República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020009663-6 A2

(22) Data do Depósito: 19/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

(54) Título: MÉTODO PARA A EXPANSÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILS) EM UMA POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE TILS, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, COMPOSIÇÃO

(51) Int. Cl.: C12N 5/0783; A61K 35/17; A61K 39/00; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 05/11/2018 US 62/756038; 17/11/2017 US 62/588044; 24/01/2018 US 62/621515.

(71) Depositante(es): IOVANCE BIOTHERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): MICHELLE SIMPSON-ABELSON; CECILE CHARTIER-COURTAUD.

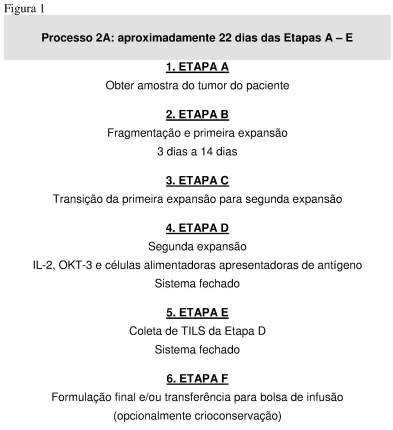
(86) Pedido PCT: PCT US2018061865 de 19/11/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/100023 de 23/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 14/05/2020

(57) Resumo: A presente invenção provê métodos para expandir populações de TILs presentes em aspirados por agulha fina (FNAs) ou pequenas biópsias, os quais contêm números reduzidos de TILs, utilizando os métodos aqui descritos em um sistema fechado que leva a fenótipo melhorado e aumento da saúde metabólica dos TILs em período mais curto de tempo.

Figura 1



MÉTODO PARA A EXPANSÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILS) EM UMA POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE TILS, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, COMPOSIÇÃO

Referência cruzada a pedidos de patente correlatos

[001] Este pedido de patente reivindica a prioridade deste ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 62/588 044, depositado em 17 de novembro de 2017, ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 62/621 515, depositado em 24 de janeiro de 2018 e ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº. 62/756 038, depositado em 05 de novembro de 2018, cujos conteúdos são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência.

Fundamentos da invenção

[002] O tratamento de cânceres volumosos, refratários por meio da transferência adotiva de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) representa uma abordagem poderosa para terapia de pacientes com mau prognóstico. Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* **2006,** *6,* 383-393. O êxito da imunoterapia requer um grande número de TILs, e um processo robusto e confiável é necessário para comercialização. Isso tem sido um desafio a ser alcançado por questões técnicas, logísticas e regulatórias envolvidas com a expansão celular. A expansão de TILs à base de IL-2, seguida por um "processo rápido de expansão" (REP) tornou-se um método preferido para expansão de TILs por 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. O REP pode resultar em uma expansão de 1.000 vezes de TILs ao longo de um período de 14 dias, embora requeira um grande excesso (p. ex., 200 vezes) de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, também conhecidas como células mononucleares (MNCs)) alogênicas irradiadas, frequentemente de

múltiplos doadores, como células alimentadoras (*feeder cells*), bem como o anticorpo anti-CD3 (OKT3) e doses elevadas de IL-2. Dudley, *et al., J. Immunother.* **2003,** *26,* 332-42. TILs que passaram por um procedimento de REP produziram uma terapia celular adotiva após imunossupressão do hospedeiro em pacientes com melanoma. Os parâmetros atuais para aceitação de infusão baseiam-se em leituras da composição de TILs (p. ex., positividade para CD28, CD8 ou CD4) e em vezes de expansão e viabilidade do produto do REP.

[003] Os processos atuais para produção de TILs são limitados pelo modo como os TILs são obtidos do paciente. Em alguns casos, quando o tumor é suficientemente pequeno ou está em um local no qual a ressecção tumoral não é possível, há ainda necessidade de métodos adicionais de obtenção de TILs para expansão e tratamento. A presente invenção atende a essa necessidade ao prover métodos para expansão de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou um fragmento de biópsia por agulha grossa (*core needle*), os quais contêm números reduzidos de TILs, e usar esses TILs expandidos em métodos de tratamento.

Breve sumário da invenção

[004] A presente invenção provê métodos melhorados e/ou encurtados para expandir TILs isolados de um aspirado por agulha fina ou um fragmento de biópsia por agulha grossa e produzir populações terapêuticas de TILs.

[005] A presente invenção provê um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) para uma população terapêutica de TILs, o qual compreende:

(i) obter uma primeira população de TILs de pelo menos um aspirado por agulha fina (FNA) ou pelo menos uma pequena biópsia de um tumor em um paciente;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira

população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 10 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs por aproximadamente 3 dias a 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia; e

(iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias, a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

[006] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação (*priming*) da primeira expansão e a etapa (ii) é uma segunda expansão rápida.

[007] Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que, depois da etapa (iii), as células são removidas da cultura celular e crioconservadas em um meio de armazenamento antes de realizar a etapa (iv).

[008] Em algumas modalidades, as células são descongeladas antes de realizar a etapa (iv).

[009] Em algumas modalidades, a etapa (iv) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[0010] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (iii) ou (iv) são

realizadas dentro de um período entre aproximadamente 17 dias e 24 dias.

[0011] Em algumas modalidades, a etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 18 dias e 22 dias.

[0012] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 20 dias e 22 dias.

[0013] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de aproximadamente 22 dias.

[0014] Em algumas modalidades, as células das etapas (iii) ou (iv) expressam CD4, CD8 e TCR α β em níveis semelhantes aos de células recentemente coletadas.

[0015] Em algumas modalidades, as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[0016] Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (ii) e/ou qualquer um dos dias 11 ao 14 na etapa (iii).

[0017] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs na etapa (iv) exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[0018] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[0019] Em algumas modalidades, as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[0020] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[0021] Em algumas modalidades, a primeira expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0022] Em algumas modalidades, a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0023] Em algumas modalidades, o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[0024] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em tumor pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[0025] Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[0026] Em algumas modalidades, o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente, em que o paciente se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[0027] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[0028] Em algumas modalidades, o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[0029] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

[0030] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[0031] Em algumas modalidades, a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[0032] Em algumas modalidades, o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[0033] Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs, o qual compreende:

(i) realizar uma primeira expansão cultivando uma primeira população de TILs, provenientes de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia de um tumor em um paciente, em um meio de cultura celular compreendendo IL-2 a fim de obter uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs por aproximadamente 3 dias a 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia; e

(ii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais a fim de obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

[0034] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é

opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

[0035] Em algumas modalidades, as células do meio de cultura celular na etapa (ii) são removidas e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da etapa (iii).

[0036] Em algumas modalidades, as células são descongeladas antes da etapa (iii).

[0037] Em algumas modalidades, as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[0038] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[0039] Em algumas modalidades, a primeira expansão na etapa (i) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0040] Em algumas modalidades, a segunda expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0041] Em algumas modalidades, a segunda expansão adicional na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0042] Em algumas modalidades, o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[0043] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[0044] Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[0045] Em algumas modalidades, o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente, em que o paciente se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[0046] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[0047] Em algumas modalidades, o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[0048] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

[0049] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[0050] Em algumas modalidades, a etapa (ii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[0051] Em algumas modalidades, o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[0052] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[0053] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T

de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[0054] A presente invenção também provê um método para o tratamento de um indivíduo com câncer compreendendo administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos, o qual compreende:

(i) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia obtida de um tumor em um paciente;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs por aproximadamente 3 dias a 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia;

(iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(iv) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs ao paciente.

[0055] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em

que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

[0056] Em algumas modalidades, depois da etapa (ii), as células são removidas do meio de cultura celular e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da etapa (iv).

[0057] Em algumas modalidades, as células são descongeladas antes da etapa (iv).

[0058] Em algumas modalidades, a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[0059] Em algumas modalidades, as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[0060] Em algumas modalidades, a primeira expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0061] Em algumas modalidades, a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0062] Em algumas modalidades, o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[0063] Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[0064] Em algumas modalidades, o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[0065] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de

um FNA.

[0066] Em algumas modalidades, o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[0067] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

[0068] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[0069] Em algumas modalidades, a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[0070] Em algumas modalidades, o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[0071] A presente invenção também provê um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 66, em que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[0072] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[0073] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre o grupo que consiste em melanoma, câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de

pulmão de não pequenas células.

[0074] A presente invenção também provê um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, compreendendo administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos, o qual compreende:

(i) realizar uma primeira expansão cultivando uma primeira população de TILs, provenientes de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia de um tumor em um paciente, em um meio de cultura celular compreendendo IL-2 a fim de obter uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs por aproximadamente 3 dias a 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia;

(ii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais a fim de obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(iii) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs ao paciente.

[0075] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

[0076] Em algumas modalidades, as células do meio de cultura celular na etapa (ii) são removidas e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da etapa (iii).

[0077] Em algumas modalidades, as células são descongeladas antes da etapa (iii).

[0078] Em algumas modalidades, as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[0079] Em algumas modalidades, as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[0080] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[0081] Em algumas modalidades, a primeira expansão na etapa (i) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0082] Em algumas modalidades, a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[0083] Em algumas modalidades, o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[0084] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[0085] Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[0086] Em algumas modalidades, o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o

indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[0087] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[0088] Em algumas modalidades, o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[0089] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

[0090] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[0091] Em algumas modalidades, a etapa (ii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[0092] Em algumas modalidades, o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[0093] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[0094] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[0095] A presente invenção também provê um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs, o qual compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia obtida de um tumor em um paciente;

(b) adicionar a primeira população a um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs por aproximadamente 3 dias a 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma primeira área de superfície permeável a gases, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a primeira população de TILs, e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem a abertura do sistema;

(d) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado, fornecendo uma segunda área de superfície permeável a gases, e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem a abertura do sistema;

(e) coletar a população terapêutica de TILs obtida na etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem a abertura do

sistema; e

(f) transferir a população de TILs coletados na etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem a abertura do sistema.

[0096] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

[0097] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa de crioconservação da bolsa de infusão compreendendo a população de TILs coletados na etapa (f) utilizando um processo de crioconservação.

[0098] Em algumas modalidades, o processo de crioconservação é realizado na razão de 1:1 de população de TILs coletados para meio CS10.

[0099] Em algumas modalidades, as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[00100] Em algumas modalidades, as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

[00101] Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (c) e/ou qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (d).

[00102] Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno são células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[00103] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[00104] Em algumas modalidades, a primeira expansão na etapa (c) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou

anticorpo agonista de 4-1BB.

[00105] Em algumas modalidades, a segunda expansão na etapa (d) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[00106] Em algumas modalidades, o FNA na etapa (a) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[00107] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[00108] Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[00109] Em algumas modalidades, o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[00110] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (a) são obtidos de um FNA.

[00111] Em algumas modalidades, o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[00112] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (a) são obtidos de uma pequena biópsia.

[00113] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[00114] Em algumas modalidades, a coleta na etapa (e) é realizada utilizando um sistema LOVO para o processamento das células.

[00115] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular é fornecido em um recipiente selecionado dentre o grupo que consiste em um recipiente-G e uma bolsa Xuri Cellbag.

[00116] Em algumas modalidades, a bolsa de infusão na etapa (f) é uma bolsa de infusão HyperThermosol.

[00117] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 17 dias a 24 dias.

[00118] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 18 dias a 22 dias.

[00119] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 20 dias a 22 dias.

[00120] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (f) são realizadas in 22 dias ou menos.

[00121] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (f) e a crioconservação são realizadas in 22 dias ou menos.

[00122] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs coletados na etapa (e) compreende TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[00123] Em algumas modalidades, o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[00124] Em algumas modalidades, as etapas (b) a (e) são realizadas em um único recipiente, em que as etapas (b) a (e) realizadas em um único recipiente resultam em um aumento no rendimento de TILs por tumor ressecado em comparação a realizar as etapas (b) a (e) em mais de um recipiente.

[00125] Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno são adicionadas aos TILs durante o segundo período na etapa (d) sem a reabertura do sistema.

[00126] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as

células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27+, expressão de CD28+, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras, e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[00127] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da terceira população de TILs exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[00128] Em algumas modalidades, o risco de contaminação microbiana é reduzido em comparação a um sistema aberto.

[00129] Em algumas modalidades, os TILs da etapa (g) são infundidos em um paciente.

[00130] A presente invenção também provê um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, em que o método compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos, compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia de um tumor ressecado de um indivíduo;

(b) adicionar a primeira população a um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs

compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs por aproximadamente 3 dias a 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma primeira área de superfície permeável a gases, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3-14 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a primeira população de TILs, e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem a abertura do sistema;

(d) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado, fornecendo uma segunda área de superfície permeável a gases, e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem a abertura do sistema;

(e) coletar a população terapêutica de TILs obtida na etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem a abertura do sistema; e

(f) transferir a população de TIL coletados na etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem a abertura do sistema;

(g) opcionalmente, crioconservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TILs coletados na etapa (f) utilizando um processo de crioconservação; e

(h) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs desde a bolsa de infusão na etapa (g) ao paciente.

[00131] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs

coletados na etapa (e) compreende TILs suficientes para administração de uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs na etapa (h).

[00132] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

[00133] Em algumas modalidades, as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[00134] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[00135] Em algumas modalidades, a primeira expansão na etapa (c) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[00136] Em algumas modalidades, a segunda expansão na etapa (d) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[00137] Em algumas modalidades, o FNA na etapa (a) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[00138] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[00139] Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[00140] Em algumas modalidades, o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o

indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[00141] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[00142] Em algumas modalidades, o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[00143] Em algumas modalidades, os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

[00144] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[00145] Em algumas modalidades, o número de TILs suficientes para administrar uma dose terapeuticamente eficaz na etapa (h) é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[00146] Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno (APCs) são PBMCs.

[00147] Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (c) e/ou qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (d).

[00148] Em algumas modalidades, antes de ser administrada uma dose terapeuticamente eficaz de células TIL na etapa (h), um esquema de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao paciente.

[00149] Em algumas modalidades, o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[00150] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa de tratar o paciente com um esquema de dose alta de IL-2, iniciando no dia seguinte à administração das células TIL ao paciente na etapa (h).

[00151] Em algumas modalidades, o esquema de dose alta de IL-2 compreende 600,000 ou 720.000 UI/kg, administrado por infusão intravenosa

em bolus durante 15 minutos a cada oito horas enquanto tolerado.

[00152] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27+, expressão de CD28+, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras, e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[00153] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[00154] A presente invenção também provê um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs, o qual compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA), uma pequena biópsia, uma biópsia por agulha grossa ou uma pequena biópsia de um tumor em um paciente;

(b) realizar uma primeira expansão de preparação, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de preparação é realizada por um primeiro período de aproximadamente 1 a 14 dias em um recipiente compreendendo uma primeira área de superfície permeável a gases para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número maior do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de aproximadamente 1 a 14 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(d) coletar a população terapêutica de TILs da etapa (c).

[00155] Em algumas modalidades, o primeiro período é de aproximadamente 6 a 12 dias.

[00156] Em algumas modalidades, o segundo período é de aproximadamente 6 a 12 dias.

[00157] Em algumas modalidades, o primeiro período é selecionado dentre o grupo que consiste em 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias ou 12 dias.

[00158] Em algumas modalidades, o segundo período é selecionado dentre o grupo que consiste em 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias ou 12 dias.

[00159] Em algumas modalidades, as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[00160] Em algumas modalidades, a razão de APCs usadas na etapa (b) e para as APCs usadas na etapa (c) é aproximadamente 1,1:1; 1,2:1; 1,3:1; 1,4:1; 1,5:1; 1,6:1; 1,7:1; 1,8:1; 1,9:1; 2:1; 2,1:1; 2,2:1; 2,3:1; 2,4:1; 2,5:1; 2,6:1; 2,7:1; 2,8:1; 2,9:1; 3:1; 3,1:1; 3,2:1; 3,3:1; 3,4:1; 3,5:1; 3,6:1; 3,7:1; 3,8:1; 3,9:1; 4:1; 4,1:1; 4,2:1; 4,3:1; 4,4:1; 4,5:1; 4,6:1; 4,7:1; 4,8:1; 4.9:1 ou 5:1 ou, de preferência, aproximadamente 1 a 2.

[00161] Em algumas modalidades, a primeira população de TILs é obtida de biópsia por agulha grossa.

[00162] Em algumas modalidades, a biópsia por agulha grossa é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em um tumor

melanoma, um tumor de câncer de ovário, um tumor de câncer cervical, um tumor de câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), um tumor de câncer de pulmão, um tumor de câncer de bexiga, um tumor de câncer de mama, um tumor de um câncer causado por papilomavírus humanos, um tumor de câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), um tumor de glioblastoma, um tumor de câncer gastrointestinal e um tumor de câncer renal.

[00163] A presente invenção também provê composições que compreendem TILs expandidos utilizando os métodos aqui descritos.

[00164] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um crioconservante.

[00165] Em algumas modalidades, o crioconservante compreende dimetilsulfóxido.

[00166] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um crioconservante e um agente isotônico.

[00167] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um crioconservante, compreendendo dimetilsulfóxido, e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio.

[00168] Em algumas modalidades, a composição compreende ainda um crioconservante, compreendendo dimetilsulfóxido e dextrano 40, e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio.

[00169] Em algumas modalidades, a composição compreendendo os TILs é fornecida em uma bolsa de infusão estéril.

Breve descrição dos desenhos

[00170] **Figura 1:** Diagrama do Processo 2A exemplar, fornecendo uma visão geral das Etapas A a F.

[00171] **Figura 2:** Fluxograma do Processo 2A.

[00172] **Figura 3:** Diagrama de uma modalidade de um processo de

produção exemplar de TILs crioconservados (~22 dias).

[00173] **Figura 4:** Diagrama de uma modalidade do processo 2A, um processo de 22 dias para produção de TILs.

[00174] **Figura 5:** Tabela comparativa das Etapas A a F de modalidades exemplares do processo 1C e processo 2A.

[00175] **Figura 6:** Comparação detalhada de uma modalidade do processo 1C e uma modalidade do processo 2A.

[00176] **Figura 7:** Diagrama de uma Pequena Biópsia exemplar fornecendo uma visão geral das Etapas A a F do processo de Expansão a partir de Pequena Biópsia.

[00177] **Figura 8:** Imagem de células viáveis expandidas a partir de amostras de biópsia por agulha grossa de um paciente com câncer de pâncreas (P7015). A) Biópsias por agulha grossa tratadas com IL-2, e B) biópsias por agulha grossa tratadas com uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21.

[00178] **Figura 9:** Análise por FACS de TILs expandidos a partir de Amostras de biópsia de pâncreas. A) Células T expandidas a partir de biópsias por agulha grossa tratadas com IL-2 são CD4+ e CD8+. B) Células CD8+ expandidas a partir de biópsias por agulha grossa tratadas com IL-2 são CD107a+. C) Células CD8+ expandidas a partir de biópsias por agulha grossa tratadas com uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 são CD4+ e CD8+. D) Células T CD8+ T expandidas a partir de biópsias por agulha grossa tratadas com uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 são CD107a+.

[00179] **Figura 10:** Análise por FACS de TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com carcinoma cervical (C2005). A) Aspirados por agulha fina tratados com IL-2, e B) aspirados por agulha fina tratados com uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21.

[00180] **Figura 11:** Análise por FACS de TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com carcinoma de pulmão (L4032). A) Aspirados por agulha fina tratadas com IL-2, e B) aspirados por agulha

fina tratados com uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21. C) Como controle, fragmentos de tumor pulmonar foram cultivados com IL-2 e expandidos para produzir células T CD4+ e CD8+.

[00181] **Figura 12:** TILs da amostra de FNA de um paciente com carcinoma de pulmão (L4032) foram expandidos ainda mais usando um Protocolo de Expansão Rápida. A) Contagens de células totais após expansão rápida de TILs expandidos a partir de aspirados que foram inicialmente tratados com IL-2 isoladamente ou com uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21, ou inicialmente uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 e depois IL-2 isoladamente. B) Células T CD4+ e CD8+ estavam presentes na população de TILs expandidos tratados com IL-2.

[00182] **Figura 13:** Análise por FACS de TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com carcinoma de pulmão (L4033). A) Células T de aspirados por agulha fina tratadas com IL-2, e B) como controle, células T de fragmentos de tumor pulmonar cultivados com IL-2.

[00183] **Figura 14:** TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com carcinoma de pulmão (L4033) foram expandidos ainda mais usando um Protocolo de Expansão Rápida. A) Contagens de células totais após expansão rápida de TILs obtidos de aspirados por agulha fina tratados com IL-2.

[00184] **Figura 15:** TILs de aspirados por agulha fina de tumores ovarianos retirados de pacientes com carcinoma de ovário (OV8011, OV8012, e OV8013). Contagens de células totais após cultura dos aspirados por agulha fina com IL-2 ou uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21.

[00185] **Figura 16:** Análise por FACS de TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com melanoma (M1101). A) Células T de aspirados por agulha fina tratados com IL-2, e B) como controle, células T de fragmentos de tumor pulmonar cultivados com IL-2.

[00186] **Figura 17:** Estado fenotípico e funcional de TILs derivados de

amostra de tumor pancreático obtida por biópsias por agulha grossa. A) Resultados de tumores pancreáticos cultivados em meio de cultura com IL-2 ou meio de cultura com IL-2 e aditivos de cultura celular. B e C) Resultados da expressão de CD107a em células CD4+ e células CD8+ em meios de cultura diferentes (meio de cultura suplementado com IL-2 *versus* meio de cultura suplementado com aditivos) após estimulação com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

[00187] **Figura 18:** Tabela de resumo de resultados de biópsias por agulha grossa e aspirados por agulha fina. A) Resultados de amostras de câncer de pâncreas e câncer de pulmão. B) Resultados de amostras de câncer colorretal, câncer de ovário, câncer cervical e melanoma.

[00188] **Figura 19:** Estado fenotípico e funcional de TILs derivados de amostras de melanoma obtidas por biópsias com aspirado por agulha fina. A) Contagens de células totais de culturas celulares após 0 dia, 11 dias, 18 dias e 21 dias. B) Análise fenotípica de células derivadas de fragmentos e aspirados. B) Análise funcional (expressão de CD107a) de células derivadas de fragmentos e aspirados após estimulação com PMA.

[00189] **Figura 20:** Resumo de dados mostrando que TILs podem ser expandidos a partir das Amostras de Biópsia de Câncer Pancreático obtidos do UPMC (Centro Médico da Universidade de Pittsburgh).

[00190] **Figura 21:** Dados mostrando a fenotipagem geral de TIL derivado de tumores pancreáticos.

[00191] **Figura 22:** TILs isolados a partir da pré-REP e REP de Amostras de biópsia de pâncreas são Funcionais, conforme determinado por IFNγ e CD107a.

[00192] **Figura 23:** Um aumento na população de células CD3+/NK foi observado em TILs pulmonares Pré-REP pouco expandidos.

[00193] **Figura 24:** Razão CD4/8 é maior que 1 na maioria dos TILs pulmonares Pré-REP.

[00194] **Figura 25:** Durante REP, foi observada expansão relativa comparável tanto em alto como em baixo rendimento.

[00195] **Figura 26:** Dados referentes a Sarcoma (UPMC 58).

[00196] **Figura 27:** Dados referentes a Câncer cervical (UPMC45). TILs pré-REP foram expandidos a partir de 4 fragmentos em G-REX 10 durante 21 dias.

[00197] **Figura 28:** Dados referentes a ES19001 (UPMC46). TILs pré-REP foram expandidos a partir de 4 fragmentos em G-REX 10 durante 21 dias.

[00198] **Figura 29:** Dados referentes a Câncer de Palato Duro (UPMC 67) e Oral (UPMC 68). TILs pré-REP foram expandidos a partir de 4 fragmentos em G-REX 10 durante 21 dias.

[00199] **Figura 30**: Resumo de dados mostrando que TILs podem ser expandidos a partir das Amostras de Biópsia de Câncer Pancreático fornecidas pelo UPMC.

[00200] **Figura 31:** Amostras de biópsia de pâncreas: TILs podem ser expandidos a partir de Amostras de Biópsia de Câncer de Pâncreas. Resumo e resultados experimentais de P7015: Uma amostra foi colocada em uma cavidade de uma placa com 24 cavidades no total de 5 cavidades. Duas amostras foram colocadas em duas cavidades, no entanto, houve pouco a nenhum crescimento nessas cavidades. Três cavidades foram tratadas com 1) IL-2 e duas cavidades com 2) IL-2/IL-15/IL-21.

[00201] **Figura 32:** Dados mostrando que a maioria das células expandidas a partir de Amostras de biópsia de pâncreas era células T CD4 e CD8+ e eram funcionais conforme determinado pela expressão de CD107a (P7015). Resultados experimentais de P7015: A maioria das células expandidas a partir das amostras de biópsia do pâncreas é células T (aproximadamente 80% eram CD4+ e CD8+). A estimulação com PMA/I demonstrou a capacidade da célula CD8+ para desgranulação conforme

indicado pela expressão de CD107a+, sugerindo, com isso, que essas células são funcionais. A % de CD8+ expressando CD107a+ foi maior na condição do coquetel triplo de IL-2/IL-15/IL-21, em comparação a IL-2 isoladamente.

[00202] **Figura 33:** Amostras de biópsia de pâncreas: TILs podem ser expandidos a partir de amostras de biópsia de câncer de pâncreas. Resumo e Resultados Experimentais de pré-REP de P7028 e P7031: 11 Amostras de biópsia foram colocadas em G-Rex 10 com o coquetel triplo (IL-2/IL-15/IL-21). TILs P7028 foram avaliados no Dia 12 e mantidos em cultura até o Dia 19. Contagens de células: Dia 12: 1,61e6 células viáveis; Dia 21: 3,49e7 células viáveis. TILS P7028 foram avaliados no Dia 12 e mantidos em cultura até o Dia 27. Contagens de células: Dia 12: 1,52e5 células viáveis; Dia 27: 1,14e7 células viáveis.

[00203] **Figura 34:** Amostras de biópsia de pâncreas: TILs podem ser expandidos a partir de amostras de biópsia por agulha grossa e fragmentos de câncer de pâncreas tratados com IL-2/IL-15/IL-21. O dia da coleta para TILs derivados de fragmentos variou do Dia 11-21. O dia da coleta para TILs derivados das amostras variou de Dia 21-28.

[00204] **Figura 35:** Caracterização fenotípica de TILs derivados de fragmentos e biópsias de tumores. O dia da coleta para TILs derivados de fragmentos variou do Dia 11-21. O dia da coleta para TILs derivados de amostras variou de Dia 21-28.

[00205] **Figura 36:** Caracterização fenotípica de TILs derivados de fragmentos e amostras de biópsia de tumores.

[00206] **Figura 37:** TILs de amostras de biópsia podem expressar m CD107a e secretar IFNγ do mesmo modo que TILs isolados de fragmentos.

[00207] **Figura 38: A)** Processo exemplar para procedimento de expansão com biópsia por agulha grossa. 1-2 amostras de biópsia por agulha grossa (3 do pâncreas, 4 de melanoma, 1 de mama e 1 ovariano) foram submetidas a um processo exemplar que incluiu a adição de OKT3 +

alimentadoras no Dia 3. Amostras de biópsia de pâncreas foram expandidas com +/- IL-15 e IL-21 (REP1 e REP2; ou seja, primeira expansão e segunda expansão). amostras de ovário foram tratadas com +/- OX40 (BMS) (n=1). Todos os TILs foram submetidos a um segundo REP (segunda expansão). B) Processo exemplar para procedimento de expansão com biópsia por agulha grossa. 1-2 amostras são submetidas a um processo que inclui a adição de OKT3 + alimentadoras no Dia 3

[00208] **Figura 39:** Tabela de resumo do procedimento de expansão de amostra pancreática de biópsia por agulha grossa.

[00209] **Figura 40:** Dados referentes ao número de células para expansões com biópsia pancreática por agulha grossa.

[00210] **Figura 41:** Tabela de resumo do procedimento de expansão com biópsia por agulha grossa de melanoma.

[00211] **Figura 42:** Dados referentes ao número de células para expansões de amostra de melanoma de biópsia por agulha grossa.

[00212] **Figura 43:** A expressão fenotípica dos marcadores de exaustão e de ativação são semelhantes entre REP1 e REP2 (ou seja, primeira expansão e segunda expansão).

