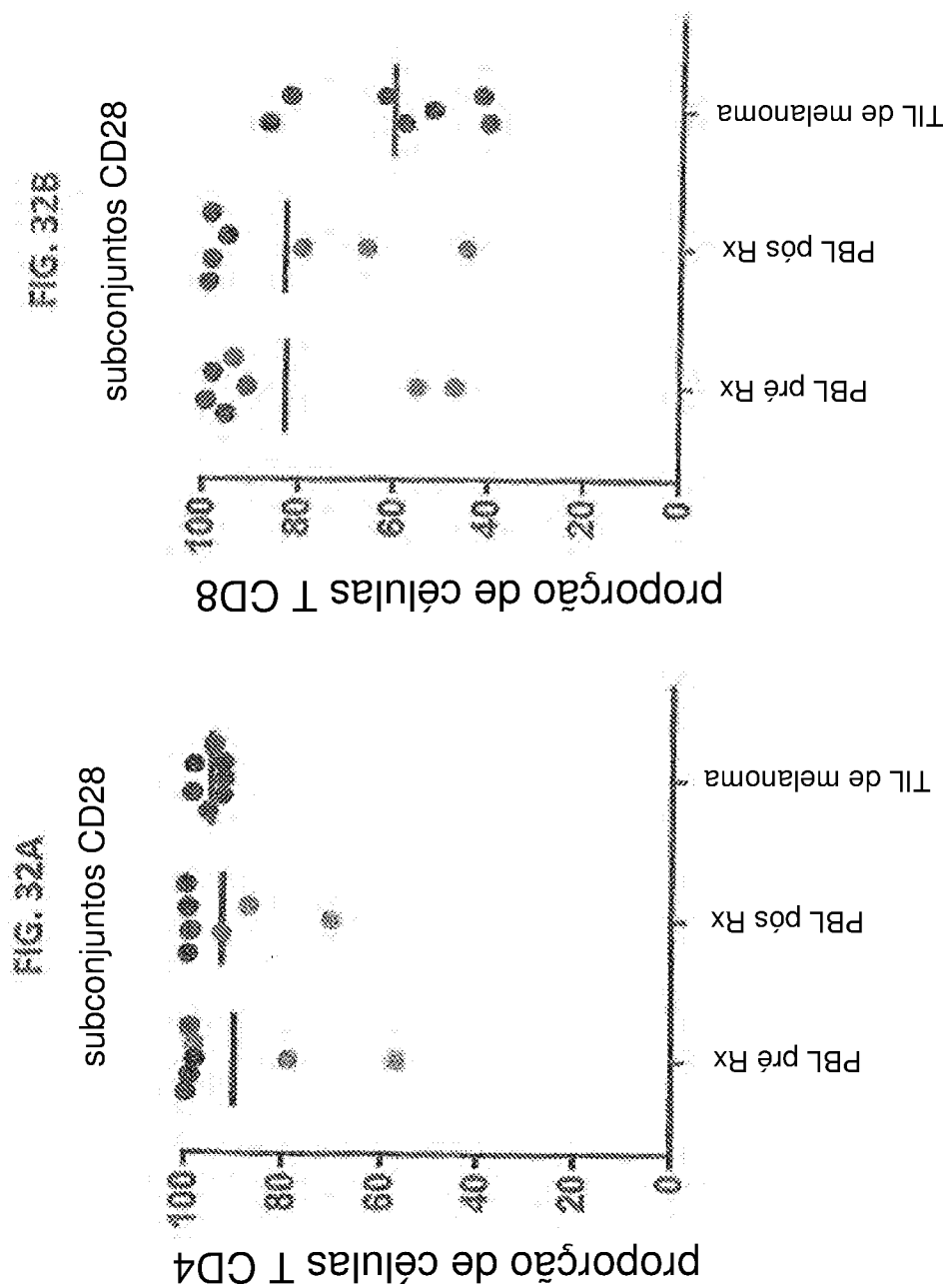


FIG. 28









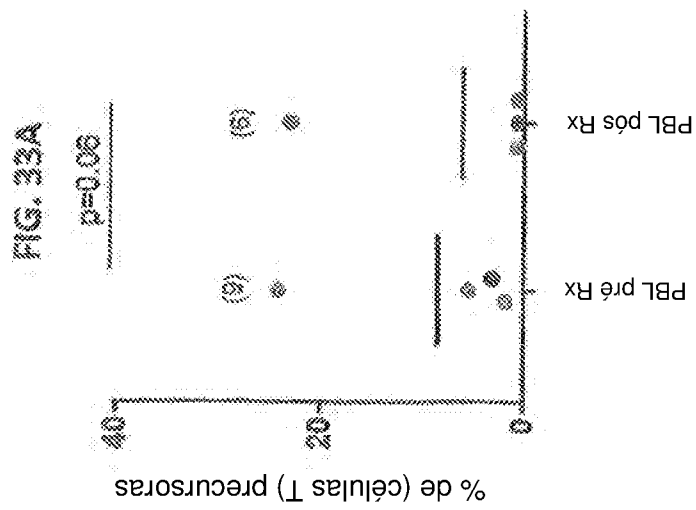
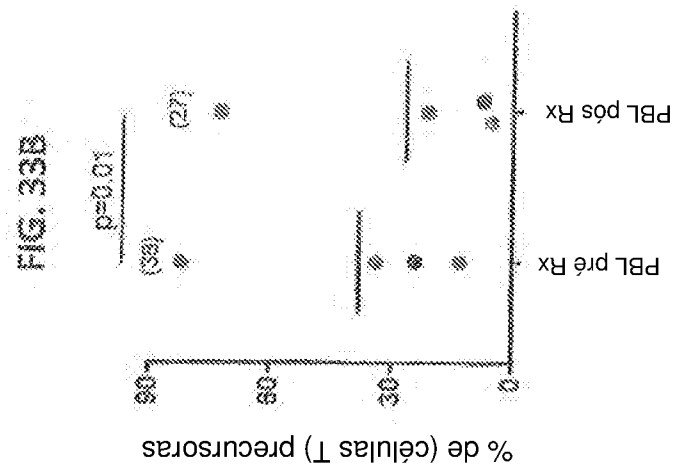