[00213] **Figura 44:** A adição de OKT3 + alimentadoras a amostras de biópsia no Dia 3 não altera significativamente o fenótipo de TIL em comparação a TIL derivados de fragmentos do Gen2 (ou seja, processo 2A).

[00214] **Figura 45:** Tabela de resumo do procedimento de expansão com biópsia por agulha grossa de mama e ovário.

[00215] **Figura 46:** Dados referentes ao número de células para expansões de amostras de mama (painel esquerdo) e ovário (painel direito) de biópsia por agulha grossa.

[00216] **Figura 47:** Experimento mostrando que TILs podem ser expandidos a partir de amostras de biópsia de câncer de pâncreas. Resumo e resultados experimentais pré-REP de P7028 e P7031. Amostras de biópsia

foram colocadas em G-Rex 10 com o coquetel triplo (IL-2/IL-15/IL-21). TILS P7028 foram avaliados no Dia 12 e mantidos em cultura até o Dia 19. Contagens de células: Dia 12: $1,61x10^6$ células viáveis; Dia 21: $3,49x10^7$ células viáveis. P7030 TIL foram avaliados no Dia 12 e mantidos em cultura até o Dia 27. Contagens de células: Dia 12: $1,52x10^5$ células viáveis; Dia 27: $1,14x10^7$ células viáveis.

[00217] **Figura 48:** TILs podem ser expandidos a partir de amostras de biópsia e fragmentos tratados com IL-2/IL-15/IL-21 de câncer de pâncreas. Gráficos mostrando os números da expansão de células para fragmentos e amostras de biópsia. O dia da coleta para TIL derivados de fragmentos variou do Dia 11-21. O dia da coleta para TIL derivados de amostras variou do Dia 21-28.

[00218] **Figura 49:** TIL derivados de amostras de biópsia e fragmentos são fenotipicamente semelhantes. O dia da coleta para TIL derivados de fragmentos variou do Dia 11-21. O dia da coleta para TIL derivados de amostras variou do Dia 21-28.

[00219] **Figura 50:** Os "marcadores de exaustão" são expressos diferencialmente na comparação de TILs de amostras de biópsia e fragmentos.

[00220] **Figura 51:** TIL de biópsias por agulha grossa podem expressar CD107a e secretar IFNγ de modo semelhante ao TIL isolado de fragmentos.

[00221] **Figura 52:** O TC (coquetel triplo; IL-2/IL-15/IL-21) não altera significativamente a contagem de células totais em amostras de pâncreas em REP2 (segunda expansão), independentemente das condições de cultura iniciais (REP1; primeira expansão).

[00222] **Figura 53:** O TC (coquetel triplo; IL-2/IL-15/IL-21) não altera significativamente a razão CD4/CD8 ou os subconjuntos de Memória em REP2 (segunda expansão) em amostras de biópsia de pâncreas.

[00223] **Figura 54:** CD107a é semelhante nas populações de CD4 e

CD8 a partir de REP2 (segunda expansão) em todas as condições de tratamento em amostras de biópsia de pâncreas.

[00224] **Figura 55:** A secreção de IFNγ é semelhante independentemente da condições de tratamento em REP2 (segunda expansão) em amostras de biópsia de pâncreas.

[00225] **Figura 56:** A adição de OKT3 e alimentadoras no Dia 3 (REP1; primeira expansão) não altera significativamente a expressão fenotípica, em comparação a condições pré-REP em amostras de biópsia de pâncreas.

[00226] **Figura 57:** A adição de OKT3 e alimentadoras no Dia 3 (REP1; primeira expansão) não altera significativamente a expressão fenotípica dos "marcadores de exaustão" em amostras de biópsia de pâncreas.

[00227] **Figura 58:** A adição de OKT3 de alimentadoras no Dia 3 (REP1; primeira expansão) não altera significativamente a expressão fenotípica dos marcadores de ativação em amostras de biópsia de pâncreas.

[00228] **Figura 59:** CD107a é semelhante nas populações de CD4 e CD8 no pré-REP, REP1 (primeira expansão) e REP2 (segunda expansão) em amostras de biópsia de pâncreas.

[00229] **Figura 60:** A secreção de IFNγ é reduzida em REP2 (segunda expansão), quando comparado ao REP1 (primeira expansão) em amostras de biópsia de pâncreas.

[00230] **Figura 61:** A população de TCM (células T de memória central) é aumentada e as TEM (células T de memória efetora) diminuída em REP2 (segunda expansão), mas CD27 e CD28 não se alteram no melanoma. TEMRA: células de memória efetora terminalmente diferenciadas voltando a expressar CD45RA. TSCM: Células T de memória semelhantes a células-tronco.

[00231] **Figura 62:** IFNγ e CD107a são semelhantes em REP1 (primeira expansão) e REP2 (segunda expansão) de amostras de biópsia de

melanoma.

[00232] **Figura 63:** Dados mostrando marcadores fenotípicos de CD4 e CD8 em fragmentos de melanoma *versus* amostras de biópsia de melanoma.

[00233] **Figura 64:** Dados mostrando marcadores fenotípicos de CD4 e CD8 em fragmentos de melanoma *versus* amostras de biópsia de melanoma.

[00234] **Figura 65:** Dados mostrando o nível de CD107a em CD4 e CD8 em fragmentos de melanoma *versus* amostras de biópsia de melanoma.

[00235] **Figura 66:** Tratamento com OX40 melhorou a percentagem de células CD8+ em amostras de biópsia de ovário.

[00236] **Figura 67:** Expressão de CD107a e secreção de IFNγ semelhantes em amostras de biópsia de ovário tratadas com OX40.

[00237] **Figura 68:** Expressão melhorada de TCM e diferencial de marcadores de exaustão e ativação de amostras de biópsia de mama em REP1 (primeira expansão) e REP2 (segunda expansão).

[00238] **Figura 69:** CD107a e IFNγ são semelhantes em REP1 (primeira expansão) e REP2 (segunda expansão) de amostras de biópsia de mama.

[00239] **Figura 70:** Desenho esquemático de um procedimento exemplar de expansão de TILs com biópsia por agulha grossa de tumor.

[00240] **Figura 71:** TIL derivados de amostras de biópsia de pâncreas tratadas com OKT3 + alimentadoras secretam IFNγ com reestimulação.

[00241] **Figura 72:** TIL derivados de amostras de biópsia de melanoma expressam CD107a e secretam IFNγ quando da reestimulação.

[00242] **Figura 73:** Expansão de TIL a partir de biópsias por agulha grossa de mama e ovário.

[00243] **Figura 74:** O fenótipo do produto final de TIL derivados de amostras de biópsia de mama tratadas com OKT3+alimentadoras durante REP1 foi semelhante ao de amostras de biópsia tratadas com IL-2 apenas durante REP1.

[00244] **Figura 75:** O fenótipo do produto final de TIL derivados de amostras de biópsia de mama tratadas com OKT3+alimentadoras durante REP1 foi semelhante ao de amostras de biópsia tratadas com IL-2 apenas durante REP1.

[00245] **Figura 76:** Expressão e secreção aumentadas de IFNγ em amostras de biópsia de mama tratadas com OKT3+alimentadoras durante REP1 quando comparadas a amostras de biópsia tratadas com IL-2 apenas durante REP1.

[00246] **Figura 77:** O tratamento com OX40 melhorou a percentagem de células CD8+ nas amostras de biópsia de ovário em REP2.

[00247] **Figura 78:** O tratamento com OX40 durante os dois REPs alterou a expressão de PD-1, KLRG1 e CD25 em REP2.

[00248] **Figura 79:** A secreção de IFNγ em amostras de biópsia de ovário tratadas com OX40 é ligeiramente maior no produto final (REP2).

[00249] **Figura 80:** Expressão de CD107a em amostras de biópsia de ovário tratadas com OX40.

[00250] **Figura 81:** O tratamento com OX40 através de 2 REPs alterou a expressão de marcadores associados com a "juventude" de células T.

[00251] **Figura 82:** O tratamento com OX40 durante os dois REP alterou levemente a expressão de PD-1, KLRG1 e CD25 em REP2.

[00252] **Figura 83:** Expressão diferencial de marcadores de exaustão e ativação em amostras de biópsia de mama de REP1 e REP 2.

[00253] **Figura 84:** CD107a e IFNγ são semelhantes em REP1 e REP2 de amostras de biópsia de mama.

[00254] **Figura 85A-85B: A)** Mostra uma comparação entre o processo 2A (processo com aproximadamente 22 dias) e uma modalidade do processo Gen 3 com pequena biópsia para produção de TIL (processo com aproximadamente 17 dias a 24 dias). **B)** Diagrama do processo exemplar Gen3 fornecendo uma visão geral das Etapas A a F (processo com

aproximadamente 17 dias a 24 dias).

[00255] **Figura 86:** Fornece um fluxograma experimental para comparabilidade entre GEN 2 (processo 2A) *versus* GEN 3.

[00256] **Figura 84A-87C: A)** L4054 - Caracterização fenotípica de TIL produzido no processo Gen 2 e Gen 3. **B)** L4055-Caracterização fenotípica de TIL produzido no processo Gen 2 e Gen 3. **C**) M1085T-Caracterização fenotípica de TIL produzido no processo Gen 2 e Gen 3.

[00257] **Figura 88A-88C**: **A)** L4054 – análise de marcadores de memória de TIL produzido nos processos Gen 2 e Gen 3. **B)** L4055 – análise de marcadores de memória de TIL produzido nos processos Gen 2 e Gen 3. **C)** M1085T- análise de marcadores de memória de TIL produzido nos processos Gen 2 e Gen 3.

[00258] **Figura 89:** Marcadores de ativação e exaustão de L4054 **(A)** com *gate* (janela) em CD4+, **(B)** com *gate* em CD8+.

[00259] **Figura 90:** Marcadores de ativação e exaustão de L4055 **(A)** com *gate* em CD4+, **(B)** com *gate* em CD8+.

[00260] **Figura 91:** Produção de IFNγ (pg/mL): (A) L4054, (B) L4055, e (C) M1085T para os processos Gen 2 e Gen 3: Cada barra representada é a média + SEM para os níveis de IFNγ de meio estimulado, não estimulado e controle. Densidade óptica medida a 450 nm.

[00261] **Figura 92:** Análise por ELISA da concentração de IL-2 em sobrenadante da cultura celular: **(A) L4054** e **(B) L4055**. Cada barra representada é a média + SEM para níveis de IL-2 em meio esgotado (*spent media*). Densidade óptica medido a 450 nm.

[00262] **Figura 93:** Quantificação de glicose e lactato (g/L) em meio esgotado: (A) Glicose e (B) Lactato: Nas duas linhagens tumorais, e em ambos os processos, um diminuição na glicose foi observada por toda a expansão REP. Por outro lado, como previsto, foi observado um aumento no lactato. Tanto a diminuição na glicose como o aumento no lactato foram

comparáveis entre os processos Gen 2 e Gen 3.

[00263] **Figura 94: A)** Quantificação de L-glutamina em meio esgotado para L4054 e L4055. **B)** Quantificação de Glutamax em meio esgotado para L4054 e L4055. C) Quantificação de amônia em meio esgotado para L4054 e L4055.

[00264] **Figura 95: Análise do comprimento de telômeros:** O valor do comprimento relativo de telômeros (RTL) indica a fluorescência média do telômero por cromossoma/genoma no processo Gen 2 e Gen 3 processo da fluorescência do telômero por cromossoma/genoma na linhagem de células controle (linhagem de células 1301 de leucemia) usando o kit DAKO.

[00265] **Figura 96:** Análise da sequência única de CDR3 para TIL como produto final em L4054 e L4055 sob o processo Gen 2 e Gen 3. As colunas mostram o número de clonótipos TCR B únicos identificados em 1 x 10^6 células no Dia da Coleta do processo Gen 2 (p. ex., dia 22) e Gen 3 (p. ex., dia 14-16). Gen 3 mostrou maior diversidade clonal quando comparado ao Gen 2 com base no número de CDRs únicas do peptídeo dentro da amostra.

[00266] **Figura 97:** Frequência de sequências únicas de CDR3 no produto celular final coletado de L4054 IL (processo Gen 2 (p. ex., dia 22) e Gen 3 (p. ex., dia 14-16)).

[00267] **Figura 98:** Frequência de sequências únicas de CDR3 no produto celular final coletado de L4055 TIL (processo Gen 2 (p. ex., dia 22) e Gen 3 (p. ex., dia 14-16)).

[00268] **Figura 99:** Índice de Diversidade para o produto final TIL em L4054 e L4055 sob o processo Gen 2 e Gen 3. O índice de diversidade de Shannon para entropia é uma métrica mais confiável e comum para comparação. L4054 e L4055 de Gen3 mostram uma diversidade ligeiramente maior do que Gen 2.

[00269] **Figura 100:** Dados brutos de contagens de células Dia 7-início

de REP Gen 3, apresentados na Tabela 37 (ver Exemplo 14 abaixo).

[00270] **Figura 101:** Dados brutos for contagens de células Dia 11-início de REP Gen 2 e *Scale Up* (Escalonamento vertical) de Gen 3, apresentados na Tabela 37 (ver Exemplo 14 abaixo).

[00271] **Figura 102:** Dados brutos de contagens de células Dia 16-*Scale Up* de Gen 2 e Coleta de Gen 3 (p. ex., dia 16), apresentados na Tabela 38 (ver Exemplo 14 abaixo).

[00272] **Figura 103:** Dados brutos de contagens de células Dia 22-Coleta de Gen 2 (p. ex., dia 22), apresentados na Tabela 38 (ver Exemplo 14 abaixo). Para L4054 Gen 2, a contagem pós-LOVO foi extrapolada para 4 frascos, porque era o número total do estudo. 1 frasco foi contaminado, e a ampliação da escala foi realizada para o total = $6,67 \times 10^{10}$.

[00273] **Figura 104:** Dados brutos dos resultados de citometria de fluxo apresentados nas Figuras 87A, 87ª e 87B.

[00274] **Figura 105:** Dados brutos dos resultados de citometria de fluxo apresentados nas Figuras 87C e 87C.

[00275] **Figura 106:** Dados brutos dos resultados de citometria de fluxo apresentados nas Figuras 89 e 90.

[00276] **Figura 107:** Dados brutos dos resultados do ensaio de produção de IFNγ para amostras de L4054, apresentados na Figura 91.

[00277] **Figura 108:** Dados brutos dos resultados do ensaio de produção de IFNγ para amostras de L4055, apresentados na Figura 91.

[00278] **Figura 109:** Dados brutos dos resultados do ensaio de produção de IFNγ para amostras de M1085T, apresentados na Figura 91.

[00279] **Figura 110:** Dados brutos dos resultados de ELISA de IL-2 apresentados na Figura 92.

[00280] **Figura 111:** Dados brutos dos resultados da análise metabólica do substrato e metabólica apresentados nas Figuras 93 e 94.

[00281] **Figura 112:** Dados brutos dos resultados da análise de

comprimento relativo de telômeros apresentados na Figura 95.

[00282] **Figura 113:** Dados brutos dos resultados das análises de sequência única de CD3 e diversidade clonal apresentados nas Figuras 96 e 99.

[00283] **Figura 114:** Mostra uma comparação entre várias modalidades do processo Gen 2 (processo 2A) e o Gen 3.1.

[00284] **Figura 115:** Tabela descrevendo várias características de modalidades do processo Gen 2, Gen 2.1 e Gen 3.0.

[00285] **Figura 116:** Visão geral das condições do meio para uma modalidade do processo Gen 3, referido como Gen 3.1

[00286] **Figura 117:** Tabela descrevendo várias características de modalidades do processo Gen 2, Gen 2.1 e Gen 3.0.

[00287] **Figura 118:** Tabela comparando várias características de modalidades dos processos Gen 2 e Gen 3.0.

[00288] **Figura 119:** Tabela fornecendo usos de meio nas várias modalidades dos processos descritos de expansão.

[00289] **Figura 120:** Comparação de fenótipo: Modalidades do processo Gen 3.0 e Gen 3.1 mostraram expressão comparável de CD28, CD27 e CD57.

[00290] **Figura 121:** Maior produção de IFNγ no produto final de Gen 3. A análise de IFNγ (por ELISA) foi realizada no sobrenadante congelado da cultura para comparar ambos os processos. Para cada tumor, durante a noite estimulação durante a noite com placa revestida de anti-CD3, usando TIL produzido no processo Gen 2 (p. ex., dia 22) e Gen 3 (p. ex., dia 16). Cada barra representa níveis de IFNγ de meio estimulado, não estimulado e controle.

[00291] **Figura 122:** Parte superior: Análise de sequência única de CDR3 para o produto final TIL: As colunas mostram o número de clonótipos TCR B únicos identificados em 1 x 10^6 células coletadas no processo Gen 2

(p. ex., dia 22) e Gen 3 (p. ex., dia 14-16). Gen 3 mostra maior diversidade clonal em comparação ao Gen 2 com base no número de CDRs únicas do peptídeo dentro da amostra. Parte inferior: Índice de Diversidade do produto final TIL: O índice de diversidade de Shannon para entropia é uma métrica mais confiável e comum para comparação. Gen 3 mostrou diversidade ligeiramente maior do que Gen 2.

[00292] **Figura 123:** 199 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 97,07% de 80% das melhores únicas de CDR3 de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3.

[00293] **Figura 124:** 1833 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 99,45% de 80% das melhores únicas de CDR3 de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3.

[00294] **Figura 125:** Desenho esquemático de uma modalidade exemplar do processo Gen 3 (processo de 16 dias).

[00295] **Figura 126:** Desenho esquemático de uma modalidade exemplar de um método para a expansão de TILS de malignidades hematopoiéticas usando a plataforma de expansão Gen 3.

[00296] **Figura 127:** Fornece dados mostrando que a adição de OKT3 + alimentadoras a amostras de biópsia no Dia 3 não alterou significativamente o fenótipo de TIL em comparação a Gen2, indicando que os TILs eram TILs sadios.

[00297] **Figura 128:** Fornece dados mostrando que a expressão de marcadores de exaustão e ativação por TIL derivados de amostras de biópsia de melanoma seguiu tendências semelhantes àquela de TIL derivado de amostra de biópsia de pâncreas. Não houve diferenças observadas na expressão fenotípica entre IL-2 e o coquetel triplo, em REP1 e REP2.

[00298] **Figura 129:** Fornece dados referentes à expansão de TIL

provenientes de amostras de biópsia de pulmão.

[00299] **Figura 130:** Fornece dados mostrando que perfis fenotípicos semelhantes são observados no Dia 0 *versus* Dia 3 (OKT3 + alimentadoras) em amostras tratadas de biópsia de pulmão.

[00300] **Figura 131:** Fornece dados mostrando expressão fenotípica melhorada de marcadores de ativação e de células T residentes em amostras de biópsia tratadas com OKT3 e alimentadoras no Dia 3.

[00301] **Figura 132:** TIL de amostras de biópsia de pulmão são funcionais conforme determinado pela secreção de IFNγ e mobilização de CD107a em resposta à estimulação não específica.

[00302] **Figura 133:** Os TIL CD8+ de amostras de biópsia de pulmão tratadas no Dia 3 são oligoclonais quando comparados aos TILs tratados no Dia 0.

Breve descrição da listagem de sequências

[00303] SEQ ID NO:1 é a sequência de aminoácidos da cadeia pesada de muromonabe.

[00304] SEQ ID NO:2 é a sequência de aminoácidos da cadeia leve de muromonabe.

[00305] SEQ ID NO:3 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-2 humana recombinante.

[00306] SEQ ID NO:4 é a sequência de aminoácidos de aldesleucina.

[00307] SEQ ID NO:5 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-4 humana recombinante.

[00308] SEQ ID NO:6 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-7 humana recombinante.

[00309] SEQ ID NO:7 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-15 humana recombinante.

[00310] SEQ ID NO:8 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-21 humana recombinante.

[00311] SEQ ID NO:9 é a sequência de aminoácidos de 4-1BB humano.

[00312] SEQ ID NO:10 é a sequência de aminoácidos de 4-1BB murino.

[00313] SEQ ID NO:11 é a cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00314] SEQ ID NO:12 é a cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00315] SEQ ID NO:13 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00316] SEQ ID NO:14 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00317] SEQ ID NO:15 é a CDR1 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00318] SEQ ID NO:16 é a CDR2 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00319] SEQ ID NO:17 é a CDR3 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00320] SEQ ID NO:18 é a CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00321] SEQ ID NO:19 é a CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00322] SEQ ID NO:20 é a CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, utomilumabe (PF-05082566).

[00323] SEQ ID NO:21 é a cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00324] SEQ ID NO:22 é a cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00325] SEQ ID NO:23 é a região variável da cadeia pesada (VH) do

anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00326] SEQ ID NO:24 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00327] SEQ ID NO:25 é a cadeia pesada CDR1 do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00328] SEQ ID NO:26 é a CDR2 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00329] SEQ ID NO:27 é a CDR3 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00330] SEQ ID NO:28 é a CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00331] SEQ ID NO:29 é a CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00332] SEQ ID NO:30 é a CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB, urelumabe (BMS-663513).

[00333] SEQ ID NO:31 é um domínio Fc de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00334] SEQ ID NO:32 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00335] SEQ ID NO:33 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00336] SEQ ID NO:34 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00337] SEQ ID NO:35 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00338] SEQ ID NO:36 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00339] SEQ ID NO:37 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00340] SEQ ID NO:38 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00341] SEQ ID NO:39 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00342] SEQ ID NO:40 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00343] SEQ ID NO:41 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00344] SEQ ID NO:42 é um domínio Fc de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00345] SEQ ID NO:43 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00346] SEQ ID NO:44 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00347] SEQ ID NO:45 é um *linker* de uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00348] SEQ ID NO:46 é uma sequência de aminoácidos de um ligante de 4-1BB (4-1BBL).

[00349] SEQ ID NO:47 é uma porção solúvel de um polipeptídeo de 4-1BBL.

[00350] SEQ ID NO:48 é uma região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo agonista de 4-1BB, 4B4-1-1 versão 1.

[00351] SEQ ID NO:49 é uma região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo agonista de 4-1BB, 4B4-1-1 versão 1.

[00352] SEQ ID NO:50 é uma região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo agonista de 4-1BB, 4B4-1-1 versão 2.

[00353] SEQ ID NO:51 é uma região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo agonista de 4-1BB, 4B4-1-1 versão 2.

[00354] SEQ ID NO:52 é uma região variável da cadeia pesada (VH)

do anticorpo agonista de 4-1BB, H39E3-2.

[00355] SEQ ID NO:53 é uma região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo agonista de 4-1BB, H39E3-2.

[00356] SEQ ID NO:54 é a sequência de aminoácidos de OX40 humano.

[00357] SEQ ID NO:55 é a sequência de aminoácidos de OX40 murino.

[00358] SEQ ID NO:56 é a cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00359] SEQ ID NO:57 é a cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00360] SEQ ID NO:58 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00361] SEQ ID NO:59 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00362] SEQ ID NO:60 é a CDR1 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00363] SEQ ID NO:61 é a CDR2 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00364] SEQ ID NO:62 é a CDR3 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00365] SEQ ID NO:63 é a CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00366] SEQ ID NO:64 é a CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00367] SEQ ID NO:65 é a CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00368] SEQ ID NO:66 é a cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00369] SEQ ID NO:67 é a cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00370] SEQ ID NO:68 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00371] SEQ ID NO:69 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00372] SEQ ID NO:70 é a CDR1 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00373] SEQ ID NO:71 é a CDR2 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00374] SEQ ID NO:72 é a CDR3 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00375] SEQ ID NO:73 é a CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00376] SEQ ID NO:74 é a CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00377] SEQ ID NO:75 é a CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 11D4.

[00378] SEQ ID NO:76 é a cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00379] SEQ ID NO:77 é a cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00380] SEQ ID NO:78 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00381] SEQ ID NO:79 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00382] SEQ ID NO:80 é a CDR1 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00383] SEQ ID NO:81 é a CDR2 da cadeia pesada do anticorpo

monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00384] SEQ ID NO:82 é a CDR3 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00385] SEQ ID NO:83 é a CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00386] SEQ ID NO:84 é a CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00387] SEQ ID NO:85 é a CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 18D8.

[00388] SEQ ID NO:86 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00389] SEQ ID NO:87 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00390] SEQ ID NO:88 é a CDR1 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00391] SEQ ID NO:89 é a CDR2 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00392] SEQ ID NO:90 é a CDR3 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00393] SEQ ID NO:91 é a CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00394] SEQ ID NO:92 é a CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00395] SEQ ID NO:93 é a CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu119-122.

[00396] SEQ ID NO:94 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00397] SEQ ID NO:95 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00398] SEQ ID NO:96 é a CDR1 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00399] SEQ ID NO:97 é a CDR2 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00400] SEQ ID NO:98 é a CDR3 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00401] SEQ ID NO:99 é a CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00402] SEQ ID NO:100 é a CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00403] SEQ ID NO:101 é a CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal agonista de OX40, Hu106-222.

[00404] SEQ ID NO:102 é uma sequência de aminoácidos do ligante de OX40 (OX40L).

[00405] SEQ ID NO:103 é uma porção solúvel do polipeptídeo de OX40L.

[00406] SEQ ID NO:104 é uma porção solúvel alternativa do polipeptídeo de OX40L.

[00407] SEQ ID NO:105 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 008.

[00408] SEQ ID NO:106 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 008.

[00409] SEQ ID NO:107 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 011.

[00410] SEQ ID NO:108 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 011.

[00411] SEQ ID NO:109 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 021.

[00412] SEQ ID NO:110 é a região variável da cadeia leve (VL) do

anticorpo monoclonal agonista de OX40, 021.

[00413] SEQ ID NO:111 é a região variável da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 023.

[00414] SEQ ID NO:112 é a região variável da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal agonista de OX40, 023.

[00415] SEQ ID NO:113 é a região variável da cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal agonista de OX40.

[00416] SEQ ID NO:114 é a região variável da cadeia leve (VL) de um anticorpo monoclonal agonista de OX40.

[00417] SEQ ID NO:115 é a região variável da cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal agonista de OX40.

[00418] SEQ ID NO:116 é a região variável da cadeia leve (VL) de um anticorpo monoclonal agonista de OX40.

[00419] SEQ ID NO:117 é a região variável da cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00420] SEQ ID NO:118 é a região variável da cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00421] SEQ ID NO:119 é a região variável da cadeia leve (VL) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00422] SEQ ID NO:120 é a região variável da cadeia leve (VL) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00423] SEQ ID NO:121 é a região variável da cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00424] SEQ ID NO:122 é a região variável da cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00425] SEQ ID NO:123 é a região variável da cadeia leve (VL) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00426] SEQ ID NO:124 é a região variável da cadeia leve (VL) de um anticorpo monoclonal humanizado agonista de OX40.

[00427] SEQ ID NO:125 é a região variável da cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal agonista de OX40.

[00428] SEQ ID NO:126 é a região variável da cadeia leve (VL) de um anticorpo monoclonal agonista de OX40.

Descrição detalhada da invenção

I. Introdução

[00429] A terapia celular adotiva utilizando TILs cultivados *ex vivo* pelo Protocolo de Expansão Rápida (REP) foi bem sucedida após imunossupressão do hospedeiro em pacientes com melanoma. Os parâmetros atuais para aceitação de infusão baseiam-se em leituras da composição de TILs (p. ex., positividade para CD28, CD8 ou CD4) e nas vezes numéricas de expansão e viabilidade do produto do REP.

[00430] Os protocolos atuais de REP não revelam muito sobre a saúde do TIL que será infundido no paciente. As células T sobre um desvio metabólico profundo no decorrer da sua maturação de células T virgens a efetoras (ver Chang, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2016,** *17,* 364, aqui expressamente incorporado, em sua totalidade e, em particular, para a discussão e marcadores do metabolismo anaeróbico e aeróbico). Por exemplo, células T virgens baseiam-se na respiração mitocondrial para produzir ATP, enquanto células T efetoras, maduras, sadias, tais como TIL, são altamente glicolíticas, baseando-se na glicólise aeróbica para o fornecimento de substratos bioenergéticos que necessitam para proliferação, migração, ativação e eficácia antitumoral.