FIG. 34B

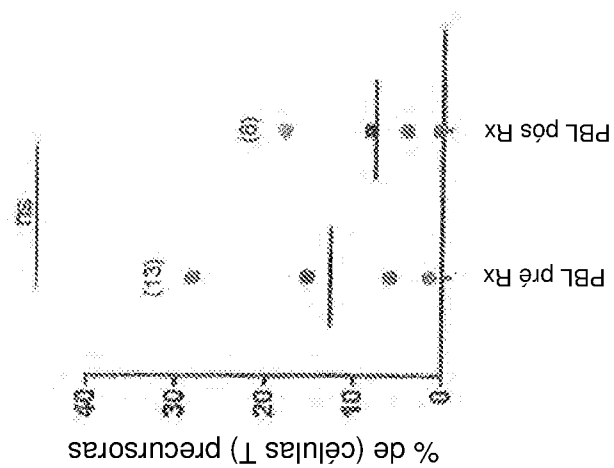
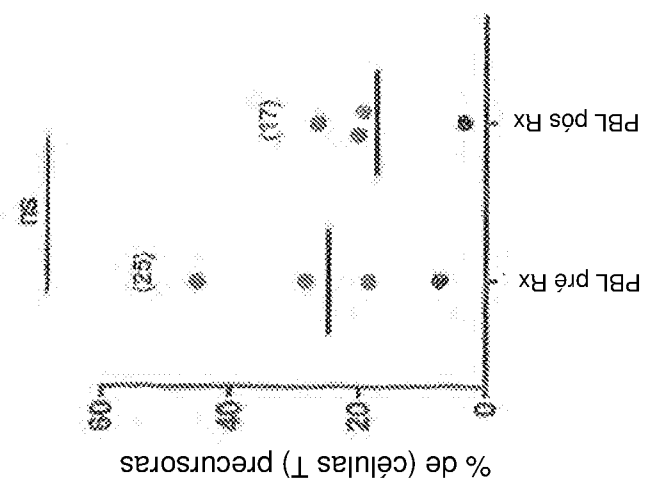


FIG. 34A



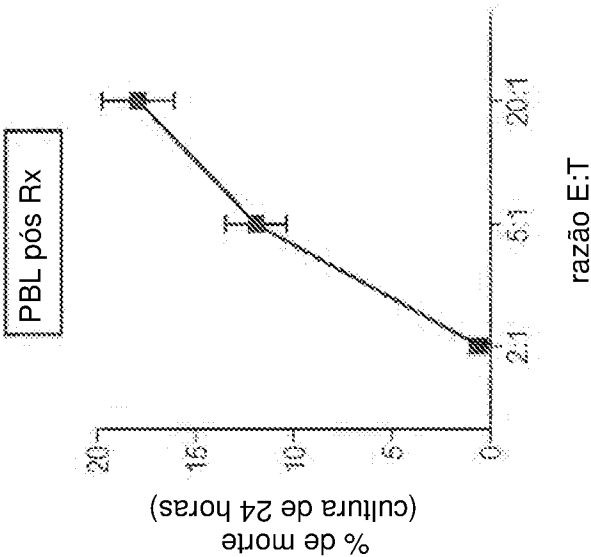


FIG. 35B

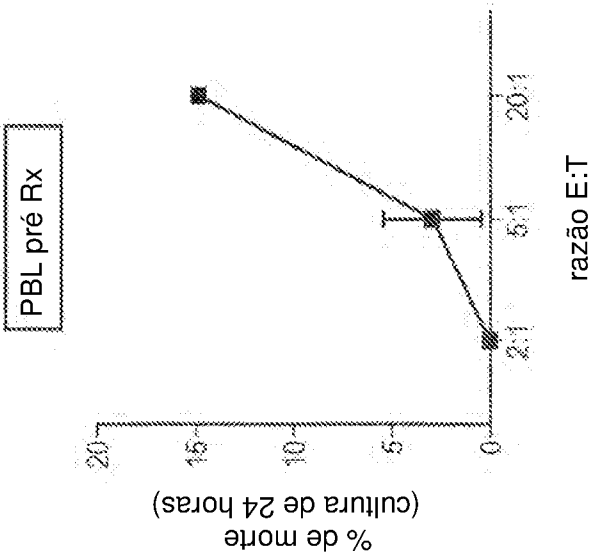
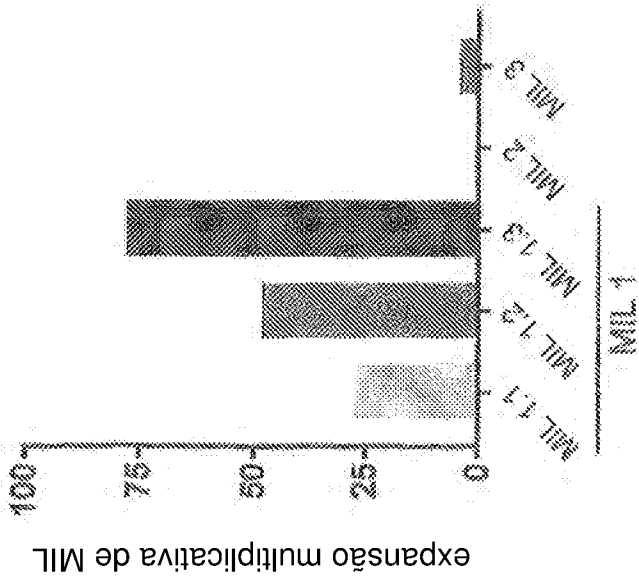


FIG. 35A

FIG. 36A



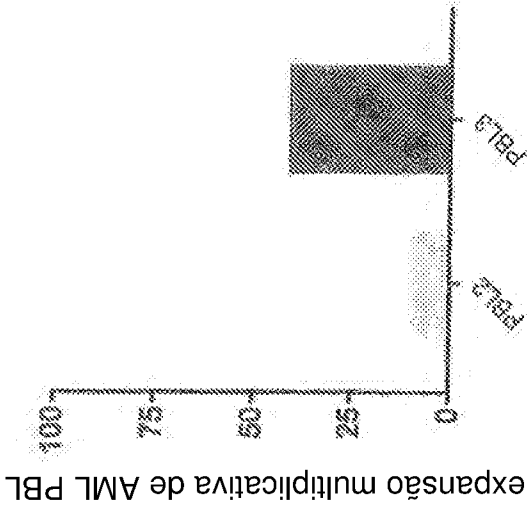
números de célula de partida

MIL 1.3: 138,000 células

MIL 2: 62,000 células

MIL 3: 28,000 células

FIG. 36B



números de célula de partida

PBL 2: 338,000 células

PBL 3: 336,000 células

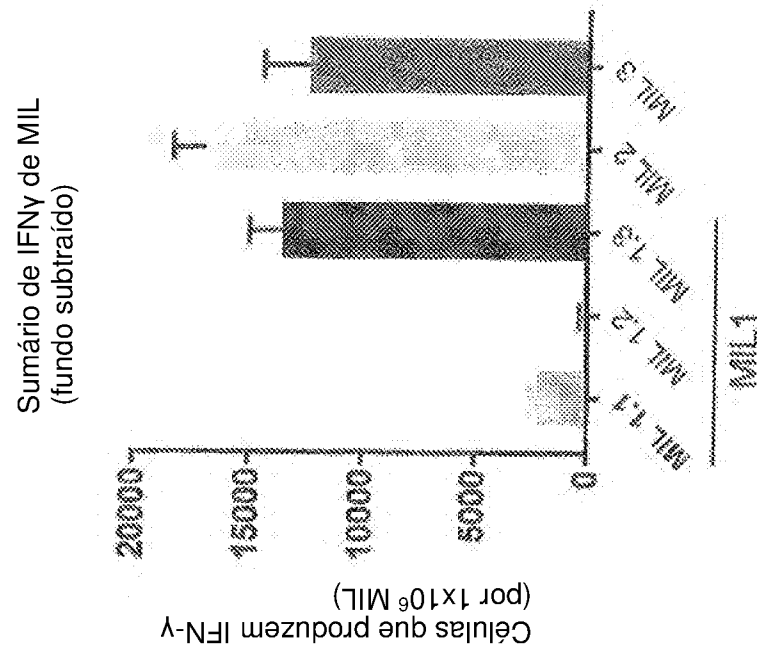