[00431] Artigos anteriores relatam que limitar a glicólise e promover o metabolismo mitocondrial nos TILs, antes da transferência, é desejável, pois células que dependem maciçamente de glicólise sofrerão privação de nutrientes quando da transferência adotiva, o que resulta na morte da maioria das células transferidas. Assim, a técnica ensina que promover o metabolismo mitocondrial poderia promover a longevidade *in vivo* e, de fato, sugere o uso de inibidores da glicólise antes da indução da resposta imune. Ver Chang *et*

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

[00432] A presente invenção é dirigida ainda, em algumas modalidades, a métodos para avaliar e quantificar esse aumento na saúde metabólica. Assim, a presente invenção provê métodos de avaliação da saúde relativa de uma população de TIL por meio de uma ou mais avaliações gerais do metabolismo, incluindo, entre outros, taxas e níveis de glicólise, fosforilação oxidativa, capacidade respiratória de reserva (SRC) e reserva glicolítica.

[00433] Além disso, a presente invenção é dirigida ainda, em algumas modalidades, a métodos para avaliar e quantificar esse aumento na saúde metabólica. Assim, a presente invenção provê métodos de avaliação da saúde relativa de uma população de TIL por meio de uma ou mais avaliações gerais do metabolismo, incluindo, entre outros, taxas e níveis de glicólise, fosforilação oxidativa, capacidade respiratória de reserva (SRC) e reserva glicolítica.

[00434] Além disso, avaliações opcionais adicionais incluem, entre outras, produção de ATP, massa mitocondrial e absorção de glicose.

II. Definições

[00435] O termo "*in vivo*" refere-se a um evento que acontece no corpo de um indivíduo.

[00436] O termo "*in vitro*" refere-se a um evento que aconteces fora do corpo de um indivíduo. Ensaios *in vitro* abrangem ensaios celulares, nos quais células vivas ou mortas são empregadas, e podem também abranger um ensaio sem células no qual não são empregadas células intactas.

[00437] O termo "expansão rápida" significa um aumento no número de TILs antígeno-específicos de pelo menos aproximadamente 3 vezes (ou 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 vezes) ao longo de um período de uma semana, mais preferivelmente de pelo menos 10 vezes (ou 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 vezes) ao longo de um período de uma semana ou, o mais preferível, de pelo

menos cerca de 100 vezes ao longo de um período de uma semana. Alguns protocolos de expansão rápida são delineados abaixo.

[00438] Por "linfócitos infiltrantes de tumor" ou "TILs", neste relatório descritivo, entende-se uma população de células originalmente obtidas como leucócitos que deixaram a corrente sanguínea de um indivíduo e migraram para um tumor. Os TILs incluem, entre outros, células T $CD8^+$ citotóxicas (linfócitos), células T $CD4^+$ Th1 e Th17, células *natural killer*, células dendríticas e macrófagos M1. Os TILs incluem TILs primários e secundários. "TILs primários" são aqueles que são obtidos de amostras de tecido do paciente, como aqui delineado (às vezes referidos como "recentemente coletados"), e "TILs secundários" são quaisquer populações celulares de TIL que foram expandidas ou proliferadas como aqui discutido, incluindo, entre outros, TILs a granel e TILs expandidos ("TILs REP" ou "TILs pós-REP").

[00439] Por "população de células" (incluindo TILs), entende-se, neste relatório descritivo, algumas células que compartilham traços comuns. Em geral, o número nas populações varia de 1×10^6 a 1×10^{10}, com populações de TILs diferentes compreendendo números diferentes. Por exemplo, o crescimento inicial de TILs primários na presença de IL-2 resulta em uma população de TILs a granel de aproximadamente 1×10^8 células. A expansão REP é em geral realizada para fornecer populações de $1,5 \times 10^9$ a $1,5 \times 10^{10}$ células para infusão.

[00440] Por "pequena biópsia" entende-se, neste relatório descritivo, uma biópsia que efetua a remoção de um volume de tecido de um tumor que é tipicamente inferior e, em algumas modalidades, substancialmente inferior ao volume do tumor. Pequena biópsia inclui biópsias por agulha grossa, biópsias por punção e semelhantes. Qualquer pequena biópsia é incluída, por exemplo, qualquer biópsia com volume inferior a aproximadamente 1 mm^3, 2 mm^3, aproximadamente 5 mm^3, aproximadamente 10 mm^3, aproximadamente 25 mm^3, aproximadamente 50 mm^3 ou aproximadamente 100 mm^3 ou com área

transversal inferior a aproximadamente 1 mm^2, 2 mm^2, aproximadamente 5 mm^2, aproximadamente 10 mm^2, aproximadamente 25 mm^2, aproximadamente 50 mm^2 ou aproximadamente 100 mm^2. Uma pequena biópsia pode também incluir múltiplas biópsias retiradas do mesmo ou de múltiplos locais no corpo, incluindo lesões cancerosas diferentes em estado metastático.

[00441] Por "TILs crioconservados" entende-se, neste relatório descritivo, que TILs, quer primários, a granel ou expandidos (TILs REP), são tratados e armazenados no intervalo entre cerca de -150 ºC e -60 ºC. Métodos gerais para crioconservação são também descritos em outro lugar no presente, incluindo nos Exemplos. Por questões de clareza, "TILs crioconservados" distinguem-se de amostras congeladas de tecido que podem ser usadas como fonte de TILs primários.

[00442] Por "TILs crioconservados descongelados" entende-se, neste relatório descritivo, uma população de TILs que foi anteriormente crioconservada e então tratada para voltar à temperatura ambiente ou acima, incluindo, entre outras, temperaturas de cultura celular ou temperaturas em que TILs podem ser administrados a um paciente.

[00443] TILs podem geralmente ser definidos quer bioquimicamente, usando marcadores da superfície celular, ou funcionalmente, por sua capacidade para infiltrar tumores e efetuar tratamento. TILs podem ser em geral classificados pela expressão de um ou mais dos seguintes biomarcadores: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 e CD25. Além de e alternativamente, TILs podem ser definidos funcionalmente por sua capacidade para infiltrar tumores sólidos quando da reintrodução em um paciente.

[00444] O termo "meio de crioconservação" ou "meio de crioconservação" refere-se a qualquer meio que pode ser usado para crioconservação de células. Tais meios podem incluir meios que

compreendem DMSO 7% a 10%. Meios exemplares incluem CryoStor CS10, Hyperthermasol, bem como combinações dos mesmos. O termo "CS10" refere-se a um meio de crioconservação que é obtido na Stemcell Technologies ou na Biolife Solutions. O meio CS10 pode ser mencionado pelo nome comercial "CryoStor® CS10". O meio CS10 é um meio sem soro e sem componente animal que compreende DMSO.

[00445] Por "população de células" (incluindo TILs) entende-se, neste relatório descritivo, algumas células que compartilham traços comum. Em geral, o número das populações varia de 1 x 10^6 a 1 x 10^{10}, com populações de TILs diferentes compreendendo números diferentes. Por exemplo, o crescimento inicial de TILs primários na presença de IL-2 resulta em uma população de TILs a granel de aproximadamente 1 x 10^8 células. A expansão REP é geralmente realizada para fornecer populações de 1,5 x 10^9 a 1,5 x 10^{10} células para infusão.

[00446] O termo "célula T de memória central" refere-se a um subconjunto de células T que, no homem, são CD45R0+ e expressam constitutivamente CCR7 ($CCR7^{hi}$) e CD62L ($CD62^{hi}$). O fenótipo de superfície das células T de memória central também inclui TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Os fatores de transcrição para células T de memória central incluem BCL-6, BCL-6B, MBD2 e BMI1. As células T de memória central secretam primariamente IL-2 e CD40L como moléculas efetoras depois de desencadeadas por TCR. As células T de memória central são predominantes no compartimento CD4 no sangue e, no homem, estão proporcionalmente enriquecidas em linfonodos e amígdalas.

[00447] 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 que perderam a expressão constitutiva de CCR7 ($CCR7^{lo}$) e com expressão heterogênea ou baixa de CD62L ($CD62L^{lo}$). O fenótipo de superfície de células T de memória central também

inclui TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Os fatores de transcrição para células T de memória central incluem BLIMP1. As células T de memória efetora secretam rapidamente níveis elevados de citocinas inflamatórias após estimulação antigênica, incluindo interferon-γ, IL-4, e IL-5. As células T de memória efetora são predominantes no compartimento CD8 no sangue e, no homem, estão proporcionalmente enriquecidas no pulmão, fígado e intestino. As células T CD8+ de memória efetora carregam grandes quantidades de perforina. O termo "sistema fechado" refere-se a um sistema que é fechado para o ambiente exterior. Qualquer sistema fechado adequado para métodos de cultura celular pode ser empregado com os métodos da presente invenção. Os sistemas fechados incluem, por exemplo, entre outros, recipientes G fechados. Um vez adicionado um segmento do tumor ao sistema fechado, o sistema não é aberto para o ambiente exterior até que os TILs estejam prontos para serem administrados ao paciente.

[00448] Os termos "fragmentar", "fragmento" e "fragmentado", aqui usados na descrição de processos para romper um tumor, incluem métodos de fragmentação mecânica tais como esmagamento, fatiamento, divisão e morcelação do tecido tumoral, bem como qualquer outro método para romper a estrutura física do tecido tumoral.

[00449] Os termos "células mononucleares do sangue periférico" e "PBMCs" referem-se a uma célula do sangue periférico com núcleo redondo, incluindo linfócitos (células T, células B, células NK) e monócitos. Quando usadas como células apresentadoras de antígeno (PBMCs são um tipo de célula apresentadora de antígeno), as células mononucleares do sangue periférico são células mononucleares do sangue periférico que são alogênicas irradiadas.

[00450] Os termos "linfócitos do sangue periférico" e "PBLs" refere-se a células T expandidas do sangue periférico. Em algumas modalidades, PBLs são separados do sangue total ou são produto de aférese de um doador. Em

algumas modalidades, PBLs são separados do sangue total ou produto de aférese de um doador por seleção positiva ou negativa de uma fenótipo de células T, tal como o fenótipo de células T de CD3+ CD45+.

[00451] O termo “anticorpo anti-CD3” refere-se a um anticorpo ou variante do mesmo, p. ex., um anticorpo monoclonal e incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos ou murinos que são dirigidos contra o receptor de CD3 no receptor de antígenos de células T de células T maduras. Os anticorpos anti-CD3 incluem OKT-3, também conhecido como muromonabe. Outros anticorpos anti-CD3 incluem, por exemplo, otelixizumabe, teplizumabe e visilizumabe.

[00452] O termo “OKT-3” (também aqui referido como “OKT3”) refere-se a um anticorpo monoclonal ou biossimilar ou variante do mesmo, incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos ou murinos que são dirigidos contra o receptor de CD3 no receptor de antígenos de células T de células T maduras, e inclui formas disponíveis comercialmente, tais como OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 puro, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, EUA) e muromonabe ou variantes, substituições conservadoras de aminoácidos, glicoformas ou biossimilares dos mesmos. As sequências de aminoácidos das cadeias pesadas e leves de muromonabe são fornecidas na Tabela 1 (SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2). Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 está depositado na American Type Culture Collection e recebeu o número de acesso ATCC CRL 8001. Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 está depositado também na European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) e recebeu o N*o* de Catálogo 86022706.

Tabela 1. Sequências de aminoácidos de muromonabe

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

[00453] O termo “IL-2” (também aqui referido como “IL2”) refere-se ao fator de crescimento de células T conhecido como interleucina-2, e inclui todas as formas de IL-2, incluindo formas humanas e de mamíferos, substituições conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biossimilares e variantes da mesma. IL-2 é descrita, p. ex., em Nelson, *J. Immunol.* **2004,** *172,* 3983-88 e Malek, *Annu. Rev. Immunol.* **2008,** *26,* 453-79, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. A sequência de aminoácidos de IL-2 humana recombinante adequada para uso na invenção é fornecida na Tabela 2 (SEQ ID NO:3). Por exemplo, o termo IL-2 abrange a forma humana, recombinantes de IL-2 tais como aldesleucina (PROLEUKIN, disponibilizada comercialmente por múltiplos fornecedores em frasco-ampola de 22 milhões de UI para uso único), bem como a forma de IL-2 recombinante fornecida comercialmente pela CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, EUA (CELLGRO GMP) ou pela ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. Nº CYT-209-b) e outros equivalentes comerciais de outros fornecedores. Aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana) é uma forma humana não glicosilada recombinante de IL-2 com peso molecular próximo de 15 kDa. A sequência de aminoácidos de aldesleucina adequada

para uso na invenção é fornecida na Tabela 2 (SEQ ID NO:4). O termo IL-2 também abrange formas peguilhadas de IL-2, como aqui descritas, incluindo o pró-fármaco peguilhado de IL2, NKTR-214, disponibilizado pela Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, EUA. IL-2 peguilada, NKTR-214, adequada para uso na invenção é descrita na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2014/0328791 A1 e Publicação de Pedido de Patente Internacional Nº WO 2012/065086 Al, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Formas alternativas de IL-2 conjugada, adequadas para uso na invenção, são descritas nas Patentes U.S. Nºs 4 766 106, 5 206 344, 5 089 261 e 4902 502, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Formulações de IL-2 adequadas para uso na invenção são descritas na Patente U.S. Nº 6 706 289, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

Tabela 2. Sequências de aminoácidos de interleucinas.

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:3 IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Aldesleucina	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

[00454] O termo “IL-4” (também aqui referido como “IL4”) refere-se à citocina conhecida como interleucina 4, que é produzida por células T Th2 T

e por eosinófilos, basófilos e mastócitos. IL-4 regula a diferenciação de células T *helper* virgens (células Th0) para células T Th2. Steinke and Borish, *Respir. Res.* **2001,** *2,* 66-70. Quando da ativação por IL-4, células T Th2 produzem subsequentemente IL-4 adicional em uma alça de *feedback* positivo. IL-4 também estimula a proliferação de células B e a expressão de MHC classe II MHC, e induz a mudança de classe de células B para expressão de IgE e IgG_1. A IL-4 humana recombinante adequada para uso na invenção é disponibilizada comercialmente por múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. Nº CYT-211) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína IL-15 humana recombinante, Cat. Nº Gibco CTP0043). A sequência de aminoácidos de IL-4 humana recombinante adequada para uso na invenção é fornecida na Tabela 2 (SEQ ID NO:5).

[00455] O termo "IL-7" (também aqui referido como "IL7") refere-se a uma citocina glicosilada derivada de tecido conhecida como interleucina 7, que pode ser obtida de células estromais e epiteliais, bem como de células dendríticas. Fry and Mackall, *Blood* **2002,** *99,* 3892-904. IL-7 pode estimular o desenvolvimento de T células. IL-7 liga-se ao receptor de IL-7, um heterodímero que consiste em receptor alfa de IL-7 e um receptor gama comum, o qual emite uma série de sinais importantes para o desenvolvimento de células T dentro do timo e sobrevivência na periferia. A IL-4 humana recombinante adequada para uso na invenção é disponibilizada comercialmente por múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. Nº CYT-254) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína IL-15 humana recombinante, Cat. Nº Gibco PHC0071). A sequência de aminoácidos de IL-7 humana recombinante adequada para uso na invenção é fornecida na Tabela 2 (SEQ ID NO:6).

[00456] O termo "IL-15" (também aqui referido como "IL15") refere-

se ao fator de crescimento de célula T conhecido como interleucina-15, e inclui todas as formas de IL-2 [sic] incluindo formas humanas e de mamíferos, substituições conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biossimilares e variantes da mesma. IL-15 é descrita, p. ex., em Fehniger and Caligiuri, *Blood* **2001,** *97,* 14-32, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. IL-15 compartilha as subunidades β e γ para sinalização do receptor com IL-2. A IL-15 humana recombinante é uma cadeia polipeptídica única, não glicosilada contendo 114 aminoácidos (e uma metionina N-terminal) com massa molecular de 12,8 kDa. IL-15 humana recombinante é disponibilizada comercialmente por múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. Nº CYT-230-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína IL-15 humana recombinante, Cat. Nº 34-8159-82). A sequência de aminoácidos de IL-15 humana recombinante adequada para uso na invenção é fornecida na Tabela 2 (SEQ ID NO:7).

[00457] O termo "IL-21" (também aqui referido como "IL21") refere-se à proteína citocina pleiotrópica conhecida como interleucina-21, e inclui todas as formas de IL-21 incluindo formas humanas e de mamíferos, substituições conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biossimilares e variantes da mesma. IL-21 é descrita, p. ex., em Spolski and Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2014,** *13,* 379-95, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. IL-21 é produzida primariamente por células T *natural killer* e células T $CD4^+$ humanas ativadas. IL-21 humana recombinante é uma cadeia polipeptídica única, não glicosilada contendo 132 aminoácidos com massa molecular de 15,4 kDa. IL-21 humana recombinante é disponibilizada comercialmente por múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (Cat. Nº CYT-408-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína IL-21 humana recombinante, Cat. Nº 14-8219-80). A sequência de aminoácidos de IL-21

humana recombinante adequada para uso na invenção é fornecida na Tabela 2 (SEQ ID NO:8).

[00458] Quando "uma quantidade eficaz antitumoral", "uma quantidade eficaz inibidora do tumor" ou "quantidade terapêutica" é indicada, a quantidade precisa das composições da presente invenção a serem administradas pode ser determinada por um médico levando em consideração diferenças individuais na idade, peso, tamanho do tumor, extensão da infecção ou metástase e condição do paciente (indivíduo). Pode-se em geral afirmar que uma composição farmacêutica compreendendo os linfócitos citotóxicos geneticamente modificados aqui descritos pode ser administrada a uma dose de 10^4 a 10^{11} células/kg de peso corporal (p. ex., 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 os valores inteiro dentro desses intervalos. As composições com os linfócitos citotóxicos geneticamente modificados pode também ser administrada múltiplas vezes nessas doses. Os linfócitos citotóxicos geneticamente modificados podem ser administrados usando técnicas de infusão que são comumente conhecidas em imunoterapia (ver, p. ex., Rosenberg *et al.*, *New Eng. J. of Med.* **319**: 1676, 1988). A dose ótima e o esquema de tratamento para um paciente em particular podem ser facilmente determinados pelo técnico com competência em medicina, monitorando o paciente quanto a sinais de doença e ajustando o tratamento de acordo.

[00459] O termo "malignidade hematológica", "neoplasia maligna hematológica" ou termos de significado correlativos referem-se a cânceres e tumores em mamíferos do tecido hematopoiético e linfoide, incluindo, entre outros, tecidos do sangue, medula óssea, linfonodos e sistema linfático. Malignidades hematológicas são também referidas como "tumores líquidos". As malignidades hematológicas incluem, entre outras, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma linfocítico crônico (LLC), pequeno linfoma linfocítico

(PLL), leucemia mielogênica aguda (LMA), leucemia mielogênica crônica (LMC), leucemia monocítica aguda (LMoA), linfoma de Hodgkin e linfomas não Hodgkin. O termo “malignidade hematológica de células B” refere-se a malignidades hematológicas que afetam as células B.

[00460] O termo “tumor sólido” refere-se a uma massa anormal de tecido que normalmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo “câncer de tumor sólido” refere-se a tumores sólidos malignos, neoplásicos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, entre outros, sarcomas, carcinomas e linfomas, tais como cânceres do pulmão, mama, próstata, cólon, reto e bexiga. A estrutura tecidual dos tumores sólidos inclui compartimentos teciduais interdependentes incluindo o parênquima (células do câncer) e as células estromais de sustentação nas quais as células cancerígenas estão dispersas e que que podem fornecer um microambiente de sustentação.

[00461] O termo “aspirado por agulha fina” ou FNA refere-se a um tipo de procedimento de biópsia que pode ser empregado para procedimentos de amostragem ou diagnósticos, incluindo amostragem do tumor, no qual uma amostra é retirada, mas o tumor não é removido ou ressecado. Na aspiração por agulha fina, uma agulha oca, por exemplo, de calibre 25-18, é inserida no tumor ou em uma área contendo o tumor, e líquido e células (incluindo tecido) são obtidos para análise ou expansão futura, como aqui descritas. Com um FNA, as células são removidas sem preservação da arquitetura histológica das células do tecido. Um FNA pode compreender TILs. Em alguns casos, uma biópsia de aspirado por agulha fina é realizada usando uma agulha de biópsia por aspiração com agulha filha guiada por ultrassom. Agulhas para FNA são disponibilizadas comercialmente pela Becton Dickinson, Covidien, e similares.

[00462] O termo “biópsia por agulha grossa” refere-se a um tipo de procedimento de biópsia que pode ser empregado para procedimentos de

amostragem ou diagnósticos, incluindo amostragem do tumor, no qual uma amostra é retirada, mas o tumor não é removido ou ressecado. Em uma biópsia por agulha grossa, uma agulha oca, por exemplo, de calibre 16-11, é inserida no tumor ou em uma área contendo o tumor, e líquido e células (incluindo tecido) são obtidos para análise ou expansão futura, como aqui descritas. Com uma biópsia por agulha grossa, as células podem ser removidas com alguma preservação da arquitetura histológica das células do tecido, dado o tamanho maior da agulha em comparação a um FNA. A agulha da biópsia por agulha grossa é geralmente de um tamanho de calibre capaz de preservar pelo menos alguma parte da arquitetura histológica do tumor. Uma biópsia por agulha grossa pode compreender TILs. Em alguns casos, a biópsia por agulha grossa é realizada usando um instrumento de biópsia, um instrumento de biópsia por agulha grossa assistida a vácuo, um instrumento de biópsia por agulha grossa guiada por estereotaxia, um instrumento de biópsia por agulha grossa guiada por ultrassom, um instrumento de biópsia por agulha grossa guiada por IRM disponibilizado comercialmente pela Bard Medical, Becton Dickinson, e similares.

[00463] O termo “tumor líquido” refere-se a uma massa anormal de células que é líquida por natureza. Os cânceres de tumor líquido incluem, entre outros, leucemias, mielomas e linfomas, bem como outras malignidades hematológicas. TILs obtidos de tumores líquidos podem também ser aqui referidos como linfócitos infiltrantes da medula (MILs). TILs obtidos de tumores líquidos, incluindo tumores líquidos circulantes no sangue periférico, podem também ser aqui referidos como PBLs. Os termos MIL, TIL e PBL são usados alternativamente no presente e diferem somente com base no tipo de tecido do qual as células derivam.

[00464] O termo “microambiente”, neste relatório descritivo, pode referir-se a um microambiente de tumor sólido ou hematológico, no todo ou como um subconjunto de células individuais dentro do microambiente. O

microambiente do tumor, neste relatório descritivo, refere-se a uma mistura complexa de "células, fatores solúveis, moléculas de sinalização, matrizes extracelulares e estímulos mecânicos que promovem a transformação neoplásica, apoiam o crescimento e invasão do tumor, protegem o tumor da imunidade do hospedeiro, promovem a resistência terapêutica e fornecem nichos para que metástases dominantes prosperem", como descrito em Swartz, *et al., Cancer Res.,* **2012,** *72,* 2473. Embora tumores expressem antígenos que devessem ser reconhecidos pelas células T, a depuração (*clearance*) do tumor pelo sistema imune é rara por causa da supressão imune pelo microambiente.

[00465] Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratamento de um câncer com um população de TILs remanescentes (rTILs), em que um paciente é pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa antes da infusão de rTILs de acordo com a invenção. Em algumas modalidades, a população de rTILs pode ser fornecida com uma população de TILs emigrantes normais (eTILs), em que um paciente é pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa antes de uma infusão de rTILs e eTILs de acordo com a invenção. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d por 2 dias (dias 27 e 26 antes da infusão de rTIL) e fludarabina 25 mg/m^2/d por 5 dias (dias 27 a 23 antes da infusão de rTIL). Em uma modalidade, depois da quimioterapia não mieloablativa e infusão de rTIL (no dia 0) de acordo com a invenção, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 via intravenosa a 720.000 UI/kg a cada 8 horas de acordo com a tolerância fisiológica.

[00466] Achados experimentais indicam que a linfodepleção antes da transferência adotiva de linfócitos T tumor-específicos desempenha um papel fundamental em melhorar a eficácia do tratamento ao eliminar células T reguladoras e elementos competitivos do sistema imune ("dissipadores de citocinas"). Deste modo, algumas modalidades da invenção utilizam uma

etapa de linfodepleção (às vezes também referida como “condicionamento imunossupressor”) no paciente antes da introdução dos rTILs da invenção.

[00467] Os termos “coadministração”, “coadministrar”, “administrado em combinação com”, “administrar em combinação com”, “simultâneo” e “concomitante”, neste relatório descritivo, abrangem a administração de dois ou mais ingredientes farmacêuticos ativos (em uma modalidade preferida da presente invenção, por exemplo, pelo menos um agonista do canal de potássio em combinação com uma pluralidade de TILs) a um indivíduo de modo que ambos os ingredientes farmacêuticos ativos e/ou seus metabólitos estejam presentes no indivíduo ao mesmo tempo. Coadministração inclui administração simultânea em composições separadas, administração em momentos diferentes em composições separadas ou administração de uma composição na qual dois ou mais ingredientes farmacêuticos ativos estão presentes. A administração simultânea em composições separadas e a administração de uma composição na qual ambos os agentes estão presentes são preferidas.

[00468] O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se àquela quantidade de um composto ou combinação de compostos como aqui descritos que é suficiente para efeito da aplicação pretendida, incluindo, entre outros, tratamento da doença. A quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo da aplicação pretendida (*in vitro* ou *in vivo*) ou do indivíduo e condição da doença em tratamento (p. ex., o peso, idade e sexo do indivíduo), da gravidade da condição de doença ou do modo de administração. O termo também se aplica a uma dose que induzirá uma resposta em particular em células alvo (p. ex., a redução da adesão plaquetária e/ou migração de células). A dose específica variará dependendo dos compostos especialmente escolhidos, do esquema de administração a ser seguido, se o composto é administrado em combinação com outros compostos, o momento de administração, o tecido ao qual este é administrado

e o sistema de liberação física no qual o composto é carregado.

[00469] Os termos “tratamento”, “tratando”, “tratar” e similares referem-se a obter 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 cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. “Tratamento”, neste relatório descritivo, cobre qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, particularmente um humano, e inclui: (a) prevenir a ocorrência da doença em um indivíduo que pode ser predisposto à doença, mas que ainda não foi diagnosticado como portador; (b) inibir a doença, ou seja, parar seu desenvolvimento ou progressão; e (c) aliviar a doença, ou seja, causar a regressão da doença e/ou aliviar ou mais sintomas da doença. “Tratamento” pretende também abranger a liberação de agente visando um efeito farmacológico, mesmo na ausência de uma doença ou condição. Por exemplo, “tratamento” abrange a liberação de uma composição que pode provocar uma resposta imune ou conferir imunidade na ausência de uma condição de doença, p. ex., no caso de uma vacina.

[00470] O termo “heterólogo” quando usado com referência a partes 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 produzido tipicamente por recombinação, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionados dispostos para produzir um novo ácido nucleico funcional, p. ex., um promotor de uma fonte e uma região de codificação de outra fonte, ou regiões de codificação de fontes diferentes. Do mesmo modo, 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 (p. ex., uma proteína de fusão).

[00471] Os termos “identidade de sequência”, “porcentagem de

identidade" e "porcentagem de identidade de sequência" (ou sinônimos dos mesmos, p. ex., "99% idêntico") no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou polipeptídeos, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou apresentam uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácido que são iguais, quando comparadas e alinhadas (introduzindo lacunas, se necessário) para correspondência máxima, não considerando quaisquer substituições conservadoras de aminoácidos como parte da identidade de sequência. A porcentagem de identidade pode ser medida usando software ou algoritmos para comparação de sequências ou por inspeção visual. Vários algoritmos e *software* são conhecidos na técnica que podem ser usados para obter alinhamentos de sequências de aminoácidos ou nucleotídeos. Programas adequados para determinar a porcentagem de identidade de sequência incluem, por exemplo, a suíte BLAST de programas disponibilizados pelo site na internet National Center for Biotechnology Information BLAST do Governo dos Estados Unidos. As comparações entre duas sequências podem ser realizadas com o algoritmo BLASTN ou BLASTP. BLASTN é usado para comparar sequências de ácidos nucleicos, enquanto BLASTP é usado para comparar sequências de aminoácidos. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Califórnia) ou MegAlign, disponibilizados pela DNASTAR, são programas de software adicionais disponíveis publicamente que podem ser usados para alinhar sequências. O técnico no assunto pode determinar parâmetros adequados para alinhamento máximo pelo *software* de alinhamento em particular. Em certas modalidades, são usados os parâmetros padrão do *software* de alinhamento.