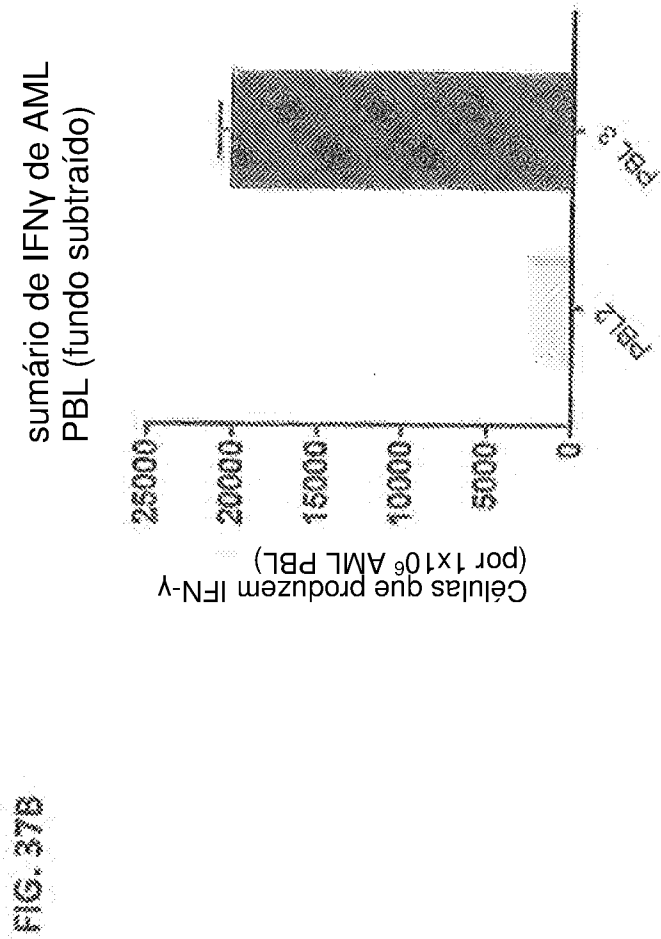
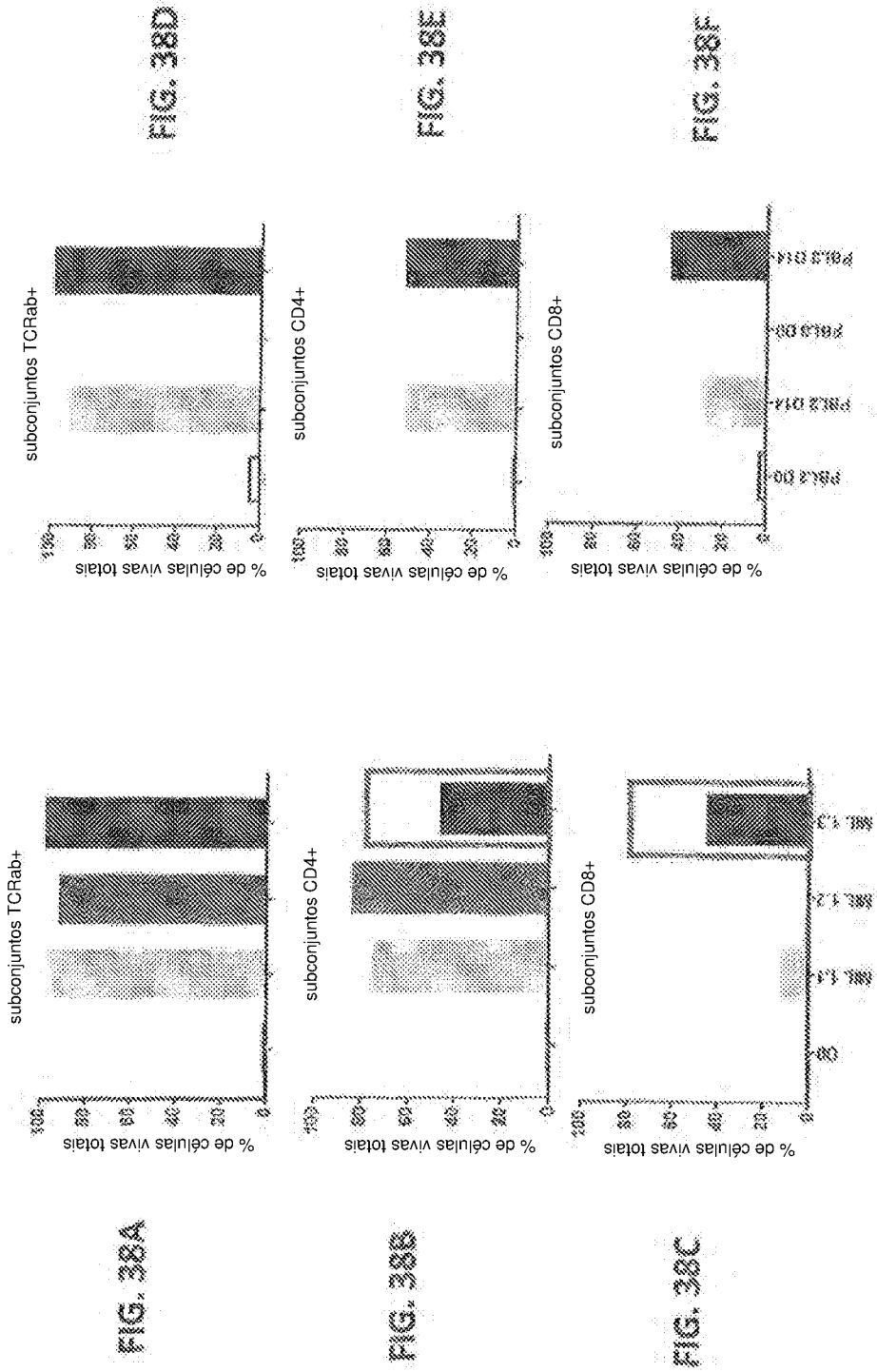
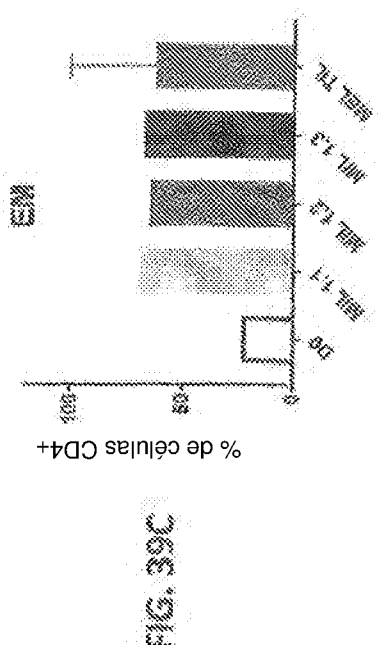
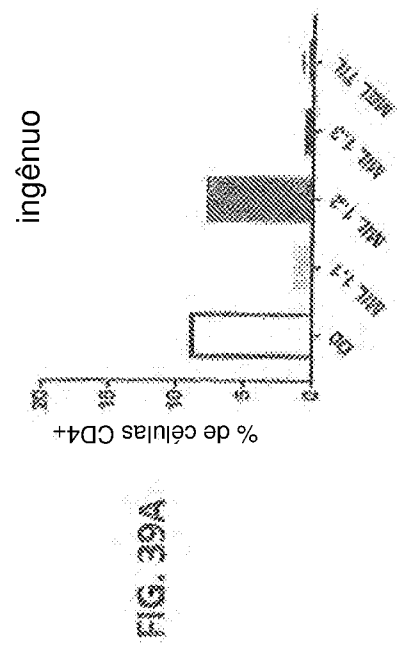
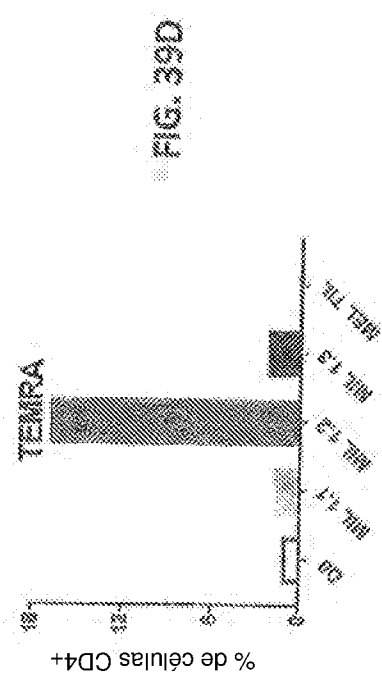
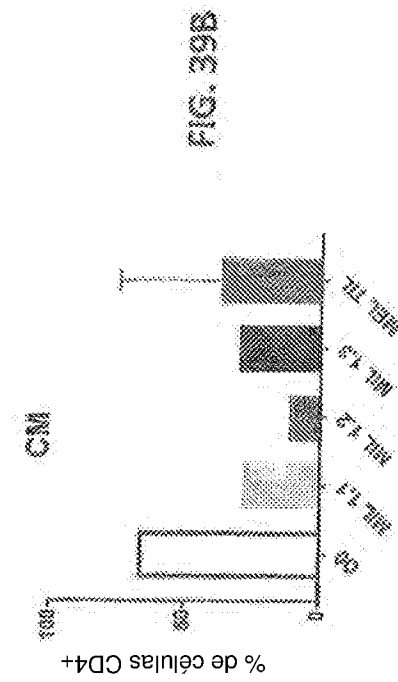
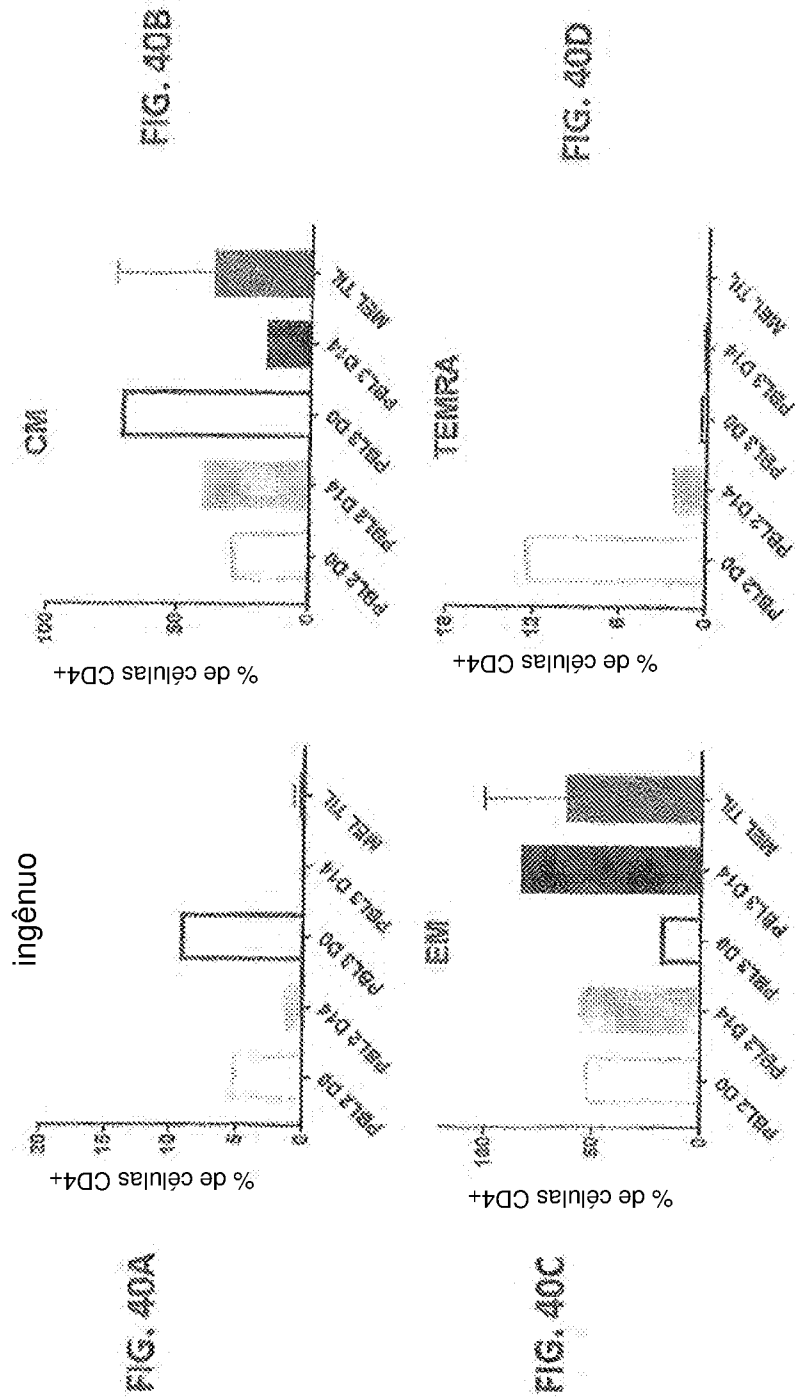


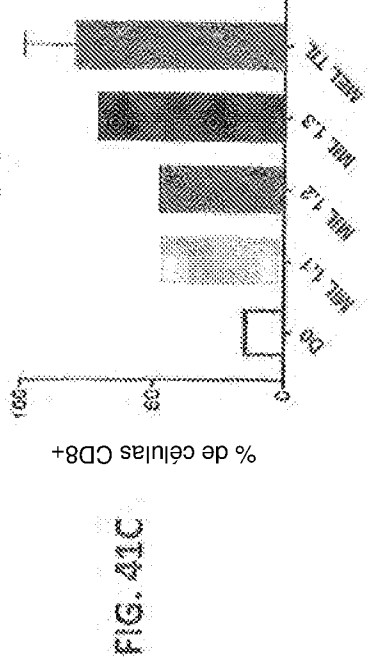
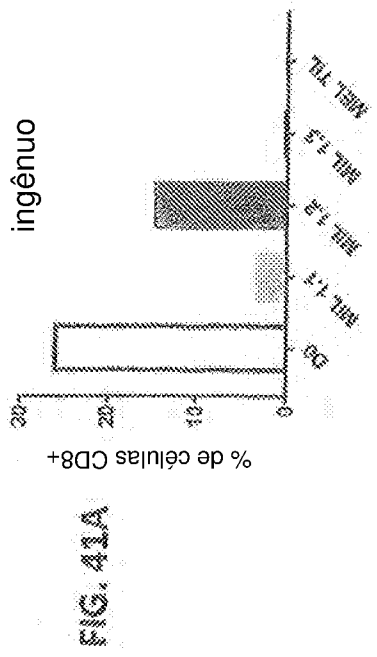
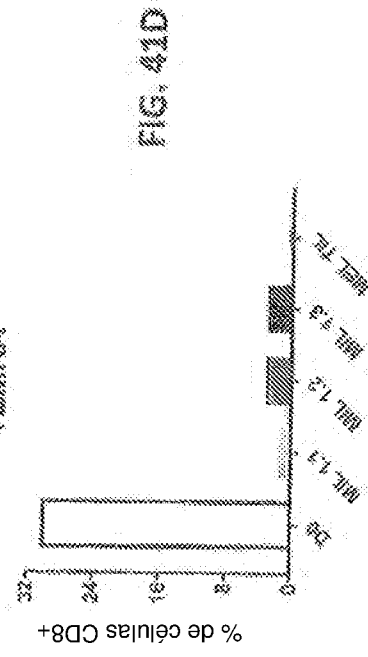
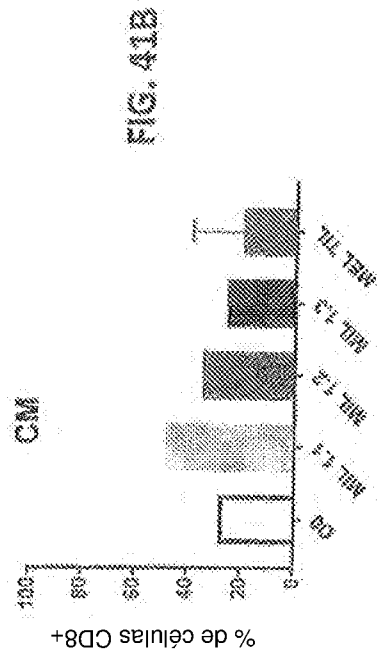
FIG. 37A