[00472] Neste relatório descritivo, o termo "variante" abrange, entre outros, anticorpos ou proteínas de fusão que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos de um anticorpo de referência por meio de uma ou mais substituições, deleções e/ou adições em certas posições dentro ou adjacentes à sequência de aminoácidos do anticorpo

de referência. A variante pode compreender uma ou mais substituições conservadoras em sua sequência de aminoácidos quando comparada à sequência de aminoácidos de um anticorpo de referência. As substituições conservadoras podem envolver, p. ex., a substituição aminoácidos igualmente carregados ou não carregados. A variante retém a capacidade para ligar-se especificamente ao antígeno do anticorpo de referência. O termo variante também inclui anticorpos ou proteínas peguilhados.

[00473] O termo "*in vivo*" refere-se a um evento que acontece no corpo de um indivíduo.

[00474] O termo "*in vitro*" refere-se a um evento que aconteces fora do corpo de um indivíduo. Ensaios *in vitro* abrangem ensaios celulares, nos quais células vivas ou mortas são empregadas, e podem também abranger um ensaio sem células no qual não são empregadas células intactas.

[00475] O termo "expansão rápida" significa um aumento no número de TILs antígeno-específicos de pelo menos aproximadamente 3 vezes (ou 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 vezes) ao longo de um período de uma semana, mais preferivelmente de pelo menos 10 vezes (ou 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 vezes) ao longo de um período de uma semana ou, o mais preferível, de pelo menos cerca de 100 vezes ao longo de um período de uma semana. Alguns protocolos de expansão rápida são delineados abaixo.

[00476] Por "linfócitos infiltrantes de tumor" ou "TILs" entende-se, neste relatório descritivo, uma população de células originalmente obtidas como leucócitos que deixaram a corrente sanguínea de um indivíduo e migraram para um tumor. Os TILs incluem, entre outros, células T $CD8^+$ citotóxicas (linfócitos), células T $CD4^+$ Th1 e Th17, células *natural killer*, células dendríticas e macrófagos M1. Os TILs incluem TILs primários e secundários. "TILs primários" são aqueles obtidos de amostras de tecido do paciente como aqui delineado (às vezes referidos como "recentemente coletados"), e "TILs secundários" são quaisquer populações celulares de TIL

que foram expandidas ou proliferadas como aqui discutido, incluindo, entre outros, TILs a granel e TILs expandidos (“TILs REP”). bem como “reREP TILs” como aqui discutido. TILs reREP podem incluir, por exemplo, TILs de segunda expansão ou TILs de segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP).

[00477] TILs podem geralmente ser definidos quer bioquimicamente, usando marcadores da superfície celular, ou funcionalmente, por sua capacidade para infiltrar tumores e efetuar tratamento. TILs podem ser em geral classificados pela expressão de um ou mais dos seguintes biomarcadores: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 e CD25. Além disso e alternativamente, TILs podem ser definidos funcionalmente por sua capacidade para infiltrar tumores sólidos quando da reintrodução em um paciente. TILs podem ainda ser caracterizados por potência - por exemplo, TILs podem ser considerados potentes se, por exemplo, a liberação de interferon (IFN) for superior a aproximadamente 50 pg/mL, for superior a aproximadamente 100 pg/mL, for superior a aproximadamente 150 pg/mL ou for superior a aproximadamente 200 pg/mL.

[00478] Por “população de células” (incluindo TILs) entende-se, neste relatório descritivo, algumas células que compartilham traços comuns. Em geral, o número nas populações varia de 1 x 10^6 a 1 x 10^{10}, com populações de TILs diferentes compreendendo números diferentes. Por exemplo, o crescimento inicial de TILs primários na presença de IL-2 resulta em uma população de TILs a granel de aproximadamente 1 x 10^8 células. A expansão REP é em geral realizada para fornecer populações de 1,5 x 10^9 a 1,5 x 10^{10} células para infusão.

[00479] O termo “sal farmaceuticamente aceitável” refere-se a sais derivados de uma variedade de contraíons orgânicos e inorgânicos conhecidos na técnica. Sais farmaceuticamente aceitáveis de adição de ácidos podem ser

formados com ácidos inorgânicos e orgânicos. Ácidos inorgânicos preferidos a partir dos quais os sais podem ser derivados incluem, por exemplo, ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido fosfórico. Os ácidos orgânicos preferidos a partir dos quais os sais podem ser derivados incluem, por exemplo, ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malônico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico e ácido salicílico. Os sais farmaceuticamente aceitáveis de adição de bases podem ser formados com bases inorgânicas e orgânicas. As bases inorgânicas a partir das quais os sais podem ser derivados incluem, por exemplo, sódio, potássio, lítio, amônio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês e alumínio. As bases orgânicas a partir das quais os sais podem ser derivados incluem, por exemplo, aminas primárias, secundárias e terciárias, aminas substituídas incluindo aminas substituídas naturais, aminas cíclicas e resinas básicas de troca iônica. Os exemplos específicos incluem isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina e etanolamina. Em algumas modalidades, o sal farmaceuticamente aceitável de adição de base é escolhido dentre sais de amônio, potássio, sódio e magnésio. O termo “cocristal” refere-se a complexos moleculares complexos derivados de alguns formadores de cocristal conhecidos na técnica. Diferentemente de um sal, um cocristal tipicamente não envolve a transferência de hidrogênio entre o cocristal e o fármaco e, em vez disso, envolve interações intermoleculares, tais como ligação de hidrogênio, empilhamento de anéis aromáticos, ou forças dispersivas, entre o formador de cocristal e o fármaco na estrutura cristalina.

[00480] Os termos “veículo farmaceuticamente aceitável” ou “excipiente farmaceuticamente aceitável” destinam-se a incluir todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes

antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores da absorção e ingredientes inertes. O uso de tais veículos farmaceuticamente aceitáveis ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis para ingredientes farmacêuticos ativos é bem conhecido na técnica. Desde que qualquer veículo farmaceuticamente aceitável ou excipiente farmaceuticamente aceitável convencional não seja compatível com o ingrediente farmacêutico ativo, seu uso nas composições da invenção é contemplado. Ingredientes farmacêuticos ativos adicionais, tais como outros fármacos, podem também ser incorporados nas composições e métodos descritos.

[00481] Os termos “cerca de” e “aproximadamente” significam dentro de um intervalo estatisticamente significativo de um valor. Tal intervalo pode ser dentro de uma ordem de magnitude, de preferência dentro de 50%, mais preferivelmente dentro de 20%, ainda mais preferivelmente dentro de 10% e mesmo ainda mais preferivelmente dentro de 5% de um dado valor ou intervalo. A variação permitida abrangida pelos termos “cerca de” ou “aproximadamente” depende dos sistema específico em estudo, e pode ser facilmente reconhecida por qualquer técnico no assunto. Além disso, neste relatório descritivo, os termos “cerca de” e “aproximadamente” significam que dimensões, tamanhos, formulações, parâmetros, formas e outra quantidades e características não são e não precisam ser exatos, mas podem ser aproximados e/ou maiores ou menores, como desejado, refletindo tolerâncias, fatores de conversão, arredondamento, erro de medição e similares, além de outros fatores conhecidos pelos técnicos no assunto. Em geral, uma dimensão, tamanho, formulação, parâmetro, forma ou outra quantidade ou característica é “cerca de” ou “aproximado” quer expressamente afirmado ou não como sendo tal. Note-se que modalidades de tamanhos, formas e dimensões muito diferentes podem empregar os arranjos descritos.

[00482] Os termos de transição “compreendendo”, “consistindo

essencialmente em" e "consistindo em", quando usados nas reivindicações anexadas, na forma original e alterada, definem o âmbito da reivindicação com respeito a quais elementos ou etapas adicionais não mencionados, se houver, estão excluídos do âmbito da(s) reivindicação(ões). O termo "compreendendo" destina-se a ser inclusivo ou aberto e não exclui qualquer elemento, método, etapa ou material adicional não mencionado. O termo "consistindo em" exclui qualquer elemento, etapa ou material além daqueles especificados na reivindicação e, na última instância, impurezas comuns associadas com o(s) material(is) especificado(s). O termo "consistindo essencialmente em" limita o âmbito de uma reivindicação aos elementos, etapas ou materiais especificados e àqueles que não afetam substancialmente a(s) característica(s) básica(s) e inovadora(s) da invenção reivindicada. Todas as composições, métodos e kits aqui descritos que personificam a presente invenção podem, em modalidades alternativas, ser definidos mais especificamente por qualquer um dos termos de transição "compreendendo", "consistindo essencialmente em" e "consistindo em".

III. Processo de produção de TILs - Processo 2A (Processos Gen 2)

[00483] Em algumas modalidades, a invenção provê o método de qualquer um dos processos GEN 2 (p. ex., processo 2A) modificado para usar uma pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina como a fonte de células T para expansão na primeira expansão de qualquer um de tais processos GEN 2, em que (1) a duração da primeira expansão é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão de tal processo GEN 2 ou (2) a duração da segunda expansão de tal processo GEN 2 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão ou (3) a duração da primeira expansão é prolongada e a duração da segunda expansão de tal processo GEN 2 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados

após a segunda expansão.

[00484] Em algumas modalidades, a invenção provê uma população de TILs produzidos pelo método de qualquer um dos processos GEN 2 (p. ex., processo 2A) modificado para usar uma pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina como a fonte de células T para expansão na primeira expansão de qualquer um de tais processos GEN 2, em que (1) a duração da primeira expansão é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão de tal processo GEN 2 ou (2) a duração da segunda expansão de tal processo GEN 2 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão ou (3) a duração da primeira expansão é prolongada e a duração da segunda expansão de tal processo GEN 2 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão.

[00485] Um processo exemplar para TIL, conhecido como processo 2A e o processo da pequena biópsia contendo algumas dessas características é representado na Figura 7, e algumas das vantagens dessa modalidade da presente invenção em relação ao processo 1C são descritas nas Figuras 5 e 6. Uma modalidade do processo 2A é mostrada na Figura 1. Além disso, uma visão geral bem como uma comparação com o processo 2A em relação ao processo exemplar com biópsia por agulha grossa processo é fornecida na Figura 7. O processo 2A (Gen 2), métodos de tratamento usando TILs provenientes do processo 2A e composições de TILs preparadas pelo processo 2A podem ser utilizados em conjunção com pequena biópsia/biópsia por agulha grossa com durações de períodos de expansão ajustadas conforme necessário para alcançar as contagens necessárias de células, como disposto abaixo e por todo o presente pedido de patente.

[00486] Como aqui discutido, a presente invenção pode incluir uma etapa relacionada à reestimulação de TILs crioconservados para aumentar a

sua atividade metabólica e, assim, saúde relativa para transplante em um paciente, e métodos de testagem da dita saúde metabólica. Tal como em geral delineado no presente, TILs são geralmente retirados 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 manipulados geneticamente como discutido abaixo.

[00487] Em algumas modalidades, os TILs podem ser crioconservados. Uma vez descongelados, podem também ser reestimulados para aumentar o seu metabolismo antes da infusão em um paciente.

[00488] Em algumas modalidades, a primeira expansão (incluindo processos referidos como o pré-REP bem como os processos mostrados na Figura 7 como Etapa A) é de 1-19 dias e a segunda expansão (incluindo processos referidos como o REP bem como processos mostrados na Figura 7 as Etapa B) é encurtada para 11-14 dias, como discutido detalhadamente abaixo, bem como nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão (por exemplo, uma expansão descrita como Etapa B na Figura 7) é dividida em dois períodos de 1-2 dias e 3-19 ou, em alguns casos, 1-2 dias e 3-10 dias, e a segunda expansão (por exemplo, uma expansão descrita como etapa D na Figura 7) é de 11-14 dias, como discutido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4, 5, e 7. Em algumas modalidades, a combinação da primeira expansão e segunda expansão (por exemplo, expansões descritas como Etapa B e Etapa D na Figura 7) é encurtada para 22 dias, como discutido detalhadamente abaixo e nos exemplos e figuras.

[00489] As Designações “Etapa” A, B, C, *etc.*, abaixo são em referência à Figura 7. A ordenação das Etapas abaixo e na Figura 7 é exemplar e qualquer combinação ou ordem de etapas, bem como etapas adicionais, repetição de etapas e/ou omissão de etapas é contemplada pelo presente pedido de patente e pelos métodos aqui descritos.

A. Etapa A: Obter uma amostra de tumor do paciente

[00490] Em geral, TILs são inicialmente obtidos de uma amostra do tumor do paciente ("TILs primários"), obtida por uma biópsia por agulha grossa ou procedimento semelhante e, a seguir, expandidos em uma população maior para manipulação futura, como aqui descrito, opcionalmente crioconservados e, opcionalmente, avaliados quanto ao fenótipo e parâmetros metabólicos.

[00491] A amostra de tumor do paciente pode ser obtida por métodos conhecidos na técnica, geralmente através de pequena biópsia, biópsia por agulha grossa, biópsia com agulha ou outros meios para obter uma amostra que contenha uma mistura de tumor e células TIL. Em geral, a amostra do tumor pode ser de qualquer tumor sólido, incluindo tumores primários, tumores invasivos ou tumores metastáticos. A amostra do tumor pode também ser de um tumor líquido, tal como um tumor obtidos de uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, a amostra pode ser de múltiplas pequenas amostras do tumor ou biópsias. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender múltiplas amostras do tumor de um único tumor do mesmo paciente. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender múltiplas amostras do tumor de um, dois, três ou quatro tumores do mesmo paciente. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender múltiplas amostras do tumor de múltiplos tumores do mesmo paciente. O tumor sólido pode ser de qualquer tipo de câncer, incluindo, entre outros, de mama, pancreático, próstata, colorretal, pulmão, cerebral, renal, de estômago e pele (incluindo, entre outros, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular e melanoma). Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço (incluindo, por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), glioblastoma (GBM), câncer gastrointestinal, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Em algumas modalidades, TILs

úteis são obtidos de tumores de melanoma maligno, pois, segundo relatos, estes possuem níveis especialmente elevados de TILs.

[00492] Em geral, a suspensão celular obtida da amostra ou fragmento do tumor é chamada de "população de células primárias" ou população celular "recentemente obtida" ou "recentemente isolada". Em certas modalidades, a população celular recentemente obtida de TILs é exposta a um meio de cultura celular que compreende células apresentadoras de antígeno, IL-2 e OKT-3.

[00493] Em algumas modalidades, se o tumor for metastático e a lesão primária tiver sido tratada/removida eficientemente no passado, a remoção de uma das lesões metastáticas pode ser necessária. Em algumas modalidades, a abordagem menos invasiva é remover uma lesão cutânea, ou um linfonodo no pescoço ou área axilar quando disponível. Em algumas modalidades, uma lesão cutânea ou uma pequena biópsia da mesma é removida. Em algumas modalidades, um linfonodo ou pequena biópsia do mesmo é removido. Em algumas modalidades, uma lesão pulmonar ou hepática metastática, ou um linfonodo intra-abdominal ou torácico ou pequena biópsia dos mesmos pode ser empregado.

[00494] Em algumas modalidades, o tumor é um melanoma. Em algumas modalidades, a pequena biópsia para um melanoma compreende um nevo (*mole*) ou porção do mesmo.

[00495] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com lâmina circular pressionada na pele em volta de um nevo suspeito. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele, e pedaço redondo da pele é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção e porção redonda do tumor é removido.

[00496] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e o nevo inteiro ou crescimento é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e o nevo inteiro ou crescimento é removido juntamente com uma borda pequena de pele com aspecto normal.

[00497] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e somente a parte mais irregular de um nevo ou crescimento é retirada. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e a biópsia incisional é usada quando outras técnicas não podem ser completadas, tal como se um nevo suspeito for muito grande.

[00498] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de pulmão. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por broncoscopia. Geralmente, na broncoscopia, o paciente é colocado sob anestesia e uma ferramenta pequena entra através do nariz ou boca, descendo a garganta e entra nas passagens brônquicas, onde as pequenas ferramentas são usadas para algum remover tecido. Em algumas modalidades, quando o tumor ou crescimento não podem ser atingidos através de broncoscopia, pode ser empregada uma biópsia transtorácica por agulha. Geralmente, para uma biópsia transtorácica por agulha, o paciente está também sob anestesia e uma agulha é inserida através da pele diretamente para o local suspeito para remover uma pequena amostra de tecido. Em algumas modalidades, uma biópsia transtorácica por agulha pode requerer radiologia intervencionista (por exemplo, o uso de radiografias ou exame por TC para orientar a agulha). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por biópsia com agulha. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por ultrassonografia endoscópica (por exemplo, um endoscópio com uma luz é colocado através da boca no esôfago). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida

cirurgicamente.

[00499] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia na cabeça e pescoço. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional, em que um pedaço pequeno de tecido é cortado de uma área que parece anormal. Em algumas modalidades, se a região anormal tiver acesso fácil, a amostra pode ser coletada sem hospitalização. Em algumas modalidades, se o tumor for mais profundo dentro da boca ou garganta, a biópsia pode precisar ser realizada em uma sala cirúrgica, com anestesia geral. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional, em que a área inteira é removida. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é de aspiração por agulha fina (FNA). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é de aspiração por agulha fina (FNA), em que uma agulha muito fina fixada a uma seringa é usada para extrair (aspirar) células de um tumor ou nódulo. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção, em que fórceps de punção são usados para remover um pedaço da área suspeita.

[00500] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia cervical. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida através de colposcopia. Em geral, os métodos de colposcopia empregam o uso de um instrumento de ampliação com luz, preso a binóculos de ampliação (um colposcópio) que é então usado para biópsia de uma seção pequena da superfície do colo do útero. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de conização/em cone. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de conização/em cone, em que uma cirurgia de ambulatório pode ser necessária para remover um pedaço maior de tecido do colo do útero. Em algumas modalidades, a biópsia em cone, além de ajudar a

confirmar um diagnóstico, pode servir como um tratamento inicial.

[00501] O termo “tumor sólido” refere-se a uma massa anormal de tecido que normalmente não contém cistos ou áreas de líquido. Tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo câncer de “tumor sólido” refere-se a tumores sólidos malignos, neoplásicos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, entre outros, sarcomas, carcinomas e linfomas, tais como cânceres do pulmão, mama, câncer de mama triplo negativo, próstata, cólon, reto e bexiga. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de não pequenas células. A estrutura tecidual dos tumores sólidos inclui compartimentos teciduais interdependentes incluindo o parênquima (células do câncer) e as células estromais de sustentação nas quais as células cancerígenas estão dispersas e que podem fornecer um microambiente de sustentação.

[00502] Em algumas modalidades, a amostra do tumor é obtida como um aspirado por agulha fina (FNA), uma biópsia por agulha grossa, uma pequena biópsia (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção). Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 10. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 10 onde estão 1 ou 2 amostras por biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 100 onde estão 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais amostras de biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 500 onde estão 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais amostras de biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia.

[00503] O FNA pode ser obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma. Em algumas

modalidades, o FNA é obtido de um tumor de pulmão, tal como um tumor de pulmão de um paciente com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Em alguns casos, o paciente com CPNPC submeteu-se anteriormente a um tratamento cirúrgico.

[00504] TILs aqui descritos podem ser obtidos de uma amostra de FNA. Em alguns casos, a amostra de FNA é obtida ou isolada do paciente usando uma agulha de calibre fino variando de agulha de calibre 18 a uma agulha de calibre 25. A agulha de calibre fino pode ser de calibre 18, calibre 19, calibre 20, calibre 21, calibre 22, calibre 23, calibre 24 ou calibre 25. Em algumas modalidades, a amostra de FNA do paciente pode conter pelo menos 400.000 TILs, p. ex., 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs ou mais.

[00505] Em alguns casos, os TILs aqui descritos são obtidos de uma amostra de biópsia por agulha grossa. Em alguns casos, a amostra de biópsia por agulha grossa é obtida ou isolada do paciente usando uma agulha cirúrgica ou clínica variando de agulha de calibre 11 a agulha de calibre 16. A agulha pode ser de calibre 11, calibre 12, calibre 13, calibre 14, calibre 15 ou calibre 16. Em algumas modalidades, a amostra de biópsia por agulha grossa do paciente pode conter pelo menos 400.000 TILs, p. ex., 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs ou mais.

[00506] Em geral, a suspensão celular coletada é chamada de “população de células primárias” ou população celular “recentemente coletada”.

[00507] Em algumas modalidades, os TILs não são obtidos de material digerido do tumor. Em algumas modalidades, as amostras do tumor sólido não são fragmentadas.

[00508] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos de material digerido do tumor. Em algumas modalidades, o material digerido do tumor foi gerado por incubação em meio com enzimas, por exemplo, entre outros, RPMI 1640, GlutaMAX 2 mM, gentamicina 10 mg/mL, DNase 30 U/mL e colagenase 1,0 mg/mL, seguida por dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de ter sido colocado em meio com enzimas, o tumor pode ser dissociado mecanicamente por aproximadamente 1 minuto. A solução pode então ser incubada por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5% e , a seguir, rompida mecanicamente mais uma vez por aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado novamente por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5%, o tumor pode ser rompido mecanicamente uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, depois da terceira ruptura mecânica, se pedaços grandes de tecido estivessem presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais eram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 ºC em CO_2 5%. Em algumas modalidades, no fim da incubação final se a suspensão celular contivesse um número grande de eritrócitos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade, usando Ficoll, podia ser realizada para remover essas células.

[00509] Em algumas modalidades, a suspensão celular coletada, antes da etapa de primeira expansão, é chamada de “população de células primárias” ou população celular “recentemente coletada”.

[00510] Em algumas modalidades, as células podem ser opcionalmente congeladas, após coleta na amostra, e congeladas antes de admitidas na expansão descrita na etapa B, a qual é descrita mais detalhadamente abaixo, bem como exemplificada na Figura 7.

B. Etapa B: Primeira expansão

[00511] Em algumas modalidades, os presentes métodos permitem obter TILs jovens, que são capazes de ciclos aumentados de replicação quando da administração a um indivíduo/paciente e, sendo assim, podem

proporcionar benefícios terapêuticos adicionais em relação a TILs mais velhos (ou seja, TILs que ainda passaram por mais rodadas de replicação antes da administração a um indivíduo/paciente). Características de TILs jovens foram descritas 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), todos os quais são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência.

[00512] Os diversos receptores de antígenos de linfócitos T e B são produzidos por recombinação somática de um número limitado, mas grande de segmentos gênicos. Esses segmentos gênicos: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de células T (TCRs). A presente invenção provê um método para gerar TILs que exibem e aumentam a diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T quando comparados a TILs recentemente coletados e/ou TILs preparados usando outros métodos diferentes daqueles aqui providos, por exemplo, métodos que não aqueles incorporados na Figura 1. Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T quando comparados a TILs recentemente coletados e/ou TILs preparados usando métodos referidos como processo 1C, conforme exemplificado na Figura 3 e/ou Figura 4. Em algumas modalidades, os TILs

obtidos na primeira expansão exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, o aumento é um aumento na diversidade de imunoglobulinas e/ou na diversidade de receptores de células T. Em algumas modalidades, a diversidade é na imunoglobulina e é na cadeia pesada de imunoglobulinas. Em algumas modalidades, a diversidade é na imunoglobulina e é na cadeia leve de imunoglobulinas. Em algumas modalidades, a diversidade é no receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade é em um dos receptores de células T selecionado dentre o grupo que consiste em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de TCRab (ou seja, TCRα/β).

[00513] Após obter o fragmento ou fragmentos do tumor por pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina (os quais podem ser referidos como “amostras” ou “fragmentos”), por exemplo, tal como descrito na etapa A da Figura 7, as células resultantes são cultivadas em soro contendo IL-2 sob condições que favorecem mais o crescimento de TILs do que as tumorais e de outras células. Em algumas modalidades, o material digerido do tumor é incubado em cavidades de 2 mL em meio compreendendo soro AB humano inativado com 6000 UI/mL de IL-2. Essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, em geral de 3 a 14 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 7 a 14 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 149 dias, resultando em uma

população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de aproximadamente 3-19 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, IL-2 é incluída durante os dias 1-2 da primeira expansão e OKT3 e alimentadoras são adicionados no dia 3 da primeira expansão. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-19. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-18. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-17 . Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-16 dias. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-15. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-14. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-13. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-12. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-11. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-10. Em algumas modalidades, o OKT3 e as alimentadoras são incluídas nos dias 3-9. Em uma modalidade preferida, a expansão de TILs pode ser realizada usando uma etapa inicial de expansão de TILs a granel (por exemplo, tal como aquelas descritas na etapa B da Figura 7, as quais podem incluir processos referidos como pré-REP) como descrito abaixo e aqui, seguida por uma segunda expansão (Etapa D, incluindo processos referidos como etapas do Protocolo de Expansão Rápida (REP)) como descrito abaixo na Etapa D, seguida por crioconservação opcional e seguida por uma segunda Etapa D e aqui (incluindo processos referidos como etapas de REP com reestimulação) como descrito abaixo e aqui. Os TILs obtidos desse processo podem ser opcionalmente classificados quanto às características fenotípicas e parâmetros metabólicos como aqui descrito.

[00514] Em modalidades em que as culturas de TIL são iniciadas em placas de 24 cavidades, por exemplo, usando uma placa de cultura celular Costar de fundo plano com 24 cavidades (Corning Incorporated, Corning, NY, cada cavidade pode ser semeada com 1 x 10^6 células tumorais de pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina ou um fragmento de tumor por pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina em 2 mL de meio completo (CM) com IL-2 (6000 UI/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA).

[00515] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão é referido como "CM", uma abreviação para meio de cultura. Em algumas modalidades, CM para a Etapa B consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano 10%, Hepes 25 mM e gentamicina 10 mg/mL. Em modalidades em que as culturas são iniciadas em frascos permeáveis a gases com 40 mL de capacidade e fundo de silicone permeável a gases de 10 cm^2 (por exemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Figura 1), cada frasco foi carregado com 10–40 x 10^6 células tumorais viáveis de pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina ou 5-30 fragmentos do tumor de pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina em 10-40 mL de CM com IL-2. Tanto as placas G-Rex10 como as de 24 cavidades foram incubadas em uma incubadora umidificada a 37 ºC em CO_2 5% e, 5 dias depois do início da cultura, a metade do meio foi removida e substituída por CM fresco e IL-2 e, após 5 dias, a metade do meio foi trocada a cada 2–3 dias.

[00516] Após a coleta em fragmentos tumorais da pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina, as células resultantes (ou seja, fragmentos) são cultivados em soro contendo IL-2 sob condições que favorecem mais o crescimento de TILs do que as tumorais e de outras células. Em algumas modalidades, o tumor fragmentos são incubados em cavidades

de 2 mL em meio compreendendo soro AB humano inativado (ou, em alguns casos, como aqui delineado, na presença de população de células aAPC) com 6000 UI/mL de IL-2. Essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, em geral de 10 a 14 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, o meio de crescimento durante a primeira expansão compreende IL-2 ou uma variante da mesma. Em algumas modalidades, a IL é IL-2 humana recombinante (rhIL-2). Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20-30 x 10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20-30 x 10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 25 x 10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 30 x 10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 4-8 x 10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 5-7 x 10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 6 x 10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 é preparada como descrito no Exemplo 4. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 10.000 UI/mL de IL-2, cerca de 9.000 UI/mL de IL-2, cerca de 8.000 UI/mL de IL-2, cerca de 7.000 UI/mL de IL-2, cerca de 6000 UI/mL de IL-2 ou cerca de 5.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 9.000 UI/mL de IL-2 a 5.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 8.000 UI/mL de IL-2 a 6.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 7.000 UI/mL de

IL-2 a 6.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 6.000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende cerca de 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular compreende cerca de 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende cerca de 1000 UI/mL, cerca de 1500 UI/mL, cerca de 2000 UI/mL, cerca de 2500 UI/mL, cerca de 3000 UI/mL, cerca de 3500 UI/mL, cerca de 4000 UI/mL, cerca de 4500 UI/mL, cerca de 5000 UI/mL, cerca de 5500 UI/mL, cerca de 6000 UI/mL, cerca de 6500 UI/mL, cerca de 7000 UI/mL, cerca de 7500 UI/mL ou cerca de 8000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende entre 1000 e 2000 UI/mL, entre 2000 e 3000 UI/mL, entre 3000 e 4000 UI/mL, entre 4000 e 5000 UI/mL, entre 5000 e 6000 UI/mL, entre 6000 e 7000 UI/mL, entre 7000 e 8000 UI/mL ou cerca de 8000 UI/mL de IL-2.