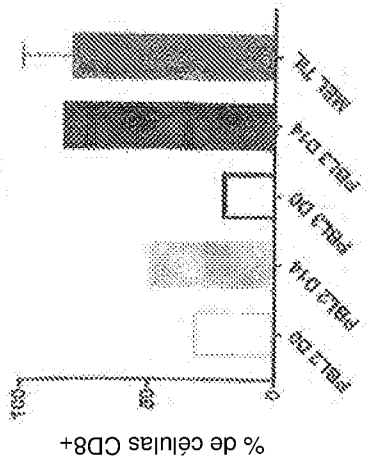
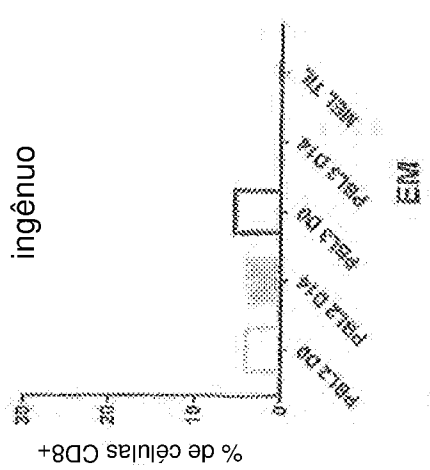
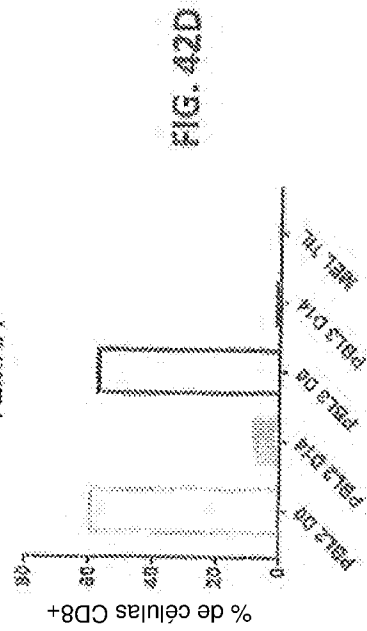
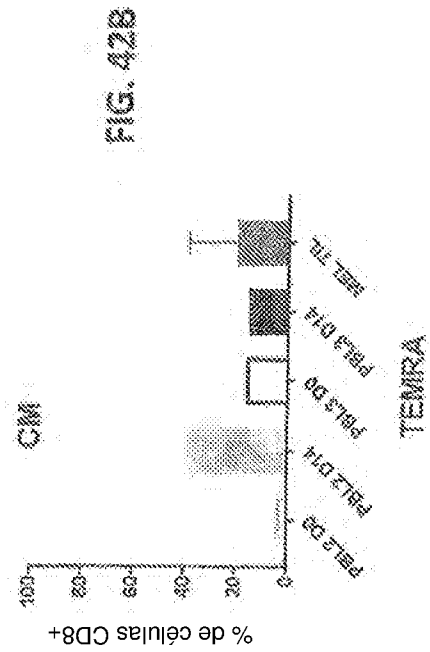


FIG. 43B

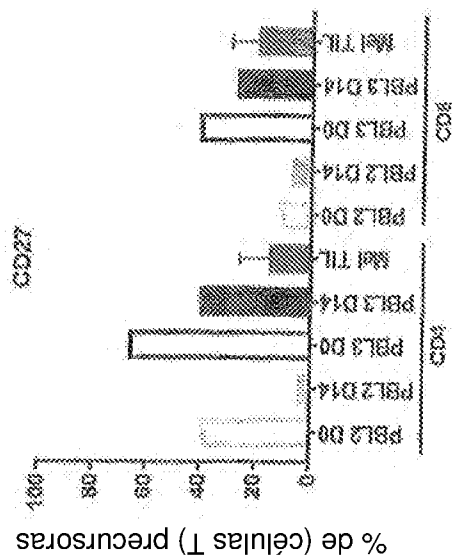


FIG. 44B

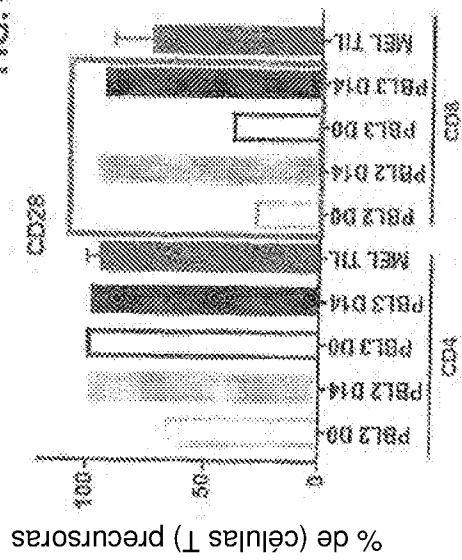


FIG. 43A

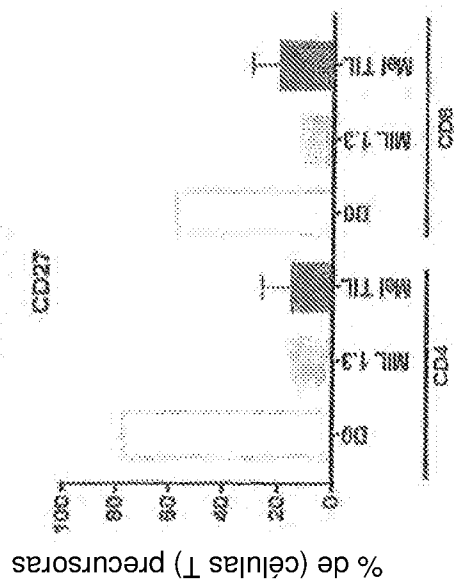
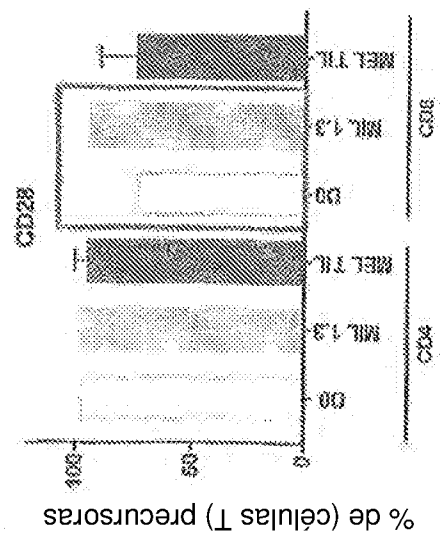
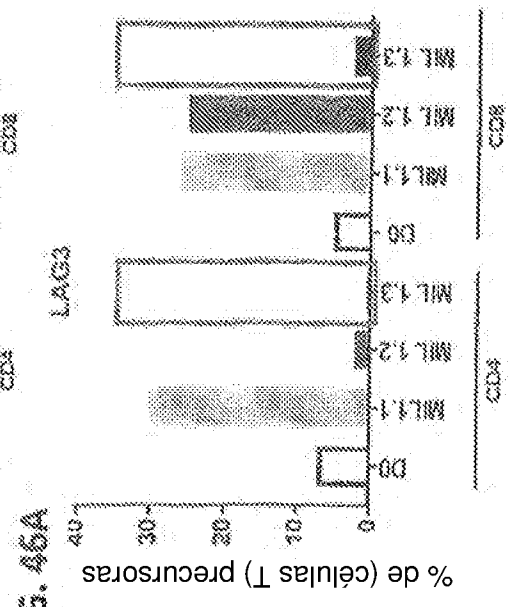
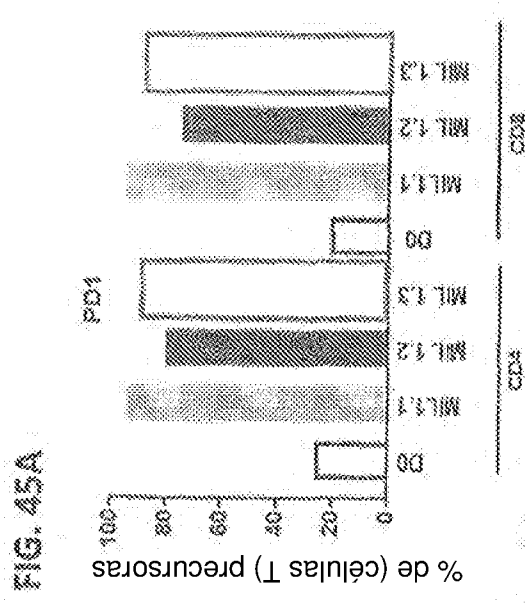
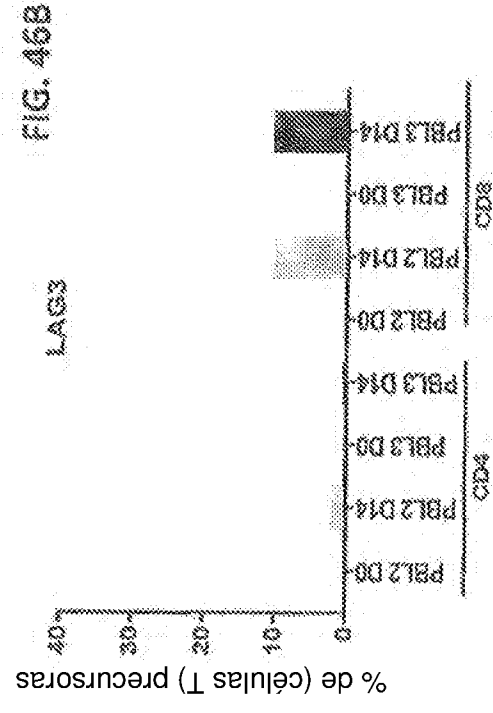
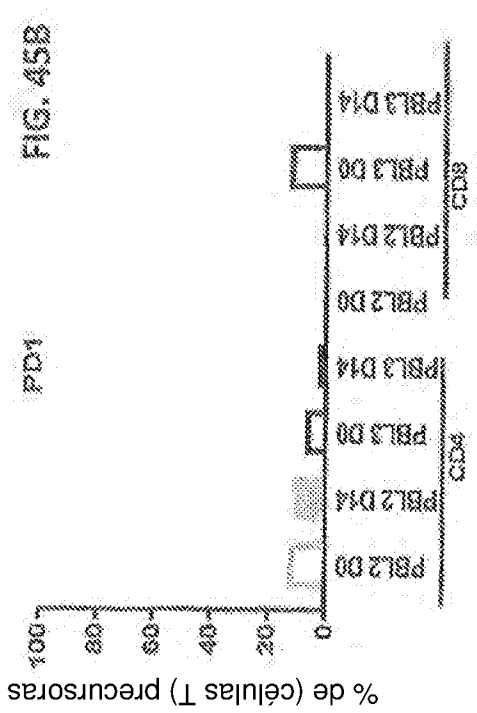
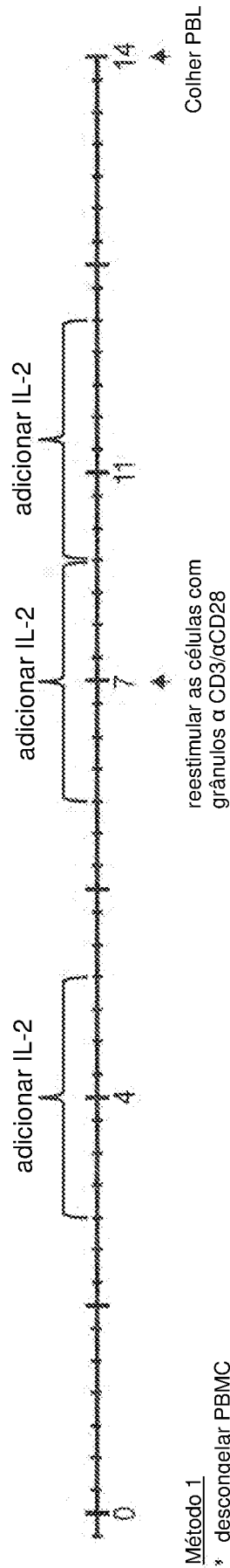