[00517] Em algumas modalidades, a primeira expansão é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB. Por exemplo, o meio de cultura celular da segunda população de TILs é suplementado com OKT3, IL-15, um anticorpo agonista de OX40, um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de OKT3 e IL-15, uma combinação de OKT3 e um anticorpo agonista de OX40, uma combinação de OKT3 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de IL-15 e um anticorpo agonista de OX40, uma combinação de IL-15 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de um anticorpo agonista de OX40 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de OKT3, IL-15 e um anticorpo agonista de OX40, uma combinação de OKT3, IL-15 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de OKT3, um anticorpo

agonista de OX40 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de IL-15, um anticorpo agonista de OX40 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de OKT3, IL-15, um anticorpo agonista de OX40 e um anticorpo agonista de 4-1BB, e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, IL-15 não é incluída.

[00518] Após obter os fragmentos tumorais por pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina, por exemplo, tal como descrito na etapa A da Figura 7A, as células resultantes são cultivadas em soro contendo IL-2 sob condições que favorecem mais o crescimento de TILs do que as tumorais e de outras células. Em algumas modalidades, o tumor fragmentos são incubados em cavidades de 2 mL em meio compreendendo soro AB humano inativado com 6000 UI/mL de IL-2. Essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente de 1 a 19 dias, resultando em uma população de TIL de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 11 a 19 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 18 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 18 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 17 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 17 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 16 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 16 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 15 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 15 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 14 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos

5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 14 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 13 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 13 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 12 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 12 dias. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 1 a 11 dias, resultando em uma população de TILs a granel de pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL em pelo menos 11 dias. Em algumas modalidades, a população de TILs tem pelo menos aproximadamente 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) células TIL no final da etapa da primeira expansão (por exemplo, tal como aquelas descritas na etapa B da Figura 7, as quais podem incluir processos referidos como pré-REP).

[00519] Em uma modalidade preferida, a expansão de TILs pode ser realizada usando uma etapa inicial de expansão de TILs a granel (por exemplo, tal como aquelas descritas na etapa B da Figura7, as quais podem incluir processos referidos como pré-REP) como descrito abaixo e aqui, seguida por uma segunda expansão (Etapa D, incluindo processos referidos como etapas de Protocolo de Expansão Rápida (REP)), como descrito abaixo sob a Etapa D e aqui, seguida por crioconservação opcional e seguida por uma segunda Etapa D (incluindo processos referidos como etapas de REP com reestimulação) como descrito abaixo e aqui. Os TILs obtidos desse processo podem ser opcionalmente classificados quanto às características fenotípicas e parâmetros metabólicos como aqui descrito.

[00520] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão é referido como “CM”, uma abreviação para meio de cultura. Em algumas modalidades, CM for Etapa B consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano 10%, Hepes 25 mM, e

gentamicina 10 mg/mL. Em modalidades em que as culturas são iniciadas em frascos permeáveis a gases com 40 mL de capacidade e fundo de silicone permeável a gases de 10 cm^2 (por exemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN), cada frasco foi carregado com amostras de 1-2 biópsia em 10-40 mL de CM com IL-2. Tanto as placas G-Rex10 como as de 24 cavidades foram incubadas em uma incubadora umidificada a 37 ºC em CO_2 5% e, 5 dias depois do início da cultura, a metade do meio foi removida e substituída por CM fresco e IL-2 e, depois de 2 dias, a metade do meio foi trocada a cada 2-3 dias. Em algumas modalidades, quando a biópsia por agulha grossa é de um tumor ovariano (p. ex., de origem ovariana), os fragmentos são incubados em CM e IL-2 por 1-2 dias. Em algumas modalidades, quando a biópsia por agulha grossa é de células tumorais pancreáticas (p. ex., de origem pancreática), os fragmentos são incubados em CM e IL-2/IL-15/IL-21 por 1-2 dias. Em algumas modalidades, no dia 3, OKT3 e células alimentadoras são adicionados aos fragmentos. Em algumas modalidades, no dia 3, 30 ng de OKT3 e 10^6 células alimentadoras são adicionados aos fragmentos.

[00521] Os fragmentos ou amostras de pequena biópsia são cultivados em soro contendo IL-2 sob condições que favorecem mais o crescimento de TILs do que as tumorais e de outras células. Em algumas modalidades, os fragmentos ou amostras de pequena biópsia são incubados em cavidades de 2 mL em meio compreendendo soro AB humano inativado (ou, em alguns casos, como aqui delineado, na presença de população de células aAPC) com 6000 UI/mL de IL-2. Essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente de 1 a 19 dias, resultando em uma população de TILs a granel, de pelo menos aproximadamente $5x10^7$ células TIL no dia 11 e, em algumas modalidades, $1x10^8$ TILs nos dias 19 ao 28. Em algumas modalidades, o meio de crescimento durante a primeira expansão compreende IL-2 ou uma variante da mesma. Em algumas modalidades, a IL é IL-2

humana recombinante (rhIL-2). Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20-30x10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20x10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 25x10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 30x10^6 UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 4-8x10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 5-7x10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 6x10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 é preparada como descrito no Exemplo E. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 10.000 UI/mL de IL-2. cerca de 9.000 UI/mL de IL-2. cerca de 8.000 UI/mL de IL-2. cerca de 7.000 UI/mL de IL-2. cerca de 6000 UI/mL de IL-2 ou cerca de 5.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 9.000 UI/mL de IL-2 a 5.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 8.000 UI/mL de IL-2 a 6.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 7.000 UI/mL de IL-2 a 6.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 6.000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende cerca de 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular compreende cerca de 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende

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

[00522] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 500 UI/mL de IL-15, cerca de 400 UI/mL de IL-15, cerca de 300 UI/mL de IL-15, cerca de 200 UI/mL de IL-15, cerca de 180 UI/mL de IL-15, cerca de 160 UI/mL de IL-15, cerca de 140 UI/mL de IL-15, cerca de 120 UI/mL de IL-15 ou cerca de 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 500 UI/mL de IL-15 a 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 400 UI/mL de IL-15 a 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 300 UI/mL de IL-15 a 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende cerca de 200 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende cerca de 180 UI/mL de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-15. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular compreende cerca de 180 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, IL-15 é incluída quando os fragmentos são de um tumor pancreático (p. ex., de origem pancreática).

[00523] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende aproximadamente 20 UI/mL de IL-21,

aproximadamente 15 UI/mL de IL-21, aproximadamente 12 UI/mL de IL-21, aproximadamente 10 UI/mL de IL-21, aproximadamente 5 UI/mL de IL-21, aproximadamente 4 UI/mL de IL-21, aproximadamente 3 UI/mL de IL-21, aproximadamente 2 UI/mL de IL-21, aproximadamente 1 UI/mL de IL-21 ou aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a 1 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão compreende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-21. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, IL-21 é incluída quando os fragmentos são de um tumor pancreático (p. ex., de origem pancreática).

[00524] Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 30 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 0,1 ng/mL, aproximadamente 0,5 ng/mL, aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente 2,5 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente

7,5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, aproximadamente 100 ng/mL, aproximadamente 200 ng/mL, aproximadamente 500 ng/mL e aproximadamente 1 µg/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular 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. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular não compreende anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o anticorpo OKT-3 é muromonabe.

Tabela 3: Sequências de aminoácidos de muromonabe (anticorpo OKT-3 exemplar)

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

[00525] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende um ou mais agonistas de TNFRSF em um meio de cultura

celular. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF compreende um agonista de 4-1BB. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é um agonista de 4-1BB, e o agonista de 4-1BB é selecionado dentre o grupo que consiste em urelumabe, utomilumabe, EU-101, uma proteína de fusão e fragmentos, derivados, variantes, biossimilares e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é adicionado a uma concentração suficiente para conseguir uma concentração no meio de cultura celular entre 0,1 µg/mL e 100 µg/mL. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é adicionado a uma concentração suficiente para conseguir uma concentração no meio de cultura celular entre 20 µg/mL e 40 µg/mL.

[00526] Em algumas modalidades, além de um ou mais agonistas de TNFRSF, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2 a uma concentração inicial de aproximadamente 3000 UI/mL e anticorpo OKT-3 a uma concentração inicial de aproximadamente 30 ng/mL, e em que um ou mais dos agonistas de TNFRSF compreendem um agonista de 4-1BB.

[00527] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão é referido como "CM", uma abreviação para meio de cultura. Em algumas modalidades, é referido como CM1 (meio de cultura 1). Em algumas modalidades, CM consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano 10%, Hepes 25 mM e gentamicina 10 mg/mL. Em modalidades em que as culturas são iniciadas em frascos permeáveis a gases com 40 mL de capacidade e fundo de silicone permeável a gases de 10 cm^2 (por exemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN). Em algumas modalidades, o CM é o CM1 descrito nos Exemplos, ver, Exemplo 1 Em algumas modalidades, a primeira expansão ocorre em um meio de cultura celular inicial ou um primeiro meio de cultura celular. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular inicial ou o primeiro meio de cultura celular compreende IL-2.

[00528] Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão

(incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 7, que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP) é de aproximadamente 1-19 dias, um período de tempo suficiente para obter 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs, como discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 7, que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP) é dividida em duas fases, 1-2 dias e 3 a 19 dias, como disposto na Figura 7 e 38. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é dividida em duas fases, 1-2 dias (cultura com IL-2 ou IL2/IL-15/IL-21) e 3 a 19 dias (cultura com OKT3 e alimentadoras), conforme disposto na Figura 7 e 38.

[00529] Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 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, 14 dias, 14 dias, 14 dias, 14 dias, 14 dias, 14 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 1 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 2 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 3 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 6 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 7 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 8 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 9 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em

algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 10 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 11 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 12 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 13 dias a 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 16 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 17 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 18 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 19 dias, a fim de obter pelo menos 5 x 10^7 (ou seja, 50 milhões) TILs. Em algumas modalidades, a pequena biópsia (p. ex., a biópsia por agulha grossa) é removida da cultura em aproximadamente 1, 2 ou 3 dias. Em algumas modalidades, a pequena biópsia (p. ex., a biópsia por agulha grossa) é removida da cultura no dia 3.

[00530] Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 é empregada como uma combinação durante a primeira expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante a primeira expansão, incluindo, por exemplo, durante processos da Etapa B de acordo com a Figura 7, bem como aqui descrito. Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 é empregada como uma combinação durante a primeira expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21 bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante

processos da Etapa B de acordo com a Figura 7 e como aqui descrito. Em algumas modalidades, IL-15 e/ou IL-21 são adicionadas no dia 1. Em algumas modalidades, IL-15 e/ou IL-21 são adicionadas no dia 1 se a biópsia por agulha grossa for de um tumor pancreático (p. ex., de origem pancreática). Em algumas modalidades, IL-15 não é incluída. Em algumas modalidades, IL-21 não é incluída. Em algumas modalidades, nem IL-15 nem IL-21 é incluída.

[00531] Em algumas modalidades, a primeira expansão, por exemplo, Etapa B de acordo com a Figura 7, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o único biorreator empregado é, por exemplo, um GREX-10 ou um GREX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

[00532] Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL gera pelo menos 50 x 10^6 TILs, p. ex., 50 x 10^6 (ou seja, 5 x 10^7), 55 x 10^6, 60 x 10^6, 65 x 10^6, 70 x 10^6, 75 x 10^6, 80 x 10^6, 85 x 10^6, 90 x 10^6, 95 x 10^6, 100 x 10^6, 105 x 10^6, 110 x 10^6, 115 x 10^6, 120 x 10^6, 125 x 10^6, 150 x 10^6, 200 x 10^6, 300 x 10^6, 400 x 10^6 ou mais.

C. Etapa C: Transição da primeira expansão para a segunda expansão

[00533] Em alguns casos, a população de TILs a granel obtida na primeira expansão, incluindo por exemplo, a população de TILs obtida, por exemplo, na Etapa B como indicado na Figura 7, pode ser crioconservada imediatamente, usando os protocolos discutidos abaixo. Alternativamente, a população de TILs obtida na primeira expansão, referida como a segunda população de TILs, pode ser submetida a uma segunda expansão (a qual pode incluir expansões às vezes referidas como REP) e então crioconservada como discutido abaixo. Do mesmo modo, caso os TILs geneticamente modificados venham a ser usados em terapia, a primeira população de TILs (às vezes

referida como a população de TILs a granel) ou a segunda população de TILs (a qual pode, em algumas modalidades, incluir populações referidas como as populações de TILs REP) pode ser pode ser submetida a modificações genéticas para tratamentos adequados antes da expansão ou depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

[00534] Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão (por exemplo, na Etapa B como indicado na Figura 7) são armazenados até que fenotipados para seleção. Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão (por exemplo, na Etapa B como indicado na Figura 7) não são armazenados e prosseguem diretamente para a segunda expansão. Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão não são crioconservados após a primeira expansão e antes da segunda expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 3 dias, 4, dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dia, ou 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para segunda expansão ocorre em aproximadamente 3 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 4 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 4 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 7 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira

expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 10 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 11 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 12 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 13 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 14 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 15 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 16 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 17 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 18 dias a 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 10 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira

expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 11 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 12 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 13 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 14 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 15 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 16 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 17 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 18 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 19 dias desde quando os fragmentos são adicionados ao meio de cultura para a primeira expansão.

[00535] Em algumas modalidades, os TILs não são armazenados após a primeira expansão e antes da segunda expansão, e os TILs prosseguem

diretamente para a segunda expansão (por exemplo, em algumas modalidades, não há armazenamento durante a transição da Etapa B para a Etapa D como mostrado na Figura 7). Em algumas modalidades, a transição ocorre no sistema fechado, como aqui descrito. Em algumas modalidades, os TILs da primeira expansão, a segunda população de TILs, prossegue diretamente para a segunda expansão sem período de transição.

[00536] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão, por exemplo, Etapa C de acordo com a Figura 7, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o único biorreator empregado é, por exemplo, um GREX-10 ou um GREX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

D. Etapa D: Segunda expansão

[00537] Em algumas modalidades, a população celular de TILs tem o número expandido após a coleta e o processamento a granel inicial, por exemplo, após a Etapa A e Etapa B, e a transição referida como Etapa C, como indicado na Figura 7) [sic]. Essa expansão adicional é referida como a segunda expansão, a qual pode incluir processos de expansão em geral referidos na arte como um processo de expansão rápida (REP; assim como processos indicados na etapa D da Figura 7). A segunda expansão é geralmente realizada usando um meio de cultura que compreende alguns componentes, incluindo células alimentadoras, uma fonte de citocinas e um anticorpo anti-CD3, em um recipiente permeável a gases.

[00538] Em algumas modalidades, a segunda expansão ou segunda expansão de TILs (a qual pode incluir expansões às vezes referidas como REP; bem como processos como indicados na etapa D da Figura 7) pode ser realizada usando quaisquer frascos ou recipientes para TILs conhecidos pelos

técnicos no assunto. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 10 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 11 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 12 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 13 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 14 dias.

[00539] Em uma modalidade, a segunda expansão pode ser realizada em um recipiente permeável a gases pelos métodos da presente invenção (incluindo por exemplo, expansões referidas como REP; bem como processos como indicados na etapa D da Figura 7). Por exemplo, TILs podem ser expandidos rapidamente utilizando estimulação não específica de receptores de células T na presença de interleucina-2 (IL-2) ou interleucina-15 (IL-15). O estímulo não específico de receptores de células T pode incluir, por exemplo, cerca de 30 ng/mL de OKT3, um anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3 (disponibilizado comercialmente pela Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA). TILs podem ser expandidos para induzir estimulação adicional dos TILs *in vitro* incluindo um ou mais antígenos durante a segunda expansão, incluindo porções antigênicas dos mesmos, tais como epítopo(s), do câncer, os quais podem ser opcionalmente expressos a partir de um vetor, tal como um peptídeo de ligação ao antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), p. ex., MART-1 0,3 μM:26-35 (27 L) ou gpl 00:209-217 (210M), opcionalmente na presença de um fator de crescimento de células T, tal como IL-2 ou IL-15 300 UI/mL. Outros antígenos adequados podem incluir, p. ex., NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno do câncer de tirosinase, MAGE-A3, SSX-2 e VEGFR2, ou porções

antigênicas dos mesmos. TILs podem também ser expandidos rapidamente por reestimulação com o(s) mesmo(s) antígeno(s) do câncer pulsados em células apresentadoras de antígeno que expressam HLA-A2. Alternativamente, os TILs podem ser reestimulados ainda com, p. ex., exemplo, linfócitos autólogos irradiados ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. Em algumas modalidades, a reestimulação ocorre como parte da segunda expansão. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre na presença de linfócitos autólogos irradiados ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. Em algumas modalidades, 13 x 10^6 células alimentadoras são adicionadas durante a segunda expansão. Em algumas modalidades, 13 x 10^6 células alimentadoras são adicionadas no início da segunda expansão.

[00540] Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende cerca de 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende cerca de 1000 UI/mL, cerca de 1500 UI/mL, cerca de 2000 UI/mL, cerca de 2500 UI/mL, cerca de 3000 UI/mL, cerca de 3500 UI/mL, cerca de 4000 UI/mL, cerca de 4500 UI/mL, cerca de 5000 UI/mL, cerca de 5500 UI/mL, cerca de 6000 UI/mL, cerca de 6500 UI/mL, cerca de 7000 UI/mL, cerca de 7500 UI/mL ou cerca de 8000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende entre 1000 e 2000 UI/mL, entre 2000 e 3000 UI/mL, entre 3000 e 4000 UI/mL, entre 4000 e 5000 UI/mL, entre 5000 e 6000 UI/mL, entre 6000 e 7000 UI/mL, entre 7000 e 8000 UI/mL ou entre 8000 UI/mL de IL-2.

[00541] Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende anticorpo OKT3. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende cerca de 30 ng/mL de anticorpo OKT3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 0,1 ng/mL, aproximadamente 0,5 ng/mL, aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente

2,5 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 7,5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, aproximadamente 100 ng/mL, aproximadamente 200 ng/mL, aproximadamente 500 ng/mL, e aproximadamente 1 μg/mL de anticorpo OKT3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular 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.

[00542] Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 é empregada como uma combinação durante a segunda expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante a segunda expansão, incluindo, por exemplo, durante processos da Etapa D de acordo com a Figura 7, bem como aqui descrito. Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 é empregada como uma combinação durante a segunda expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21 bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante processos da Etapa D de acordo com a Figura 7 e como aqui descrito.

[00543] Em algumas modalidades, a segunda expansão pode ser conduzida em um meio de cultura celular suplementado compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura celular suplementado. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular suplementado compreende IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o segundo meio de

cultura celular compreende IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs; também aqui referidas como células alimentadoras apresentadoras de antígeno, células alimentadoras ou alimentadoras). Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno (ou seja, células apresentadoras de antígeno).

[00544] Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da população de TILs na segunda expansão com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB (às vezes referida como a segunda população de TILs). Por exemplo, o meio de cultura celular da população de TILs na segunda expansão é suplementado com IL-15, um anticorpo agonista de OX40, um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de IL-15 e um anticorpo agonista de OX40, uma combinação de IL-15 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de um anticorpo agonista de OX40 e um anticorpo agonista de 4-1BB, uma combinação de IL-15, um anticorpo agonista de OX40 e um anticorpo agonista de 4-1BB, e quaisquer combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, OX40 é incluído quando os fragmentos são de um tumor ovariano (p. ex., de origem ovariana). Em algumas modalidades, OKT-3 é adicionado durante a primeira e/ou segunda expansão. Em algumas modalidades, OKT-3 é adicionado no dia-3, juntamente com as células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs). Em algumas modalidades, quando a amostra é de um FNA, OKT-3 é adicionado no dia-1, juntamente com as células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs).

[00545] Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs) são PBMCs. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs e/ou células apresentadoras de antígeno na expansão rápida e/ou na segunda expansão é aproximadamente 1 para 25, aproximadamente 1 para 50, aproximadamente 1 para 100, aproximadamente

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

[00546] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão é realizada em frascos, sendo os TILs a granel misturados com 100 ou 200 vezes de excesso de células alimentadoras inativadas, anticorpo anti-CD3 OKT3 30 mg/mL e IL-2 3000 UI/mL em 150 mL de meio. A substituição do meio é efetuada (em geral 2/3 do meio são substituídos por respiração com meio fresco) até que as células sejam transferidas para uma câmara alternativa de crescimento. As câmaras alternativas de crescimento incluem frascos GREX e recipientes permeáveis a gases como discutidas mais completamente abaixo.

[00547] Em algumas modalidades, a segunda expansão (que pode incluir processos referidos como o processo REP) é de 11-14 dias, como discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a segunda expansão é de 11 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão é de 12 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão é de 13 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão é e 14 dias.

[00548] Em uma modalidade, o REP e/ou a segunda expansão pode ser realizada usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gases como descrito anteriormente (Tran, *et al.*, *J. Immunother.* **2008,** *31,* 742-51; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003,** *26,* 332-42) ou utensílios para cultura permeáveis a gases

(frascos G-Rex). Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como expansões rápidas) é realizada em frascos T-175, e cerca de 1 x 10^6 TILs suspensos em 150 mL de meio pode ser adicionado a cada frasco T-175. Os TILs podem ser cultivados em uma mistura 1 para de CM e meio AIM-V, suplementado com 3000 UI por mL de IL-2 e 30 ng por mL de anti-CD3. Os frascos T-175 podem ser incubados a 37 ºC em CO_2 5%. A metade do meio pode ser pode ser trocada em 5 dias, usando 50/50 de meio com 3000 UI por mL de IL-2. Em algumas modalidades, em 7 dias, as células de dois frascos T-175 podem ser combinadas em uma bolsa de 3 L, e 300 mL de AIM V com soro AB humano 5% e 3000 UI por mL de IL-2 foram adicionados aos 300 mL da suspensão de TILs. O número de células em cada bolsa foi contado a cada dia ou dois dias e meio fresco foi adicionado para manter a contagem das células entre 0,5 e 2,0 x 10^6 células/mL.

[00549] Em uma modalidade, a segunda expansão (que pode incluir expansões referidas como REP, bem como aquelas referidas na etapa D da Figura 7) pode ser realizada em frascos permeáveis a gases com capacidade de 500 mL e fundo de silicone permeável a gases de 100 cm (G-Rex 100, disponibilizado comercialmente pela Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EUA), 5 x 10^6 ou 10 x 10^6 TILs podem ser cultivados com PBMCs em 400 mL de meio 50/50, suplementado com soro AB humano 5%, 3000 UI por mL de IL-2 e 30 ng por mL de anti-CD3 (OKT3). Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37 ºC em CO_2 5%. No dia 5, 250 mL de sobrenadante podem ser removidos e colocados em frascos de centrífuga e centrifugados a 1500 rpm (491 x g) por 10 minutos. Os *pellets* de TILs podem ser ressuspensos com 150 mL de meio fresco com soro AB humano 5%, 3000 UI por mL de IL-2, e adicionados de volta aos 10 frascos G-Rex originais. Quando TILs são expandidos serialmente em frascos G-Rex 100, no dia 7, os TILs em cada G-Rex 100 podem ser suspensos nos 300 mL de meio presentes em cada frasco, e a suspensão celular pode ser dividida em

3 alíquotas de 100 que podem ser usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Depois, 150 mL de AIM-V com soro AB humano 5% e 3000 UI por mL de IL-2 pode, ser adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37 ºC em CO_2 5% e, depois de 4 dias, 150 mL de AIM-V com 3000 UI por mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco G-Rex 100. As células podem ser coletadas em 11 dias de cultura. As células podem ser coletadas em 12 dias de cultura. As células podem ser coletadas em 13 dias de cultura. As células podem ser coletadas em 14 dias de cultura. Em algumas modalidades, as culturas são expandidas em um G-Rex 500.

[00550] Em uma modalidade, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) é realizada em frascos, sendo os TILs a granel misturados com 100 ou 200 vezes de excesso de células alimentadoras inativadas, anticorpo anti-CD3 OKT3 30 mg/mL e IL-2 3000 UI/mL em 150 mL de meio. Em algumas modalidades, a substituição do meio é efetuada até que as células sejam transferidas para uma câmara alternativa de crescimento. Em algumas modalidades, 2/3 do meio são substituídos por aspiração do meio esgotado e substituição com um volume equivalente de meio fresco. Em algumas modalidades, as câmaras alternativas de crescimento incluem frascos GREX e recipientes permeáveis a gases como discutidas mais completamente abaixo.

[00551] Em uma modalidade, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) é realizada e compreende ainda uma etapa em que os TILs são selecionados por reatividade superior com o tumor. Qualquer método de seleção conhecido na técnica pode ser utilizado. Por exemplo, os métodos descrito na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2016/0010058 A1, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência, podem ser utilizados para a seleção de TILs por reatividade superior com o tumor.

[00552] Opcionalmente, um ensaio de viabilidade celular pode ser realizado depois da segunda expansão (incluindo expansões referidas como a

expansão REP), por meio de ensaios padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, um ensaio de exclusão do azul de Trypan pode ser realizado em uma amostra dos TILs a granel, o qual marca seletivamente as células mortas e permite avaliar a viabilidade. Em algumas modalidades, amostras de TIL podem contadas e a viabilidade determinada usando um contador automático de células Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Em algumas modalidades, a viabilidade é determinada de acordo com o protocolo Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter.

[00553] Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) de TILs podem ser realizada usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gases como descrito anteriormente (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 gases. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando frascos. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando frascos G-Rex permeáveis a gases. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada em frascos T-175, e cerca de 1 x 10^6 TIL are suspensos em aproximadamente 150 mL de meio que são adicionados a cada T-175 frasco. Os TILs são cultivados com PBMC alogênicas irradiadas (50 Gy) como células “alimentadoras” na razão de 1 para 100 e as células foram cultivados em um mistura 1 para 1 de CM e meio AIM-V (meio 50/50), suplementado com 3000 UI/mL de IL-2 e 30 ng/mL de anti-CD3. Os frascos T-175 são incubados a 37 ºC em CO_2 5%. Em algumas modalidades, a metade do meio é trocada em 5 dias, usando o meio 50/50 com 3000 UI/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 soro AB humano 5% e 3000 UI/mL de IL-2 são adicionados aos 300 mL da suspensão de TILs. O número de células em cada bolsa pode ser contado a cada dia ou dois dias e meio fresco pode ser adicionado para manter a

contagem das células entre aproximadamente 0,5 e 2,0 x 10^6 células/mL. Em algumas modalidades, as culturas são expandidas em um G-Rex 500.

[00554] Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) são realizadas em frascos com capacidade de 500 mL e fundo de silicone permeável a gases de 100 cm^2 (G-Rex100, Wilson Wolf) (Figura 1), aproximadamente 5 x 10^6 ou 10 x 10^6 TILs são cultivados com PBMC alogênicas irradiadas na razão de 1 para 100 em 400 mL de meio 50/50, suplementado com 3000 UI/mL de IL-2 e 30 ng/mL de anti-CD3. Os frascos G-Rex100 são incubados a 37 ºC em CO_2 5%. Em algumas modalidades, no dia 5, 250 mL de sobrenadante são removidos e colocados em frascos de centrífuga e centrifugados a 1500 rpm (491 x g) por 10 minutos. Os *pellets* de TILs podem então ser ressuspensos com 150 mL de meio 50/50 fresco com 3000 UI/ mL de IL-2 e adicionados de volta aos frascos G-Rex100 originais. Em modalidades em que TILs são expandidos serialmente em frascos G-Rex100, no dia 7, os TILs em cada G-Rex100 são suspensos nos 300 mL de meio presentes em cada frasco, e a suspensão celular foi dividida em três alíquotas de 100 mL que são usadas para semear 3 frascos G-Rex100. Depois, 150 mL de AIM-V com soro AB humano 5% e 3000 UI/mL de IL-2 são adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex100 são incubados a 37 ºC em CO_2 5% e, depois de 4 dias, 150 mL de AIM-V com 3000 UI/mL de IL-2 são adicionados a cada frasco G-Rex100. As células são coletadas em 14 dias de cultura. Em algumas modalidades, as culturas são expandidas em um G-Rex 500.