FIG. 44A





linha cronológica – processo de expansão de CLL PBL



Método 1

- * descongelar PBMC
- * isolar células T (método do grânulo – seleção negativa)
- * cultivar as células T apenas na presença de grânulos α CD3/α CD28 (razão 1:1) e IL-2

Método 3

- * descongelar PBMC
- * isolar células B CD19+ (método do grânulo – seleção positiva)
- * isolar células T (método do grânulo – seleção negativa)
- * cocultivar as células T e células B na presença de grânulos α CD3/α CD28 (razão 1:1) e IL-2

FIG. 47

Linha cronológica – processo de expansão de AML MIL

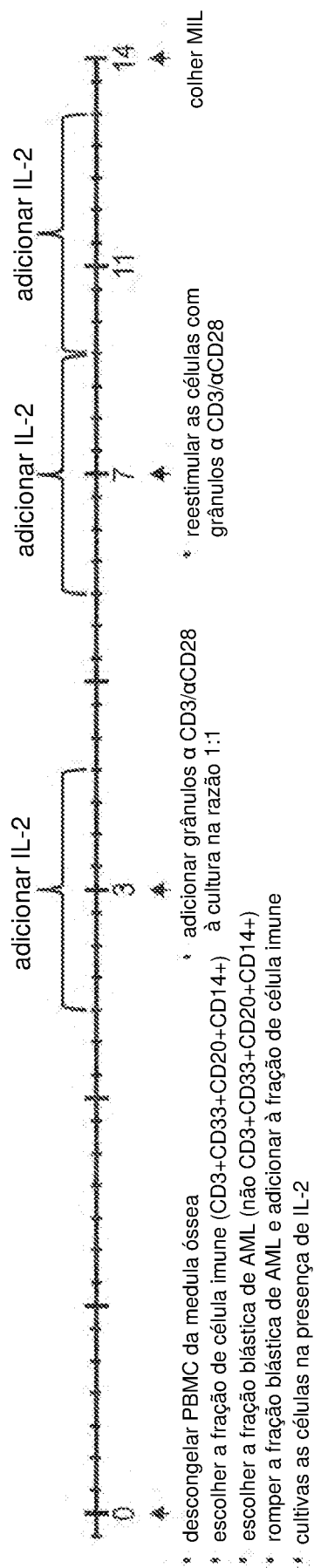


FIG. 48

RESUMO

MÉTODOS PARA TRATAR UM CÂNCER EM UM PACIENTE E UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA, PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO E LINFÓCITOS INFILTRANTES DE MEDULA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, E, USO DE UM TUMOR LÍQUIDO NA FABRICAÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR

Métodos de expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), incluindo linfócitos de sangue periférico e linfócitos infiltrantes de medula óssea, a partir do sangue e/ou medula óssea de pacientes com malignidades hematológicas, tais como tumores líquidos, incluindo linfomas e leucemias, e usos de tais TILs expandidos no tratamento de doenças, tais como cânceres e malignidades hematológicas, são aqui divulgados.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P139691listagem.txt
- Data de Geração do Código: 07/11/2019
- Hora de Geração do Código: 15:11:20
- Código de Controle:
 - Campo 1: 661D2FC979047126
 - Campo 2: 2D6B52F0A51F528