[00555] Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão (p. ex., às vezes referido como CM2 ou o segundo meio de cultura celular) compreende IL-2, OKT-3, bem como as células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs), como discutido mais detalhadamente abaixo.

[00556] Em algumas modalidades, a segunda expansão, por exemplo, a

Etapa D de acordo com a Figura 7, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o único biorreator empregado é, por exemplo, um GREX-10 ou um GREX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

1. Células alimentadoras e células apresentadoras de antígeno

[00557] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descrita (por exemplo, incluindo expansão tal como aquelas descritas na etapa D da Figura 7, bem como aquelas referidas como REP) requerem um excesso de células alimentadoras durante a expansão REP de TILs e/ou durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de unidades padrão de sangue total de doadores sadios de sangue. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação por gradiente de Ficoll-Paque.

[00558] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, quer por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de REP, como descrito nos exemplos, especialmente no Exemplo 4, o qual fornece um protocolo exemplar para avaliar a incompetência na replicação de PBMCs alogênicas irradiadas.

[00559] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitas para uso nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis no dia 14 for inferior ao número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (ou seja, o dia de início da segunda expansão). Ver, por exemplo, os Exemplos 3 e/ou 4.

[00560] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitas para uso nos procedimentos de

expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14, não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (ou seja, o dia de início da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 30 ng/mL e IL-2 3000 UI/mL. Ver, por exemplo, os Exemplos 3 e/ou 4.

[00561] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitas para uso nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14, não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (ou seja, o dia de início da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 5-60 ng/mL e IL-2 1000-6000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 10-50 ng/mL e IL-2 2000-5000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 20-40 ng/mL e IL-2 2000-4000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 25-35 ng/mL e IL-2 2500-3500 UI/mL.

[00562] Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno são PBMCs. Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno são células alimentadoras apresentadoras de antígeno artificiais. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é aproximadamente 1 para 25, aproximadamente 1 para 50, aproximadamente 1 para 100, aproximadamente 1 para 125, aproximadamente 1 para 150, aproximadamente 1 para 175, aproximadamente 1 para 200, aproximadamente 1 para 225, aproximadamente 1 para 250,

aproximadamente 1 para 275, aproximadamente 1 para 300, aproximadamente 1 para 325, aproximadamente 1 para 350, aproximadamente 1 para 375, aproximadamente 1 para 400 ou aproximadamente 1 para 500. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é entre 1 para 50 e 1 para 300. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é entre 1 para 100 e 1 para 200.

[00563] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descritos requerem um excesso de células alimentadoras durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de unidades padrão de sangue total de doadores sadios de sangue. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação por gradiente de Ficoll-Paque. Em uma modalidade, são usadas células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC) no lugar de PBMCs.

[00564] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, quer por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos, incluindo os procedimentos exemplares descritos em, por exemplo, a Figura 7.

[00565] Em uma modalidade, células apresentadoras de antígeno artificiais são usadas na segunda expansão em substituição ou em combinação com PBMCs.

[00566] Os métodos de expansão aqui descritos geralmente usam meios de cultura com doses elevadas de um citocina, em particular IL-2, como é conhecido na técnica.

[00567] Alternativamente, o uso de combinações de citocinas para a expansão rápida e/ou a segunda expansão de TILs é também possível, com combinações de duas ou mais dentre IL-2, IL-15 e IL-21 como é em geral

delineado na Publicação Internacional Nº WO 2015/189356 e Publicação Internacional Nº WO 2015/189357, aqui expressamente incorporadas, em sua totalidade, por referência. Assim, as possíveis combinações incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, sendo que a última encontra utilidade especialmente em muitas modalidades. O uso de combinações de citocinas favorece especificamente a geração de linfócitos e, em particular, células T como descritas nas mesmas.

E. Etapa E: Coleta de TILs

[00568] Após a segunda etapa de expansão, as células podem ser coletadas. Em algumas modalidades, os TILs são coletados depois de uma, duas, três, quatro ou mais etapas de expansão, por exemplo, como disposto na Figura 7. Em algumas modalidades, os TILs são coletados depois de duas etapas de expansão, por exemplo, como disposto na Figura 7.

[00569] Os TILs podem ser coletados de qualquer maneira adequada e estéril, incluindo por exemplo, por centrifugação. Métodos para a coleta de TILs são bem conhecidos na técnica e qualquer um de tais métodos conhecidos pode ser empregado com o presente processo. Em algumas modalidades, os TILS são coletados usando um sistema automático.

[00570] Em algumas modalidades, a coleta, por exemplo, a Etapa E de acordo com a Figura 7, é realizada desde um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descrita. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o único biorreator empregado é, por exemplo, um GREX-10 ou um GREX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

F. Etapa F: Formulação final/Transferência para bolsa de infusão

[00571] Depois de completadas as Etapas A até E, como disposto em uma ordem exemplar na Figura 7 e como delineado detalhadamente acima e aqui, as células são transferidas para um recipiente para uso na administração

a um paciente. Em algumas modalidades, uma vez obtidos em número terapeuticamente suficiente pelos métodos de expansão descritos acima, os TILs são transferidos para um recipiente para uso na administração a um paciente.

[00572] Em uma modalidade, TILs expandidos por processos da presente invenção 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 por processos da presente invenção podem ser administrados por qualquer via adequada conhecida na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas em uma infusão intra-arterial ou intravenosa única e que, de preferência, dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[00573] Em uma modalidade, TILs expandidos por processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante. Em uma modalidade, TILs expandidos por processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante e um agente isotônico. Em uma modalidade, TILs expandidos por processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante, compreendendo dimetilsulfóxido, e um agente isotônico, compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio. Em uma modalidade, TILs expandidos por processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante, compreendendo dimetilsulfóxido e dextrano 40, e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio. Em uma modalidade, TILs expandidos por processos descritos acima podem ser administrados como composições entregues em bolsa de infusão estéril, tais como composições que compreendem ainda um crioconservante,

compreendendo dimetilsulfóxido e dextrano 40, e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio.

2. Composições farmacêuticas, doses e esquemas de administração

[00574] Em uma modalidade, TILs expandidos pelos métodos da presente invenção 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 por processos da presente invenção podem ser administrados por qualquer via adequada conhecida na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas em uma infusão intra-arterial ou intravenosa única e que, de preferência, duras aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[00575] Qualquer dose adequada de TILs pode ser administrada. Em algumas modalidades, um número terapeuticamente suficiente número de TILs é necessário para uma dose adequada. Em algumas modalidades, são administrados aproximadamente $2,3x10^{10}$ a $13,7x10^{10}$ TILs, em média, por volta de $7,8x10^{10}$ TILs, especialmente se o câncer é melanoma. Em uma modalidade, aproximadamente $1,2x10^{10}$ a $4,3x10^{10}$ de TILs são administrados. Em algumas modalidades, aproximadamente $3x10^{10}$ a aproximadamente $12x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, aproximadamente $4x10^{10}$ a aproximadamente $10x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, aproximadamente $5x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, aproximadamente $6x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, aproximadamente $7x10^{10}$ a aproximadamente $8x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $2,3x10^{10}$ a $13,7x10^{10}$. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $7,8x10^{10}$ TILs, especialmente se o câncer é melanoma. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é

aproximadamente $1,2x10^{10}$ a $4,3x10^{10}$ de TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $3x10^{10}$ a $12x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $4x10^{10}$ a $10x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $5x10^{10}$ a $8x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $6x10^{10}$ a $8x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $7x10^{10}$ a $8x10^{10}$ TILs.

[00576] Em algumas modalidades, o número dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é aproximadamente $1x10^6$, $2x10^6$, $3x10^6$, $4x10^6$, $5x10^6$, $6x10^6$, $7x10^6$, $8x10^6$, $9x10^6$, $1x10^7$, $2x10^7$, $3x10^7$, $4x10^7$, $5x10^7$, $6x10^7$, $7x10^7$, $8x10^7$, $9x10^7$, $1x10^8$, $2x10^8$, $3x10^8$, $4x10^8$, $5x10^8$, $6x10^8$, $7x10^8$, $8x10^8$, $9x10^8$, $1x10^9$, $2x10^9$, $3x10^9$, $4x10^9$, $5x10^9$, $6x10^9$, $7x10^9$, $8x10^9$, $9x10^9$, $1x10^{10}$, $2x10^{10}$, $3x10^{10}$, $4x10^{10}$, $5x10^{10}$, $6x10^{10}$, $7x10^{10}$, $8x10^{10}$, $9x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, $2x10^{13}$, $3x10^{13}$, $4x10^{13}$, $5x10^{13}$, $6x10^{13}$, $7x10^{13}$, $8x10^{13}$ e $9x10^{13}$. Em uma modalidade, o número dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está no intervalo de $1x10^6$ a $5x10^6$, $5x10^6$ a $1x10^7$, $1x10^7$ a $5x10^7$, $5x10^7$ a $1x10^8$, $1x10^8$ a $5x10^8$, $5x10^8$ a $1x10^9$, $1x10^9$ a $5x10^9$, $5x10^9$ a $1x10^{10}$, $1x10^{10}$ a $5x10^{10}$, $5x10^{10}$ a $1x10^{11}$, $5x10^{11}$ a $1x10^{12}$, $1x10^{12}$ a $5x10^{12}$ e $5x10^{12}$ a $1x10^{13}$. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $1x10^6$, $2x10^6$, $3x10^6$, $4x10^6$, $5x10^6$, $6x10^6$, $7x10^6$, $8x10^6$, $9x10^6$, $1x10^7$, $2x10^7$, $3x10^7$, $4x10^7$, $5x10^7$, $6x10^7$, $7x10^7$, $8x10^7$, $9x10^7$, $1x10^8$, $2x10^8$, $3x10^8$, $4x10^8$, $5x10^8$, $6x10^8$, $7x10^8$, $8x10^8$, $9x10^8$, $1x10^9$, $2x10^9$, $3x10^9$, $4x10^9$, $5x10^9$, $6x10^9$, $7x10^9$, $8x10^9$, $9x10^9$, $1x10^{10}$, $2x10^{10}$, $3x10^{10}$, $4x10^{10}$, $5x10^{10}$, $6x10^{10}$, $7x10^{10}$, $8x10^{10}$, $9x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, $2x10^{13}$, $3x10^{13}$, $4x10^{13}$, $5x10^{13}$, $6x10^{13}$, $7x10^{13}$, $8x10^{13}$ e $9x10^{13}$.

[00577] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é inferior a, 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.

[00578] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é superior a 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 125%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% p/p, p/v, ou v/v da composição farmacêutica.

[00579] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está no intervalo entre aproximadamente 0,0001% e 50%, aproximadamente 0,001% e 40%, aproximadamente 0,01% e 30%, aproximadamente 0,02% e 29%, aproximadamente 0,03% e 28%, aproximadamente 0,04% e 27%,

aproximadamente 0,05% e 26%, aproximadamente 0,06% e 25%, aproximadamente 0,07% e 24%, aproximadamente 0,08% e 23%, aproximadamente 0,09% e 22%, aproximadamente 0,1% e 21%, aproximadamente 0,2% e 20%, aproximadamente 0,3% e 19%, aproximadamente 0,4% e 18%, aproximadamente 0,5% e 17%, aproximadamente 0,6% e 16%, aproximadamente 0,7% e 15%, aproximadamente 0,8% e 14%, aproximadamente 0,9% e 12% ou aproximadamente 1% e 10% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00580] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está no intervalo entre aproximadamente 0,001% e 10%, aproximadamente 0,01% e 5%, aproximadamente 0,02% e 4,5%, aproximadamente 0,03% e 4%, aproximadamente 0,04% e 3,5%, aproximadamente 0,05% e 3%, aproximadamente 0,06% e 2,5%, aproximadamente 0,07% e 2%, aproximadamente 0,08% e 1,5%, aproximadamente 0,09% e 1%, aproximadamente 0,1% e 0,9% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00581] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é igual ou inferior a 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g ou 0,0001 g.

[00582] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é superior a 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g,

0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04 g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5, 3 g, 3,5, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g ou 10 g.

[00583] Os TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção são eficazes em uma ampla faixa de dose. A dose exata dependerá da via de administração, a forma na qual o composto é administrado, o sexo e a idade do indivíduo a ser tratado, o peso corporal do indivíduo a ser tratado e a preferência e experiência do médico atendente. As doses clinicamente estabelecidas dos TILs podem também ser usadas, se apropriadas. As quantidades das composições farmacêuticas administradas pelos métodos presentes, tais como as doses de TILs, dependerão do humano ou mamífero em tratamento, da gravidade do transtorno ou condição, da taxa de administração, da disposição dos ingredientes farmacêuticos ativos e ao critério do médico prescritor.

[00584] Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser por injeção, p. ex., injeção intravenosa. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em doses múltiplas. A administração pode ser uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais de seis vezes ao ano. A administração pode ser uma vez ao mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana ou uma vez de dois em dois dias. A administração de TILs pode continuar enquanto necessário.

[00585] Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs é aproximadamente $1x10^6$, $2x10^6$, $3x10^6$, $4x10^6$, $5x10^6$, $6x10^6$, $7x10^6$, $8x10^6$, $9x10^6$, $1x10^7$, $2x10^7$, $3x10^7$, $4x10^7$, $5x10^7$, $6x10^7$, $7x10^7$, $8x10^7$, $9x10^7$, $1x10^8$, $2x10^8$, $3x10^8$, $4x10^8$, $5x10^8$, $6x10^8$, $7x10^8$, $8x10^8$, $9x10^8$, $1x10^9$, $2x10^9$, $3x10^9$,

$4x10^9$, $5x10^9$, $6x10^9$, $7x10^9$, $8x10^9$, $9x10^9$, $1x10^{10}$, $2x10^{10}$, $3x10^{10}$, $4x10^{10}$, $5x10^{10}$, $6x10^{10}$, $7x10^{10}$, $8x10^{10}$, $9x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, $2x10^{13}$, $3x10^{13}$, $4x10^{13}$, $5x10^{13}$, $6x10^{13}$, $7x10^{13}$, $8x10^{13}$ e $9x10^{13}$. Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs está no intervalo de $1x10^6$ a $5x10^6$, $5x10^6$ a $1x10^7$, $1x10^7$ a $5x10^7$, $5x10^7$ a $1x10^8$, $1x10^8$ a $5x10^8$, $5x10^8$ a $1x10^9$, $1x10^9$ a $5x10^9$, $5x10^9$ a $1x10^{10}$, $1x10^{10}$ a $5x10^{10}$, $5x10^{10}$ a $1x10^{11}$, $5x10^{11}$ a $1x10^{12}$, $1x10^{12}$ a $5x10^{12}$ e $5x10^{12}$ a $1x10^{13}$.

[00586] Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs está no intervalo entre aproximadamente 0,01 mg/kg e 4,3 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg e 3,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg e 3,2 mg/kg, aproximadamente 0,35 mg/kg e 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg e 2,85 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg e 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg e 1,7 mg/kg, aproximadamente 0,15 mg/kg e 1,3 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg e 1,15 mg/kg, aproximadamente 0,45 mg/kg e 1 mg/kg, aproximadamente 0,55 mg/kg e 0,85 mg/kg, aproximadamente 0,65 mg/kg e 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg e 0,75 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg e 2,15 mg/kg, aproximadamente 0,85 mg/kg e 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg e 1,85 mg/kg, aproximadamente 1,15 mg/kg e 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg mg e 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,35 mg/kg e 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,15 mg/kg e 3,6 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg e 3,4 mg/kg, aproximadamente 2,4 mg/kg e 3,3 mg/kg, aproximadamente 2,6 mg/kg e 3,15 mg/kg, aproximadamente 2,7 mg/kg e 3 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg e 3 mg/kg ou aproximadamente 2,85 mg/kg e 2,95 mg/kg.

[00587] Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs está no intervalo entre aproximadamente 1 mg e 500 mg, aproximadamente 10 mg e 300 mg, aproximadamente 20 mg e 250 mg, aproximadamente 25 mg e 200 mg, aproximadamente 1 mg e 50 mg, aproximadamente 5 mg e 45 mg,

aproximadamente 10 mg e 40 mg, aproximadamente 15 mg e 35 mg, aproximadamente 20 mg e 30 mg, aproximadamente 23 mg e 28 mg, aproximadamente 50 mg e 150 mg, aproximadamente 60 mg e 140 mg, aproximadamente 70 mg e 130 mg, aproximadamente 80 mg e 120 mg, aproximadamente 90 mg e 110 mg ou aproximadamente 95 mg e 105 mg, aproximadamente 98 mg e 102 mg, aproximadamente 150 mg e 250 mg, aproximadamente 160 mg e 240 mg, aproximadamente 170 mg e 230 mg, aproximadamente 180 mg e 220 mg, aproximadamente 190 mg e 210 mg, aproximadamente 195 mg e 205 mg ou aproximadamente 198 e 207 mg.

[00588] Uma quantidade eficaz dos TILs pode ser administrada em dose única ou em múltiplas por qualquer um dos modos aceitos para administração de agentes de utilidades semelhantes, incluindo via intranasal e transdérmica, por injeção intra-arterial, via intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutânea, tópica, por transplante ou por inalação.

IV. Processos de produção de TILs - Gen 3

[00589] Em algumas modalidades, a invenção provê uma população de TILs produzidos pelo método qualquer um dos processos GEN 3, modificado para usar uma pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina. Em algumas modalidades, a invenção provê o método qualquer um dos processos GEN 3, modificado para usar uma pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina como a fonte de células T para expansão na primeira expansão de preparação de qualquer um de tais processos GEN 3, em que (1) a duração da primeira expansão de preparação é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão rápida de tal processo GEN 3 ou (2) a duração da segunda expansão rápida de tal processo GEN 3 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão rápida ou (3) a duração da primeira expansão de preparação é prolongada e a duração da segunda

expansão rápida de tal processo GEN 3 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão rápida.

[00590] Em algumas modalidades, a invenção provê uma população de TILs produzidos pelo método qualquer um dos processos GEN 3, modificado para usar uma pequena biópsia, biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina como a fonte de células T para expansão na primeira expansão de preparação de qualquer um de tais processos GEN 3, em que (1) a duração da primeira expansão de preparação é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão rápida de tal processo GEN 3 ou (2) a duração da segunda expansão rápida de tal processo GEN 3 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão rápida ou (3) a duração da primeira expansão de preparação é prolongada e a duração da segunda expansão rápida de tal processo GEN 3 é prolongada para alcançar a contagem celular desejada de TILs na população de TILs coletados após a segunda expansão rápida.

[00591] Sem estar limitado a qualquer teoria em particular, acredita-se que a primeira expansão de preparação, que prepara uma ativação de células T, obtidas de um fragmento de tumor ou fragmento obtido de um doador, seguida pela segunda expansão rápida que reforça a ativação de células T, como descrito em alguns métodos da invenção, permite a preparação de células T expandidas que retêm um fenótipo “mais jovem”, e assim, prevê-se que as células T expandidas da invenção exibirão maior citotoxicidade contra células do câncer do que células T expandidas por outros métodos. Especificamente, acredita-se que uma ativação de células T que é preparada pela exposição a um anticorpo anti-CD3 (p. ex., OKT-3), IL-2 e, opcionalmente, células apresentadoras de antígeno (APCs) e então reforçada pela exposição subsequente a um anticorpo anti-CD-3 (p. ex., OKT-3), IL-2 e

APCs adicionais, como ensinado pelos métodos da invenção, limita ou evita a maturação de células T em cultura, produzindo uma população de células T com um fenótipo menos madurado, sendo que essas células T são menos exauridas pela expansão em cultura e exibem maior citotoxicidade contra células do câncer. Assim, em algumas modalidades, a invenção provê um método para expansão de TILs compreendendo: (a) realizar uma primeira expansão de preparação de uma primeira população de células T, obtidas de um fragmento de tumor ou fragmento obtido de um doador, cultivando a primeira população de células T para efetuar o crescimento e preparar uma ativação da primeira população de células T; (b) depois que a ativação da primeira população de células T preparada na etapa (a) começar a decair, realizar uma segunda expansão rápida da primeira população de células T cultivando a primeira população de células T para efetuar o crescimento e reforçar a ativação da primeira população de células T a fim de obter uma segunda população de células T; e (c) coletar a segunda população de T células. O processo Gen 3, os métodos de tratamento usando TILs do processo Gen 3 e as composições de TILs preparadas pelo Gen 3 podem ser utilizados em conjunção com pequena biópsia/biópsia por agulha grossa com durações de períodos de expansão ajustadas conforme necessário para alcançar as contagens necessárias de células, como disposto abaixo e por todo o presente pedido de patente.

[00592] Em algumas modalidades, a etapa de segunda expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento vertical da cultura: (a) realizando uma segunda expansão rápida em que células T são cultivadas em uma cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência das células T na cultura em pequena escala para um segundo recipiente maior do que o primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 500MCS, e cultivando as

células T da cultura em pequena escala em uma cultura em escala maior no segundo recipiente por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal (*scale out*): (a) realizando a segunda expansão rápida em que células T são cultivadas em uma primeira cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência e repartindo as células T da primeira cultura em pequena escala para e entre pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 segundos recipientes, cujo tamanho é igual ao do primeiro recipiente, em que, em cada segundo recipiente, a parte das células T da primeira cultura em pequena escala transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma segunda cultura em pequena escala por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal e vertical da cultura: (a) realizando a segunda expansão rápida, em que células T são cultivadas em uma cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência e repartindo as células T da cultura em pequena escala para e entre pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 segundos recipientes, cujo tamanho é maior do que o do primeiro recipiente, p. ex., recipientes G-REX 500MCS, em que, em cada segundo recipiente, a parte das células T da cultura em pequena escala transferida de tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura em escala maior por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal e vertical da cultura: (a) realizando a segunda expansão rápida, em que células T são cultivadas em

uma cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência e repartindo as células T da cultura em pequena escala para e entre 2, 3 ou 4 segundos recipientes, cujo tamanho é maior do que o do primeiro recipiente, p. ex., recipientes G-REX 500MCS, em que, em cada segundo recipiente, a parte das células T da cultura em pequena escala transferida de tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura em escala maior por um período de aproximadamente 5 dias.

[00593] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada depois que a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de preparação começa a diminuir, reduzir, decair ou baixar.

[00594] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada depois que a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de preparação tiver diminuído em ou próximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100%.

[00595] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada depois que a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de preparação tiver diminuído por uma percentagem no intervalo entre ou próximo de 1% e 100%.

[00596] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada depois que a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de preparação tiver diminuída por uma percentagem no intervalo entre ou próximo de 1% e 10%, 10% e 20%, 20% e 30%, 30% e 40%, 40% e 50%, 50% e 60%, 60% e 70%, 70% e 80%, 80% e 90% ou 90% e 100%.

[00597] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é

realizada depois que a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de preparação tiver diminuído em pelo menos ou próximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%.

[00598] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada depois que a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de preparação tiver diminuído em até ou próximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100%.

[00599] Em algumas modalidades, a diminuição na ativação de células T efetuada pela primeira expansão de preparação é determinada por uma redução na quantidade de interferon gama liberada pelas células T em resposta à estimulação com antígeno.

[00600] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de células T é realizada durante um período de até ou próximo de 7 dias.

[00601] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de células T é realizada durante um período de até ou próximo de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, ou 7 dias.

[00602] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de células T é realizada durante um período de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

[00603] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de até ou próximo de 11 dias.

[00604] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de até ou próximo de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias ou 11 dias.

[00605] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias ou 11 dias.

[00606] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de células T é realizada durante um período entre aproximadamente 1 dia e 7 dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de entre aproximadamente 1 dia e 11 dias.

[00607] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de células T é realizada durante um período de até ou próximo de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, ou 7 dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de até ou próximo de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias ou 11 dias.

[00608] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de células T é realizada durante um período de entre aproximadamente 1 dia e 7 dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período entre aproximadamente 1 dia e 9 dias.

[00609] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de células T é realizada durante um período de 7 dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de 9 dias.

[00610] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

[00611] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos infiltrantes da medula (MILs).

[00612] Em algumas modalidades, as células T são obtidas de um doador que sofre de um câncer.

[00613] Em algumas modalidades, as células T são TILs obtidos de

uma biópsia por agulha grossa ou aspirado por agulha fina obtido de um tumor em um paciente que sofre de um câncer.

[00614] Em algumas modalidades, as células T são MILs obtidos da medula óssea de um paciente que sofre de uma malignidade hematológica.

[00615] Em algumas modalidades, o doador está sofrendo de um câncer. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre o grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo papilomavírus humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre o grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo papilomavírus humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal, e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o doador está sofrendo de um tumor. Em algumas modalidades, o tumor é um tumor líquido. Em algumas modalidades, o tumor é um tumor sólido. Em algumas modalidades, o doador está sofrendo de uma malignidade hematológica.

[00616] Um processo TIL exemplar, conhecido como processo 3 (também aqui referido como GEN3), contendo algumas dessas características é representado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), e algumas das vantagens dessa modalidade da presente invenção em relação ao processo 2A são descritas nas Figuras 1, 2, 30 e 31 (em particular, p. ex., Figura 85B). Duas modalidades do processo 3 são mostradas nas Figuras 1 e 30 (em particular, p. ex., Figura 85B). O Processo 2A ou Gen 2 é descrito também na

Publicação da Patente U.S. Nº 2018/0280436, aqui incorporada, em sua totalidade, por referência. O processo Gen 3 é descrito também em USSN 62/755 954, depositado em 05 de novembro de 2018 (116983-5045-PR).

[00617] Como discutido e delineado em termos gerais no presente, TILs são retirados da amostra de um paciente e manipulados para expandir o seu número antes do transplante em um paciente, usando o processo de expansão de TIL aqui descrito e referido como Gen 3. Em algumas modalidades, os TILs podem ser opcionalmente manipulados geneticamente como discutido abaixo. Em algumas modalidades, os TILs podem ser crioconservados antes ou depois da expansão. Uma vez descongelados, podem também ser reestimulados para aumentar o seu metabolismo antes da infusão em um paciente.

[00618] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação (incluindo processos aqui referidos como a pré-Expansão Rápida (Pré-REP), bem como processos mostrados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) como Etapa B) é encurtada para 1 a 7 dias e a segunda expansão rápida (incluindo processos aqui referidos como Protocolo de Expansão Rápida (REP) bem como processos mostrados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) como Etapa D) é encurtada para 1 a 9 dias, como discutido detalhadamente abaixo, bem como nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação (por exemplo, uma expansão descrita como Etapa B na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) é encurtada para 7 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão como descrita na etapa D na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) é de 7 a 9 dias. Em algumas modalidades, a combinação da primeira expansão de preparação com a segunda expansão rápida (por exemplo, expansões descritas como Etapa B e Etapa D na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) é de 14-16 dias, como discutido detalhadamente abaixo e nos exemplos e figuras. Especificamente, considera-se que, certas

modalidades da presente invenção compreendem uma etapa de primeira expansão de preparação na qual TILs são ativados por exposição a um anticorpo anti-CD3, p. ex., OKT-3, na presença de IL-2 ou exposição a um antígeno na presença de pelo menos IL-2 e um anticorpo anti-CD3, p. ex., OKT-3. Em certas modalidades, os TILs que são ativados na etapa de primeira expansão de preparação, como descrita acima, são uma primeira população de TILs, ou seja, uma população de células primárias.

[00619] As Designações de "Etapa" A, B, C *etc.*, abaixo são em referência ao exemplo não limitante na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) e em referência a certas modalidades não limitantes aqui descrita. A ordenação das Etapas abaixo e na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) é exemplar e qualquer combinação ou ordem de etapas, bem como etapas adicionais, repetição de etapas e/ou omissão de etapas é contemplada pelo presente pedido de patente e os métodos ora descritos.

[00620] Em algumas modalidades, se o tumor for metastático e a lesão primária tiver sido tratada/removida com eficiência no passado, a remoção de uma das lesões metastáticas pode ser necessária. Em algumas modalidades, a abordagem menos invasiva é remover uma lesão de pele ou um linfonodo no pescoço ou na área axilar quando disponível. Em algumas modalidades, uma lesão cutânea é removida ou uma pequena biópsia da mesma é removida. Em algumas modalidades, um linfonodo ou pequena biópsia do mesmo é removido. Em algumas modalidades, pode ser empregada uma lesão metastática pulmonar ou hepática ou um linfonodo intra-abdominal ou torácico ou pequena biópsia do mesmo.

[00621] Em algumas modalidades, o tumor é um melanoma. Em algumas modalidades, a pequena biópsia de um melanoma compreende um nevo ou parte do mesmo.

[00622] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com

uma lâmina circular pressionada na pele. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele em volta de um nevo suspeito. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele, e um pedaço redondo da pele é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção e uma parte redonda do tumor é removida.

[00623] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e o nevo inteiro ou crescimento é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e o nevo inteiro ou crescimento é removido juntamente com uma borda pequena de tecido de aspecto normal.

[00624] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e somente a parte mais irregular de um nevo ou crescimento é retirada. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e a biópsia incisional é usada quando outras técnicas não podem ser completadas, tal como se um nevo suspeito for muito grande.

[00625] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de pulmão. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por broncoscopia. Em geral, na broncoscopia, o paciente é colocado sob anestesia, e uma pequena [sic] passa através do nariz ou boca, desce a garganta e entra nas passagens brônquicas, onde ferramentas pequenas são usadas para remover algum tecido. Em algumas modalidades, quando o tumor ou crescimento não pode ser atingido por broncoscopia, pode ser empregada uma biópsia transtorácica por agulha. Em geral, para uma biópsia transtorácica por agulha, o paciente está também sob anestesia e uma agulha é inserida através da pele diretamente para o local suspeito para remover uma pequena amostra de tecido. Em algumas modalidades, a biópsia transtorácica por agulha pode

requerer radiologia intervencionista (por exemplo, o uso de radiografias ou exame por TC para orientar a agulha). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por biópsia com agulha. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por ultrassonografia endoscópica (por exemplo, um endoscópio com uma luz é colocado através da boca no esôfago). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida cirurgicamente.

[00626] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia na cabeça e pescoço. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional, em que um pedaço pequeno de tecido é cortado de uma área que parece anormal. Em algumas modalidades, se a região anormal tiver acesso fácil, a amostra pode ser coletada sem hospitalização. Em algumas modalidades, se o tumor for mais profundo dentro da boca ou garganta, a biópsia pode precisar ser realizada em uma sala cirúrgica, com anestesia geral. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional, em que a área inteira é removida. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é de aspiração por agulha fina (FNA). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é de aspiração por agulha fina (FNA), em que uma agulha muito fina fixada a uma seringa é usada para extrair (aspirar) células de um tumor ou nódulo. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção, em que fórceps de punção são usados para remover um pedaço da área suspeita.

[00627] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia cervical. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida através de colposcopia. Em geral, os métodos de colposcopia empregam o uso de um instrumento de ampliação com luz, preso a binóculos de ampliação (um colposcópio) que é então usado para biópsia de uma seção pequena da

superfície do colo do útero. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de conização/em cone. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de conização/em cone, em que uma cirurgia de ambulatório pode ser necessária para remover um pedaço maior de tecido do colo do útero. Em algumas modalidades, a biópsia em cone, além de ajudar a confirmar um diagnóstico, pode servir como um tratamento inicial.

[00628] O termo “tumor sólido” refere-se a uma massa anormal de tecido que normalmente não contém cistos ou áreas de líquido. Tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo câncer de “tumor sólido” refere-se a tumores sólidos malignos, neoplásicos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, entre outros, sarcomas, carcinomas, e linfomas, tais como cânceres do pulmão, mama, câncer de mama triplo negativo, próstata, cólon, reto e bexiga. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de não pequenas células. A estrutura tecidual dos tumores sólidos inclui compartimentos teciduais interdependentes incluindo o parênquima (células do câncer) e as células estromais de sustentação nas quais as células cancerígenas estão dispersas e que podem fornecer um microambiente de sustentação.

[00629] Em algumas modalidades, a amostra do tumor é obtida como um aspirado por agulha fina (FNA), uma biópsia por agulha grossa, ou a pequena biópsia (incluindo, por exemplo, a biópsia por punção). Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 10. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 10 onde estão 1 ou 2 amostras de biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 100 onde estão 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais amostras de biópsia por agulha grossa e/ou de pequena biópsia. Em algumas modalidades, a amostra é colocada

primeiramente em G-Rex 500 onde estão 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais amostras de biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia.

[00630] O FNA pode ser obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma. Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor de pulmão, tal como um tumor de pulmão de um paciente com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Em alguns casos, o paciente com CPNPC submeteu-se anteriormente a um tratamento cirúrgico.

[00631] TILs aqui descritos podem ser obtidos de uma amostra de FNA. Em alguns casos, a amostra de FNA é obtida ou isolada do paciente usando uma agulha de calibre fino variando de uma agulha de calibre 18 a uma agulha de calibre 25. A agulha de calibre fino pode ser de calibre 18, calibre 19, calibre 20, calibre 21, calibre 22, calibre 23, calibre 24 ou calibre 25. Em algumas modalidades, a amostra de FNA do paciente pode conter pelo menos 400.000 TILs, p. ex., 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs ou mais.

[00632] Em alguns casos, os TILs aqui descritos são obtidos de uma amostra de biópsia por agulha grossa. Em alguns casos, a amostra de pequena biópsia ou biópsia por agulha grossa é obtida ou isolada do paciente por uma agulha cirúrgica ou clínica variando de uma agulha de calibre 11 a uma agulha de calibre 16. A agulha pode ser de calibre 11, calibre 12, calibre 13, calibre 14, calibre 15 ou calibre 16. Em algumas modalidades, a amostra de biópsia por agulha grossa do paciente pode conter pelo menos 400.000 TILs, p. ex., 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs ou mais.

[00633] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos de material

digerido do tumor. Em algumas modalidades, o material digerido do tumor foi gerado por incubação em meio com enzimas, por exemplo, entre outros, RPMI 1640, GlutaMAX 2 mM, gentamicina 10 µg/mL, DNase 30 U/mL e colagenase 1,0 mg/mL, seguida por dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de ter sido colocado em meio com enzimas, o tumor pode ser dissociado mecanicamente por aproximadamente 1 minuto. A solução pode então ser incubada por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5% e, a seguir, rompida mecanicamente mais uma vez por aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado novamente por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5%, o tumor pode ser rompido mecanicamente uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, depois da terceira ruptura mecânica, se pedaços grandes de tecido estivessem presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais eram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 C em CO_2 5%. Em algumas modalidades, no fim da incubação final se a suspensão celular contivesse um número grande de eritrócitos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade, usando Ficoll, podia ser realizada para remover essas células.

[00634] Em algumas modalidades, a suspensão celular coletada antes da etapa de primeira expansão é chamada de “população de células primárias” ou uma população celular “recentemente coletada”.

[00635] Em algumas modalidades, as células podem ser opcionalmente congeladas, após coleta na amostra, e congeladas antes de admitidas na expansão descrita na etapa B, a qual é descrita mais detalhadamente abaixo, bem como exemplificada na Figura 85.

A. Etapa A: Obter uma amostra de tumor do paciente

[00636] Em geral, TILs são inicialmente obtidos de uma amostra de tumor do paciente (“TILs primários”), obtida por uma biópsia por agulha grossa ou procedimento semelhante, e são então expandidos em uma população maior para manipulação adicional como aqui descrita,

opcionalmente crioconservados, e opcionalmente avaliados quanto ao fenótipo e parâmetros metabólicos.

[00637] Uma amostra de tumor do paciente pode ser obtida por métodos conhecidos na técnica, em geral via ressecção cirúrgica, biópsia por agulha grossa, biópsia por agulha ou outros meios para obter uma amostra que contém uma mistura de células tumorais e TILs. Em geral, a amostra do tumor pode ser de qualquer tumor sólido, incluindo tumores primários, tumores invasivos ou tumores metastáticos. Em algumas modalidades, a amostra pode ser de múltiplas pequenas amostras do tumor ou biópsias. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender múltiplas amostras do tumor (tais como múltiplos fragmentos) de um único tumor do mesmo paciente. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender múltiplas amostras do tumor de um, dois, três ou quatro tumores do mesmo paciente (tais como biópsias por agulha grossa obtidas de múltiplas lesões na doença metastática). Em algumas modalidades, a amostra pode compreender múltiplas amostras do tumor de múltiplos tumores do mesmo paciente. A amostra do tumor pode também ser de um tumor líquido, tal como um tumor resultante de uma malignidade hematológica. O tumor sólido pode ser de qualquer tipo de câncer, incluindo, entre outros, de mama, pancreático, próstata, colorretal, pulmão, cerebral, renal, de estômago e pele (incluindo, entre outros, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular e melanoma). Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço (incluindo, por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), glioblastoma (GBM), câncer gastrointestinal, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de não pequenas células. Em algumas modalidades, TILs úteis são obtidos de tumores de melanoma maligno, pois estes, segundo relatos, apresentam níveis particularmente elevados de TILs.

[00638] Como indicado acima, em algumas modalidades, os TILs são derivados de tumor sólido cores ou fragmentos. Em algumas modalidades, os as amostras ou fragmentos do tumor sólido são submetidos à digestão enzimática. Em algumas modalidades, as amostras ou fragmentos do tumor são digeridos em uma mistura de enzimas compreendendo colagenase, DNase e hialuronidase. Em algumas modalidades, as amostras ou fragmentos do tumor são digeridos em uma mistura de enzimas compreendendo colagenase, DNase e hialuronidase por 1-2 horas. Em algumas modalidades, os tumores são digeridos em uma mistura de enzimas compreendendo colagenase, DNase e hialuronidase por 1-2 horas a 37 ºC, CO_2 5%. Em algumas modalidades, as amostras ou fragmentos do tumor são digeridos em uma mistura de enzimas compreendendo colagenase, DNase e hialuronidase por 1-2 horas a 37 ºC, CO_2 5% com rotação. Em algumas modalidades, as amostras ou fragmentos do tumor são digeridos durante a noite com rotação constante. Em algumas modalidades, as amostras ou fragmentos do tumor são digeridos durante a noite a 37 ºC, CO_2 5% com rotação constante. Em algumas modalidades, as amostras ou fragmentos do tumor são combinados com as enzimas para formar uma mistura de reação digerida do tumor.

[00639] Em algumas modalidades, os TILs não são obtidos de material digerido do tumor. Em algumas modalidades, as amostras do tumor sólido não são fragmentadas.

[00640] Em algumas modalidades, as amostras ou fragmentos do tumor são reconstituídos com enzimas liofilizadas em um tampão estéril. Em algumas modalidades, o tampão é HBSS estéril.

[00641] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende colagenase. Em algumas modalidades, a colagenase é colagenase IV. Em algumas modalidades, o estoque de trabalho para a colagenase é 10X um estoque de trabalho a 100 mg/mL.

[00642] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende

DNAse. Em algumas modalidades, o estoque de trabalho para a DNAse é 10X um estoque de trabalho a 10.000 UI/mL.

[00643] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende hialuronidase. Em algumas modalidades, o estoque de trabalho para a hialuronidase é 10X um estoque de trabalho a 10 mg/mL.

[00644] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende colagenase 10 mg/mL, DNAse 1000 UI/mL e hialuronidase 1 mg/mL hialuronidase.

[00645] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende colagenase 10 mg/mL, DNAse 500 UI/mL e hialuronidase 1 mg/mL.

[00646] Em geral, a suspensão celular obtida da amostra ou fragmento do tumor é chamada de "população de células primárias" ou uma população celular "recentemente obtida" ou "recentemente isolada". Em certas modalidades, a população celular recentemente obtida de TILs é exposta a um meio de cultura celular compreendendo células apresentadoras de antígeno, IL-12 e OKT-3.

[00647] Em algumas modalidades, TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de material digerido enzimaticamente de amostra ou fragmento do tumor e amostras ou fragmentos do tumor obtidos de pacientes. Em uma modalidade, TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de material digerido enzimaticamente de amostra ou fragmento do tumor e amostras ou fragmentos do tumor obtidos de pacientes.

[00648] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos de material digerido do fragmento ou amostra do tumor. Em algumas modalidades, o material digerido do fragmento ou amostra do tumor é gerado por incubação em meio com enzimas, por exemplo, entre outros, RPMI 1640, GlutaMAX 2 mM, gentamicina 10 mg/mL, DNase 30 U/mL e colagenase 1,0 mg/mL, seguida por dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de colocado em meio com enzimas, o fragmento ou amostra do

tumor pode ser dissociado mecanicamente por aproximadamente 1 minuto. A solução pode então ser incubada por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5% e, a seguir, rompida mecanicamente mais uma vez por aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado novamente por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5%, o fragmento ou amostra do tumor pode ser rompido mecanicamente uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, depois da terceira ruptura mecânica, se pedaços grandes de tecido estivessem presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais eram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 ºC em CO_2 5%. Em algumas modalidades, no fim da incubação final se a suspensão celular contivesse um número grande de eritrócitos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade, usando Ficoll, podia ser realizada para remover essas células.

[00649] Em algumas modalidades, se o tumor for metastático e a lesão primária tiver sido tratada/removida com eficiência no passado, a remoção de uma das lesões metastáticas pode ser necessária. Em algumas modalidades, a abordagem menos invasiva é remover uma lesão cutânea, ou um linfonodo no pescoço ou área axilar quando disponível. Em algumas modalidades, uma lesão cutânea ou uma pequena biópsia da mesma é removida. Em algumas modalidades, um linfonodo ou pequena biópsia do mesmo é removido. Em algumas modalidades, uma lesão pulmonar ou hepática metastática, ou um linfonodo intra-abdominal ou torácico ou pequena biópsia dos mesmos pode ser empregado.

[00650] Em algumas modalidades, o tumor é um melanoma. Em algumas modalidades, a pequena biópsia for a melanoma compreende um nevo ou parte do mesmo.

[00651] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele. Em algumas modalidades, a biópsia

por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele em volta de um nevo suspeito. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele, e um pedaço redondo da pele é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção e parte redonda do tumor é removida.

[00652] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e o nevo inteiro ou crescimento é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e o nevo inteiro ou crescimento é removido juntamente com uma margem pequena de pele com aspecto normal.

[00653] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e somente a parte mais irregular de um nevo ou crescimento é retirada. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e a biópsia incisional é usada quando outras técnicas não podem ser completadas, tal como se um nevo suspeito é muito grande.

[00654] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de pulmão. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por broncoscopia. Em geral, na broncoscopia, o paciente é colocado sob anestesia, e uma pequena [sic] passa através do nariz ou boca, desce a garganta e entra nas passagens brônquicas, onde ferramentas pequenas são usadas para remover algum tecido. Em algumas modalidades, quando o tumor ou crescimento não pode ser atingido por broncoscopia, pode ser empregada uma biópsia transtorácica por agulha. Em geral, para uma biópsia transtorácica por agulha, o paciente está também sob anestesia e uma agulha é inserida através da pele diretamente para o local suspeito para remover uma pequena amostra de tecido. Em algumas modalidades, a biópsia transtorácica por agulha pode requerer radiologia intervencionista (por exemplo, o uso de radiografias ou

exame por TC para orientar a agulha). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por biópsia com agulha. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por ultrassonografia endoscópica (por exemplo, um endoscópio com uma luz é colocado através da boca no esôfago). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida cirurgicamente.

[00655] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia na cabeça e pescoço. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional, em que um pedaço pequeno de tecido é cortado de uma área que parece anormal. Em algumas modalidades, se a região anormal tiver acesso fácil, a amostra pode ser coletada sem hospitalização. Em algumas modalidades, se o tumor for mais profundo dentro da boca ou garganta, a biópsia pode precisar ser realizada em uma sala cirúrgica, com anestesia geral. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional, em que a área inteira é removida. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é de aspiração por agulha fina (FNA). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é de aspiração por agulha fina (FNA), em que uma agulha muito fina fixada a uma seringa é usada para extrair (aspirar) células de um tumor ou nódulo. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção, em que fórceps de punção são usados para remover um pedaço da área suspeita.

[00656] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia cervical. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida através de colposcopia. Em geral, os métodos de colposcopia empregam o uso de um instrumento de ampliação com luz, preso a binóculos de ampliação (um colposcópio) que é então usado para biópsia de uma seção pequena da superfície do colo do útero. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é

uma biópsia de conização/em cone. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de conização/em cone, em que uma cirurgia de ambulatório pode ser necessária para remover um pedaço maior de tecido do colo do útero. Em algumas modalidades, a biópsia em cone, além de ajudar a confirmar um diagnóstico, pode servir como um tratamento inicial.

[00657] O termo “tumor sólido” refere-se a uma massa anormal de tecido que normalmente não contém cistos ou áreas de líquido. Tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo câncer de “tumor sólido” refere-se a tumores sólidos malignos, neoplásicos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, entre outros, sarcomas, carcinomas, e linfomas, tais como cânceres do pulmão, mama, câncer de mama triplo negativo, próstata, cólon, reto e bexiga. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de não pequenas células. A estrutura tecidual dos tumores sólidos inclui compartimentos teciduais interdependentes incluindo o parênquima (células do câncer) e as células estromais de sustentação nas quais as células cancerígenas estão dispersas e que podem fornecer um microambiente de sustentação.

[00658] Em algumas modalidades, a amostra do tumor é obtida como um aspirado por agulha fina (FNA), uma biópsia por agulha grossa, a pequena biópsia (incluindo, por exemplo, a biópsia por punção). Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 10. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 10 onde estão 1 ou 2 amostras de biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 100 onde estão 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais amostras de biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiramente em G-Rex 500 onde estão 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais

amostras de biópsia por agulha grossa e/ou pequena biópsia.

[00659] O FNA pode ser obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma. Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor de pulmão, tal como um tumor de pulmão de um paciente com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Em alguns casos, o paciente com CPNPC submeteu-se anteriormente a um tratamento cirúrgico.

[00660] TILs aqui descritos podem ser obtidos de uma amostra de FNA. Em alguns casos, a amostra de FNA é obtida ou isolada do paciente usando uma agulha de calibre fino variando de agulha de calibre 18 a uma agulha de calibre 25.A agulha de calibre fino pode ser de calibre 18, calibre 19, calibre 20, calibre 21, calibre 22, calibre 23, calibre 24 ou calibre 25. Em algumas modalidades, a amostra de FNA do paciente pode conter pelo menos 400.000 TILs, p. ex., 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs ou mais.

[00661] Em alguns casos, os TILs aqui descritos são obtidos de uma amostra de biópsia por agulha grossa. Em alguns casos, a amostra de biópsia por agulha grossa ou pequena biópsia é obtida ou isolada do paciente usando uma agulha cirúrgica ou clínica variando de agulha de calibre 11 a agulha de calibre 16.A agulha pode ser de calibre 11, calibre 12, calibre 13, calibre 14, calibre 15 ou calibre 16. Em algumas modalidades, a amostra de biópsia por agulha grossa do paciente pode conter pelo menos 400.000 TILs, p. ex., 400.000 TILs, 450.000 TILs, 500.000 TILs, 550.000 TILs, 600.000 TILs, 650.000 TILs, 700.000 TILs, 750.000 TILs, 800.000 TILs, 850.000 TILs, 900.000 TILs, 950.000 TILs ou mais.

[00662] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos de material digerido do fragmento ou amostra do tumor. Em algumas modalidades, o

material digerido do fragmento ou amostra do tumor foi gerado por incubação em meio com enzimas, por exemplo, entre outros, RPMI 1640, GlutaMAX 2 mM, gentamicina 10 µg/mL, DNase 30 U/mL e colagenase 1,0 mg/mL, seguida por dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de colocado em meio com enzimas, o tumor pode ser dissociado mecanicamente por aproximadamente 1 minuto. A solução pode então ser incubada por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5% e, a seguir, rompida mecanicamente mais uma vez por aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado novamente por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 5%, a amostra ou fragmento do tumor pode ser rompido mecanicamente uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, depois da terceira ruptura mecânica, se pedaços grandes de tecido estivessem presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais eram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 ºC em CO_2 5%. Em algumas modalidades, no fim da incubação final se a suspensão celular contivesse um número grande de eritrócitos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade, usando Ficoll, podia ser realizada para remover essas células.

[00663] Em algumas modalidades, a suspensão celular, antes da etapa de primeira expansão de preparação é chamada de “população de células primárias” ou uma população celular “recentemente obtida” ou “recentemente isolada”.

[00664] Em algumas modalidades, as células podem ser opcionalmente congeladas depois de isolamento da amostra (p. ex., depois de obter a amostra do tumor e/ou depois de obter a suspensão celular da amostra do tumor) e congeladas antes de admitidas na expansão descrita na etapa B, a qual é descrita mais detalhadamente abaixo, bem como exemplificada na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B).

B. Etapa B: Primeira expansão de preparação

[00665] Em algumas modalidades, os presentes métodos fornecem

TILs mais jovens, os quais podem proporcionar benefícios terapêuticos adicionais em relação a TILs mais velhos (ou seja, TILs que ainda passaram por mais rodadas de replicação antes da administração a um indivíduo/paciente). Características de TILs jovens foram descritas 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), todos os quais são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência.

[00666] Depois da biópsia ou digestão de fragmentos do tumor fragmentos e/ou amostras do tumor, por exemplo, tal como descrito na etapa A da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), as células resultantes são cultivadas em soro contendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras (p. ex., células alimentadoras apresentadoras de antígeno), sob condições que favorecem mais o crescimento de TILs do que de células tumorais e outra células. Em algumas modalidades, a IL-2, OKT-3 e células alimentadoras são adicionadas no início da cultura junto com o material digerido do fragmento ou amostra do tumor e/ou fragmentos ou amostras do tumor (p. ex., no Dia 0). Em algumas modalidades, o material digerido do fragmento ou amostra do tumor e/ou fragmentos ou amostras do tumor é incubado em um recipiente com até 60 fragmentos ou amostras por recipiente e com 6000 UI/mL de IL-2. Essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente de 1 a 7 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação ocorre por um período de 1 a 7 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8

células TILs a granel. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de preparação ocorre por um período de 5 a 7 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de preparação ocorre por um período de aproximadamente 6 a 7 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de preparação ocorre por um período de aproximadamente 7 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de 1 x 10^8 células TILs a granel.

[00667] Em uma modalidade preferida, a expansão de TILs pode ser realizada usando uma etapa de primeira expansão de preparação (por exemplo, tais como aquelas descritas na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir processos referidos como pré-REP ou REP de preparação e que contém células alimentadoras desde o Dia 0 e/ou desde o início da cultura), como descrito abaixo e aqui, seguida por uma segunda expansão rápida (Etapa D, incluindo processos referidos como etapas de Protocolo de Expansão Rápida (REP)) como descrito a seguir abaixo da Etapa D, seguida por crioconservação opcional e, em seguida, por uma segunda Etapa D (incluindo processos referidos como etapas de REP com reestimulação) como descrito abaixo. Os TILs obtidos desse processo podem ser opcionalmente classificados quanto às características fenotípicas e parâmetros metabólicos como aqui descrito. Em algumas modalidades, o fragmento do tumor tem entre aproximadamente 1 mm^3 e 10 mm^3.

[00668] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão é referido como “CM”, uma abreviação para meio de cultura. Em algumas modalidades, o CM para a Etapa B consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano 10%, Hepes 25 mM e gentamicina 10 µg/mL.

[00669] Em algumas modalidades, há 240 ou menos fragmentos ou

amostras do tumor. Em algumas modalidades, há 240 ou menos fragmentos ou amostras do tumor colocados em 4 ou menos recipientes. Em algumas modalidades, os recipientes são frascos GREX100 MCS. Em algumas modalidades, 60 ou menos fragmentos ou amostras do tumor são colocados em 1 recipiente. Em algumas modalidades, cada recipiente compreende 500 mL ou menos de meio por recipiente. Em algumas modalidades, o meio compreende IL-2. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio compreende células alimentadoras apresentadoras de antígeno (também aqui referidas como "células apresentadoras de antígeno"). Em algumas modalidades, o meio compreende 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio compreende OKT-3. Em algumas modalidades, o meio compreende 30 ng/mL de OKT-3 por recipiente. Em algumas modalidades, o recipiente é um frasco GREX100 MCS. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 e 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 e 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente.

[00670] Depois da preparação dos fragmentos ou amostras do tumor, as células resultantes (ou seja, que são provenientes dos fragmentos ou amostras e que constituem uma população de células primárias) são cultivadas em meio contendo IL-2, células alimentadoras apresentadoras de antígeno e OKT-3 sob condições que favorecem mais o crescimento de TILs do que o de células tumorais e outras células e que permitem a preparação de TILs e o crescimento acelerado desde o início da cultura no Dia 0. Em algumas modalidades, o material digerido dos fragmentos ou amostras do tumor e/ou fragmentos ou amostras do tumor são incubados com 6000 UI/mL de IL-2, bem como células alimentadoras apresentadoras de antígeno e OKT-3. Essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente

de 1 a 7 dias, resultando em uma população de TILs a granel, geralmente perto de $1x10^8$ células TILs a granel. Em algumas modalidades, o meio de crescimento durante a primeira expansão de preparação compreende IL-2 ou uma variante da mesma, bem como células alimentadoras apresentadoras de antígeno e OKT-3. Em algumas modalidades, a IL-2 é IL-2 humana recombinante (rhIL-2). Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de $20\text{-}30x10^6$ UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de $20x10^6$ UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de $25x10^6$ UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de $30x10^6$ UI/mg para um frasco-ampola de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de $4\text{-}8x10^6$ UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de $5\text{-}7x10^6$ UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de $6x10^6$ UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 é preparada como descrito em Exemplo 5. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 10.000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 9.000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 8.000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 7.000 UI/mL de IL-2, aproximadamente 6000 UI/mL de IL-2 ou aproximadamente 5.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 9.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 5.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 8.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente

7.000 UI/mL de IL-2 a aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 6.000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende ainda IL-2. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 1000 UI/mL, aproximadamente 1500 UI/mL, aproximadamente 2000 UI/mL, aproximadamente 2500 UI/mL, aproximadamente 3000 UI/mL, aproximadamente 3500 UI/mL, aproximadamente 4000 UI/mL, aproximadamente 4500 UI/mL, aproximadamente 5000 UI/mL, aproximadamente 5500 UI/mL, aproximadamente 6000 UI/mL, aproximadamente 6500 UI/mL, aproximadamente 7000 UI/mL, aproximadamente 7500 UI/mL ou aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende entre 1000 e 2000 UI/mL, entre 2000 e 3000 UI/mL, entre 3000 e 4000 UI/mL, entre 4000 e 5000 UI/mL, entre 5000 e 6000 UI/mL, entre 6000 e 7000 UI/mL, entre 7000 e 8000 UI/mL ou aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2.

[00671] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15, aproximadamente 400 UI/mL de IL-15, aproximadamente 300 UI/mL de IL-15, aproximadamente 200 UI/mL de IL-15, aproximadamente 180 UI/mL de IL-15, aproximadamente 160 UI/mL de IL-15, aproximadamente 140 UI/mL de IL-15, aproximadamente 120 UI/mL de IL-15 ou aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira

expansão de preparação compreende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende ainda IL-15. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15.

[00672] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 20 UI/mL de IL-21, aproximadamente 15 UI/mL de IL-21, aproximadamente 12 UI/mL de IL-21, aproximadamente 10 UI/mL de IL-21, aproximadamente 5 UI/mL de IL-21, aproximadamente 4 UI/mL de IL-21, aproximadamente 3 UI/mL de IL-21, aproximadamente 2 UI/mL de IL-21, aproximadamente 1 UI/mL de IL-21 ou aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 10

UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-21. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

[00673] Em uma modalidade, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 30 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende aproximadamente 0,1 ng/mL, aproximadamente 0,5 ng/mL, aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente 2,5 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 7,5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, aproximadamente 100 ng/mL, aproximadamente 200 ng/mL, aproximadamente 500 ng/mL, e aproximadamente 1 μg/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular 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. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende entre 15 ng/ml e 30 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende 30 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o anticorpo OKT-3 é muromonabe.

Tabela 18: Sequências de aminoácidos de muromonabe (anticorpo OKT-3 exemplar)

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

[00674] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende um ou mais agonistas de TNFRSF em um meio de cultura celular. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF compreende um agonista de 4-1BB. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é um agonista de 4-1BB, e o agonista de 4-1BB é selecionado dentre o grupo que consiste em urelumabe, utomilumabe, EU-101, uma proteína de fusão e fragmentos, derivados, variantes, biossimilares e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é adicionado a uma concentração suficiente para conseguir uma concentração no meio de cultura celular entre 0,1 µg/mL e 100 µg/mL. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é

adicionado a uma concentração suficiente para conseguir uma concentração no meio de cultura celular entre 20 µg/mL e 40 µg/mL.

[00675] Em algumas modalidades, além de um ou mais agonistas de TNFRSF, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende ainda IL-2 a uma concentração inicial de aproximadamente 3000 UI/mL e anticorpo OKT-3 a uma concentração inicial de aproximadamente 30 ng/mL, e em que um ou mais dos agonistas de TNFRSF compreendem um agonista de 4-1BB. Em algumas modalidades, além de um ou mais agonistas de TNFRSF, o meio de cultura celular da primeira expansão de preparação compreende ainda IL-2 a uma concentração inicial de aproximadamente 6000 UI/mL e anticorpo OKT-3 a uma concentração inicial de aproximadamente 30 ng/mL, e em que um ou mais dos agonistas de TNFRSF compreendem um agonista de 4-1BB.

[00676] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação é referido como "CM", uma abreviação para meio de cultura. Em algumas modalidades, é referido como CM1 (meio de cultura 1). Em algumas modalidades, o CM consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano 10%, Hepes 25 mM e gentamicina 10 µg/mL. Em algumas modalidades, o CM é o CM1 descrito nos Exemplos, ver, Exemplos 1 e 14. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação ocorre em um meio de cultura celular inicial ou um primeiro meio de cultura celular. Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de preparação ou o meio de cultura celular inicial ou o primeiro meio de cultura celular compreende IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno (também aqui referidas como células alimentadoras).

[00677] Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de preparação (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir

aqueles às vezes referidos como o pré-REP ou REP de preparação) é de 1 a 7 dias, como discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de preparação (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP ou REP de preparação) é de 2 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de preparação (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP ou REP de preparação) é de 3 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de preparação (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP ou REP de preparação) é de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de preparação (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP ou REP de preparação) é de 5 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de preparação (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP ou REP de preparação) é de 6 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de preparação (incluindo processos tais como, por exemplo, aqueles dispostos na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), que pode incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP ou REP de preparação) é de 7 dias.

[00678] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 1 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de

quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 2 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 3 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 4 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 5 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 6 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 1 dias a 10 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 2 dias a 10 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é

iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 3 dias a 10 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 4 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 5 dias a 10 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 6 dias a 10 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 8 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 9 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 10 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a pequena biópsia (p. ex., a biópsia por agulha grossa) é removida da cultura em aproximadamente 1, 2 ou 3 dias. Em algumas modalidades, a pequena biópsia (p. ex., a biópsia por agulha grossa) é removida da cultura em 3 dias.

[00679] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 8 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 9 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 10 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 11 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 12 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 13 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 14 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode prosseguir por 15 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação de TILs pode

prosseguir por 16 dias a 17 dias desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionadas à cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada.

[00680] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação dos TILs pode prosseguir por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9, dias ou 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 1 dia a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 2 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 3 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 4 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 5 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 6 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 1 dia a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 2 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 3 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 4 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 5 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 6 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 7 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 8 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 9 dias a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 9 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 10 dias.

[00681] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação dos TILs pode prosseguir por 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias ou 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 8 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 9 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 10 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 11 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 12 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 13 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 14 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 15 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 16 dias a 17 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TILs pode prosseguir por 17 dias.

[00682] Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 é empregada como uma combinação durante a primeira expansão de preparação. Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante a primeira expansão de preparação, incluindo, por exemplo, durante processos da Etapa B de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), bem como aqui descrito. Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 é empregada como uma combinação durante a primeira expansão de preparação. Em algumas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21 bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante processos da Etapa B processos de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) e como aqui descrito.

[00683] Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação, por exemplo, Etapa B de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura

85B), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descritas. Em algumas modalidades, um biorreator é empregado. Em algumas modalidades, um biorreator é empregado as o recipiente. Em algumas modalidades, o biorreator empregado é, por exemplo, um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator empregado é um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator empregado é um G-REX-10.

1. Células alimentadoras e células apresentadoras de antígeno

[00684] Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de preparação aqui descrito (por exemplo, incluindo expansões tais como aquelas descritas na etapa B da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), bem como aqueles referidos como pré-REP ou REP de preparação) requerem células alimentadoras (também aqui referido como "células apresentadoras de antígeno") no início da expansão de TILs e durante a primeira expansão de preparação. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de unidades padrão de sangue total de doadores sadios de sangue alogênico. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação por gradiente de Ficoll-Paque. Em algumas modalidades, 2,5 x 10^8 células alimentadoras são usadas durante a primeira expansão de preparação. Em algumas modalidades, 2,5 x 10^8 células alimentadoras por recipiente são usadas durante a primeira expansão de preparação. Em algumas modalidades, 2,5 x 10^8 células alimentadoras por GREX-10 são usadas durante a primeira expansão de preparação. Em algumas modalidades, 2,5 x 10^8 células alimentadoras por GREX-100 são usadas durante a primeira expansão de preparação.

[00685] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, quer por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de REP, como descrito nos exemplos, o qual fornece um protocolo exemplar para avaliar a

incompetência na replicação de PBMCs alogênicas irradiadas.

[00686] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis no dia 14 for inferior ao número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 da primeira expansão de preparação.

[00687] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 da primeira expansão de preparação. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 30 ng/mL e IL-2 3000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 30 ng/mL e 6000 UI/mL IL-2.

[00688] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 da primeira expansão de preparação. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 5-60 ng/mL e IL-2 1000-6000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 10-50 ng/mL e IL-2 2000-5000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 20-40 ng/mL e IL-2 2000-4000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 25-35 ng/mL e IL-2 2500-3500 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 30 ng/mL e 6000 UI/mL IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs

são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 15 ng/mL e IL-2 3000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 15 ng/mL e 6000 UI/mL IL-2.

[00689] Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno são PBMCs. Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno são células alimentadoras apresentadoras de antígeno artificiais. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é aproximadamente 1 para 25, aproximadamente 1 para 50, aproximadamente 1 para 100, aproximadamente 1 para 125, aproximadamente 1 para 150, aproximadamente 1 para 175, aproximadamente 1 para 200, aproximadamente 1 para 225, aproximadamente 1 para 250, aproximadamente 1 para 275, aproximadamente 1 para 300, aproximadamente 1 para 325, aproximadamente 1 para 350, aproximadamente 1 para 375, aproximadamente 1 para 400 ou aproximadamente 1 para 500. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é entre 1 para 50 e 1 para 300. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é entre 1 para 100 e 1 para 200.

[00690] Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de preparação aqui descrito requerem uma razão de aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 100 x 10^6 TILs. Em outra modalidade, os procedimentos da primeira expansão de preparação aqui descrito requerem uma razão de aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 50 x 10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, a primeira expansão de preparação aqui descrito requer aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 25 x 10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, a primeira expansão de preparação

aqui descrito requer aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras. Em ainda outra modalidade, a primeira expansão de preparação requer um quarto, um terço, cinco doze alvos ou a metade do número de células alimentadoras usadas na segunda expansão rápida.

[00691] Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de preparação compreende IL-2. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de preparação compreende 6000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de preparação compreende células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de preparação compreende 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de preparação compreende OKT-3. Em algumas modalidades, o meio compreende 30 ng de OKT-3 por recipiente. Em algumas modalidades, o recipiente é um frasco GREX100 MCS. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 e 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 e 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio compreende 500 mL de meio de cultura e 15 µg de OKT-3 por 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio compreende 500 mL de meio de cultura e 15 µg de OKT-3 por recipiente. Em algumas modalidades, o recipiente é um frasco GREX100 MCS. Em algumas modalidades, o meio compreende 500 mL de meio de cultura e 6000 UI/mL de IL-2, 30 ng/mL de OKT-3 e 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende 500 mL de meio de cultura e 6000 UI/mL de IL-2, 15 µg de OKT-3 e 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio compreende 500 mL de meio de cultura e 15 µg de

OKT-3 por 2,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente.

[00692] Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de preparação aqui descrito requerem um excesso de células alimentadoras em relação aos TILs durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de unidades padrão de sangue total de doadores sadios de sangue alogênico. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação por gradiente de Ficoll-Paque. Em uma modalidade, são usadas células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC) no lugar de PBMCs.

[00693] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, quer por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de expansão de TILs aqui descrito, incluindo os procedimentos exemplares descritos nos figuras e exemplos.

[00694] Em uma modalidade, células apresentadoras de antígeno artificiais são usadas na primeira expansão de preparação em substituição ou em combinação com PBMCs.

2. Citocinas

[00695] Os métodos de expansão aqui descritos geralmente usam meios de cultura com doses elevadas de um citocina, em particular IL-2, como é conhecido na técnica.

[00696] Alternativamente, o uso de combinações de citocinas para a primeira expansão de preparação de TILs é também possível, com combinações de duas ou mais dentre IL-2, IL-15 e IL-21 como é em geral delineado na Publicação Internacional Nº WO 2015/189356 e WO 2015/189357, aqui expressamente incorporadas, em sua totalidade, por referência. Assim, as possíveis combinações incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, sendo que a última encontra utilidade especialmente em muitas modalidades. O uso de combinações de citocinas

favorece especificamente a geração de linfócitos e, em particular, células T como ali descrito.

Tabela 19: Sequências de aminoácidos de interleucinas.

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:3 IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Aldesleucina	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

C. Etapa C: Transição da primeira expansão de preparação para segunda expansão rápida

[00697] Em alguns casos, a população de TIL a granel obtida na primeira expansão de preparação (que pode incluir expansões às vezes referidas como pré-REP), incluindo, por exemplo, a população de TIL obtida, por exemplo, na Etapa B como indicado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), pode ser submetida a uma segunda expansão rápida (que pode incluir expansões às vezes referidas como Protocolo de Expansão Rápida (REP)) e então crioconservada como discutido abaixo. Do mesmo modo, caso os TILs geneticamente modificados venham a ser usados em terapia, a população de TILs expandidos da primeira expansão de preparação ou a população de TILs expandidos da segunda expansão rápida podem ser

submetidas a modificações genéticas por tratamentos adequados antes da etapa de expansão ou depois da primeira expansão de preparação e antes da segunda expansão rápida.

[00698] Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão de preparação (por exemplo, da Etapa B como indicado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) são armazenados até que fenotipados para seleção. Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão de preparação (por exemplo, da Etapa B como indicado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) não são armazenados e prosseguem diretamente para a segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão de preparação não são crioconservados depois da primeira expansão de preparação e antes da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 2 dias, 3 dias, 4, dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias, desde quando amostras ou fragmentos do tumor são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida ocorre em aproximadamente 3 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para segunda expansão ocorre em aproximadamente 4 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 5 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da

primeira expansão de preparação para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 6 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão ocorre em aproximadamente 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada.

[00699] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida ocorre em 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias, até 10 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida ocorre em 1 dia a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão ocorre em 2 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão ocorre em 3 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida ocorre em 4 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida

ocorre em 5 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida ocorre em 6 dias a 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida ocorre em 7 dias desde quando amostras ou fragmentos são adicionados ao meio de cultura celular e/ou de quando a etapa de primeira expansão de preparação é iniciada.

[00700] Em algumas modalidades, os TILs não são armazenados depois da primeira expansão primária e antes da segunda expansão rápida, e os TILs prosseguem diretamente para a segunda expansão rápida (por exemplo, em algumas modalidades, não há armazenamento durante a transição da Etapa B para Etapa D como mostrado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)). Em algumas modalidades, a transição ocorre em sistema fechado, como aqui descrito. Em algumas modalidades, os TILs da primeira expansão de preparação, a segunda população de TILs, prossegue diretamente para a segunda expansão rápida sem período de transição.

[00701] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida, por exemplo, Etapa C de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descritas. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o único biorreator empregado é, por exemplo, um GREX-10 ou um GREX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de preparação para a segunda expansão rápida envolve um escalonamento

vertical no tamanho do recipiente. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação é realizada em um recipiente menor que na segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a primeira expansão de preparação é realizada em um GREX-100 e a segunda expansão rápida é realizada em um GREX-500.

D. Etapa D: Segunda expansão rápida

[00702] Em algumas modalidades, a população celular de TILs é expandida mais em número após a coleta e a primeira expansão de preparação, depois da Etapa A e Etapa B, e da transição referida como Etapa C, como indicado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)). Essa expansão adicional é aqui referida como a segunda expansão rápida, que pode incluir processos de expansão em geral referidos na técnica como um processo de expansão rápida (Protocolo de Expansão Rápida ou REP; bem como processos como indicados na etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)). A segunda expansão rápida é geralmente realizada usando um meio de cultura compreendendo alguns componentes, incluindo células alimentadoras, uma fonte de citocinas e um anticorpo anti-CD3, em um recipiente permeável a gases. Em algumas modalidades, 1 dia, 2 dias, 3 dias ou 4 dias depois do início da segunda expansão rápida (ou seja, em 8, 9, 10 ou 11 dias do processo Gen 3 global), os TILs são transferidos para um recipiente de volume maior.

[00703] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida (que pode incluir expansões às vezes referidas como REP; bem como processos como indicados na etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) de TILs pode ser realizada usando quaisquer frascos ou recipientes para TILs conhecidos pelos técnicos no assunto. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4, dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias ou 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por

aproximadamente 1 dias a aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 2 dias a aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 3 dias a aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 4 dias a aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 5 dias a aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 6 dias a aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 7 dias a aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 7 dias a aproximadamente 10 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 1 dia depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 2 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 3 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 4 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 5 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 6 dias depois do

início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 7 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 8 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 9 dias depois do início da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TILs pode prosseguir por aproximadamente 10 dias depois do início da segunda expansão rápida.

[00704] Em uma modalidade, a segunda expansão rápida pode ser realizada em um recipiente permeável a gases pelos métodos da presente invenção (incluindo, por exemplo, expansões referidas como REP; bem como processos como indicado na etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)). Em algumas modalidades, os TILs são expandidos na segunda expansão rápida na presença de IL-2, OKT-3 e células alimentadoras (também aqui referidas como "células apresentadoras de antígeno"). Em algumas modalidades, os TILs são expandidos na segunda expansão rápida na presença de IL-2, OKT-3 e células alimentadoras, em que as células alimentadoras são adicionadas a uma concentração final que é duas vezes, 2,4 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes ou 4 vezes a concentração de células alimentadoras presentes na primeira expansão de preparação, Por exemplo, os TILs podem ser expandidos rapidamente utilizando estimulação não específica de receptores de células T na presença de interleucina-2 (IL-2) ou interleucina-15 (IL-15). O estímulo não específico de receptores de células T podem incluir, por exemplo, um anticorpo anti-CD3, tais como cerca de 30 ng/mL de OKT3, um anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3 (disponibilizado comercialmente pela Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA) ou UHCT-1 (disponibilizado comercialmente pela BioLegend, San Diego, CA, EUA). TILs podem ser expandidos para induzir

estimulação adicional dos TILs *in vitro* pela inclusão de um ou mais antígenos durante a segunda expansão, incluindo porções antigênicas dos mesmos, tais como epítopo(s), do câncer, que podem ser opcionalmente expressos a partir de um vetor, tal como um peptídeo de ligação ao antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), p. ex., MART-1 0,3 μM:26-35 (27 L) ou gpl 00:209-217 (210M), opcionalmente na presença de um fator de crescimento de células T, tais como 300 UI/mL IL-2 ou IL-15. Outros antígenos adequados podem incluir, p. ex., NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno do câncer de tirosinase, MAGE-A3, SSX-2, e VEGFR2, ou porções antigênicas dos mesmos. TIL podem também ser expandidos rapidamente por reestimulação com o(s) mesmo(s) antígeno(s) do câncer pulsados em células apresentadoras de antígeno que expressam HLA-A2. Alternativamente, os TILs podem ser reestimulados mais com, p. ex., exemplo, linfócitos autólogos irradiados ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. Em algumas modalidades, a reestimulação ocorre como parte da segunda expansão. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre na presença de linfócitos autólogos irradiados ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2.

[00705] Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 3000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 1000 UI/mL, aproximadamente 1500 UI/mL, aproximadamente 2000 UI/mL, aproximadamente 2500 UI/mL, aproximadamente 3000 UI/mL, aproximadamente 3500 UI/mL, aproximadamente 4000 UI/mL, aproximadamente 4500 UI/mL, aproximadamente 5000 UI/mL, aproximadamente 5500 UI/mL, aproximadamente 6000 UI/mL, aproximadamente 6500 UI/mL, aproximadamente 7000 UI/mL, aproximadamente 7500 UI/mL ou aproximadamente 8000 UI/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de

cultura celular compreende entre 1000 e 2000 UI/mL, entre 2000 e 3000 UI/mL, entre 3000 e 4000 UI/mL, entre 4000 e 5000 UI/mL, entre 5000 e 6000 UI/mL, entre 6000 e 7000 UI/mL, entre 7000 e 8000 UI/mL ou entre 8000 UI/mL de IL-2.

[00706] Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 30 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 0,1 ng/mL, aproximadamente 0,5 ng/mL, aproximadamente 1 ng/mL, aproximadamente 2,5 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 7,5 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 60 ng/mL, aproximadamente 70 ng/mL, aproximadamente 80 ng/mL, aproximadamente 90 ng/mL, aproximadamente 100 ng/mL, aproximadamente 200 ng/mL, aproximadamente 500 ng/mL e aproximadamente 1 μg/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular 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. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende entre 30 ng/ml e 60 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 30 ng/mL OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 60 ng/mL OKT-3. Em algumas modalidades, o anticorpo OKT-3 é muromonabe.

[00707] Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende IL-2. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida

compreende células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende 7,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende OKT-3. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende 500 mL de meio de cultura e 30 μg de OKT-3 por recipiente. Em algumas modalidades, o recipiente é um frasco GREX100 MCS. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende 6000 UI/mL de IL-2, 60 ng/mL de OKT-3 e 7,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende 500 mL de meio de cultura e 6000 UI/mL de IL-2, 30 μg de OKT-3 e 7,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente.

[00708] Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende IL-2. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende entre 5 x 10^8 e 7,5 x 10^8células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende OKT-3. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende 500 mL de meio de cultura e 30 μg de OKT-3 por recipiente. Em algumas modalidades, o recipiente é um frasco GREX100 MCS. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende 6000 UI/mL de IL-2, 60 ng/mL de OKT-3 e entre 5 x 10^8 e 7,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende 500 mL de meio de cultura e 6000 UI/mL de IL-2, 30 μg de OKT-3 e entre 5 x 10^8 e 7,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno por recipiente.

[00709] Em algumas modalidades, o meio de cultura celular

compreende um ou mais agonistas de TNFRSF em um meio de cultura celular. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF compreende um agonista de 4-1BB. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é um agonista de 4-1BB, e o agonista de 4-1BB é selecionado dentre o grupo que consiste em urelumabe, utomilumabe, EU-101, uma proteína de fusão e fragmentos, derivados, variantes, biossimilares e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é adicionado a uma concentração suficiente para conseguir uma concentração no meio de cultura celular entre 0,1 μg/mL e 100 μg/mL. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é adicionado a uma concentração suficiente para conseguir uma concentração no meio de cultura celular entre 20 μg/mL e 40 μg/mL.

[00710] Em algumas modalidades, além de um ou mais agonistas de TNFRSF, o meio de cultura celular compreende ainda IL-2 a uma concentração inicial de aproximadamente 3000 UI/mL e anticorpo OKT-3 a uma concentração inicial de aproximadamente 30 ng/mL, e em que um ou mais dos agonistas de TNFRSF compreendem um agonista de 4-1BB.

[00711] Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 é empregada como uma combinação durante a segunda expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21, bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante a segunda expansão, incluindo, por exemplo, durante processos da Etapa D de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), bem como aqui descritos. Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 é empregada como uma combinação durante a segunda expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21 bem como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante processos da Etapa D de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) e como aqui descrito.

[00712] Em algumas modalidades, a segunda expansão pode ser conduzida em um meio de cultura celular suplementado compreendendo IL-2,

OKT-3, células alimentadoras apresentadoras de antígeno e, opcionalmente, um agonista de TNFRSF. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura celular suplementado. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular suplementado compreende IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura celular compreende IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs; também referidas como células alimentadoras apresentadoras de antígeno). Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno (ou seja, células apresentadoras de antígeno).

[00713] Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15, aproximadamente 400 UI/mL de IL-15, aproximadamente 300 UI/mL de IL-15, aproximadamente 200 UI/mL de IL-15, aproximadamente 180 UI/mL de IL-15, aproximadamente 160 UI/mL de IL-15, aproximadamente 140 UI/mL de IL-15, aproximadamente 120 UI/mL de IL-15 ou aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 500 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 400 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 300 UI/mL de IL-15 a aproximadamente 100 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 200 UI/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 180 UI/mL de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-15. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular compreende

aproximadamente 180 UI/mL de IL-15.

[00714] Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 20 UI/mL de IL-21, aproximadamente 15 UI/mL de IL-21, aproximadamente 12 UI/mL de IL-21, aproximadamente 10 UI/mL de IL-21, aproximadamente 5 UI/mL de IL-21, aproximadamente 4 UI/mL de IL-21, aproximadamente 3 UI/mL de IL-21, aproximadamente 2 UI/mL de IL-21, aproximadamente 1 UI/mL de IL-21 ou aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 20 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 15 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 12 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 10 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 5 UI/mL de IL-21 a aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende aproximadamente 2 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 0,5 UI/mL de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura celular compreende ainda IL-21. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura celular compreende aproximadamente 1 UI/mL de IL-21.

[00715] Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs) são PBMCs. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs e/ou células apresentadoras de antígeno na expansão

rápida e/ou na segunda expansão é aproximadamente 1 para 10, aproximadamente 1 para 15, aproximadamente 1 para 20, aproximadamente 1 para 25, aproximadamente 1 para 30, aproximadamente 1 para 35, aproximadamente 1 para 40, aproximadamente 1 para 45, aproximadamente 1 para 50, aproximadamente 1 para 75, aproximadamente 1 para 100, aproximadamente 1 para 125, aproximadamente 1 para 150, aproximadamente 1 para 175, aproximadamente 1 para 200, aproximadamente 1 para 225, aproximadamente 1 para 250, aproximadamente 1 para 275, aproximadamente 1 para 300, aproximadamente 1 para 325, aproximadamente 1 para 350, aproximadamente 1 para 375, aproximadamente 1 para 400 ou aproximadamente 1 para 500. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão é 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 é entre 1 para 100 e 1 para 200.

[00716] Em uma modalidade, o REP e/ou a segunda expansão rápida é realizado em frascos com os TILs a granel misturados com 100 ou 200 vezes de excesso de células alimentadoras inativadas, em que a concentração de células alimentadoras é pelo menos 1,1 vezes (1,1X), 1,2x, 1,3x, 1,4X, 1,5X, 1,6X, 1,7X, 1,8x, 1,8x, 2X, 2,1X2,2x, 2,3x, 2,4X, 2,5X, 2,6X, 2,7X, 2,8x, 2,9X, 3,0X, 3,1X, 3,2x, 3,3x, 3,4X, 3,5X, 3,6X, 3,7X, 3,8x, 3,9X ou 4,0X a concentração de células alimentadoras na primeira expansão de preparação, anticorpo anti-CD3, OKT3, 30 ng/mL e IL-2 6000 UI/mL em 150 mL de meio. A substituição do meio é efetuada (geralmente 2/3 do meio são substituídos por aspiração de 2/3 do meio esgotado e substituição com volume igual de meio fresco) até que as células sejam transferidas para uma câmara alternativa de crescimento. Câmaras alternativas de crescimento incluem frascos G-REX frascos e recipientes permeáveis a gases como discutidos mais completamente abaixo.

[00717] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida (que pode incluir processos referidos como o processo REP) é de 7 a 10 dias, como discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida (que pode incluir processos referidos como o processo REP) é de 7 a 9 dias, como discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a segunda expansão é de 7 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão é de 8 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão é de 9 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão é de 10 dias.

[00718] Em uma modalidade, a segunda expansão (que pode incluir expansões referidas como REP, bem como aquelas referidas na etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) pode ser realizada em frascos permeáveis a gases com capacidade de 500 mL e fundo de silicone permeável a gases de 100 cm (G-Rex 100, disponibilizado comercialmente pela Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EUA), 5 x 10^6 ou 10 x 10^6 TILs podem ser cultivados com PBMCs em 400 mL de meio 50/50, suplementado com soro AB humano 5%, 3000 UI por mL de IL-2 e 30 ng por mL de anti-CD3 (OKT3). Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37 ºC em CO*2* 5%. No dia 5, 250 mL de sobrenadante podem ser removidos e colocados em frascos de centrífuga e centrifugados a 1500 rpm (491 x g) por 10 minutos. Os *pellets* de TILs podem ser ressuspensos com 150 mL de meio fresco com soro AB humano 5%, 6000 UI por mL de IL-2, e adicionados de volta aos frascos GREX-100 originais. Quando TILs são expandidos em série em frascos GREX-100, no dia 10 ou 11, os TILs podem ser transferidos para um frasco maior, tal como um GREX-500. As células podem ser coletadas em 14 dias de cultura. As células podem ser coletadas em 15 dias de cultura. As células podem ser coletadas em 16 dias de cultura. Em algumas modalidades, a substituição do meio é efetuada até que as células sejam transferidas para uma câmara alternativa de crescimento. Em algumas modalidades, 2/3 do meio são substituídos por aspiração do meio esgotado com volume igual de

meio fresco. Em algumas modalidades, as câmaras alternativas de crescimento incluem frascos GREX e recipientes permeáveis a gases como discutido mais completamente abaixo.

[00719] Em uma modalidade, a segunda expansão rápida (incluindo expansões referidas como REP) é realizada e compreende ainda uma etapa em que TILs são selecionados por reatividade superior com o tumor. Qualquer método de seleção conhecido na técnica pode ser utilizado. Por exemplo, os métodos descrito em Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2016/0010058 A1, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência, pode ser utilizado para seleção de TILs for reatividade superior com o tumor.

[00720] Opcionalmente, um ensaio de viabilidade celular pode ser realizado depois da segunda expansão rápida (incluindo expansões referidas como a expansão REP), por meio de ensaios padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, um ensaio de exclusão do azul de Trypan pode ser realizado em uma amostra dos TILs a granel, o qual marca seletivamente as células mortas e permite avaliar a viabilidade. Em algumas modalidades, amostras de TILs podem contadas e a viabilidade determinada usando um contador automático de células Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Em algumas modalidades, a viabilidade é determinada de acordo com o protocolo padrão do Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter.

[00721] Os diversos receptores de antígenos de linfócitos T e B são produzidos por recombinação somática de um número limitado, mas grande de segmentos gênicos. Esses segmentos gênicos: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de células T (TCRs). A presente invenção provê um método para gerar TILs que exibem e aumentam a diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, os TILs obtidos na segunda

expansão exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, o aumento é um aumento na diversidade de imunoglobulinas e/ou na diversidade de receptores de células T. Em algumas modalidades, a diversidade é na imunoglobulina e é na cadeia pesada de imunoglobulinas. Em algumas modalidades, a diversidade é na imunoglobulina e é na cadeia leve de imunoglobulinas. Em algumas modalidades, a diversidade é no receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade é em um dos receptores de células T selecionado dentre o grupo que consiste em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de TCRab (ou seja, TCRα/β).

[00722] Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão rápida (p. ex., às vezes referidos como CM2 ou o segundo meio de cultura celular), compreende IL-2, OKT-3, bem como as células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs), como discutido mais detalhadamente abaixo. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão rápida (p. ex., às vezes referidos como CM2 ou o segundo meio de cultura celular), compreende IL-2 6000 UI/mL, OKT-3 30 μg/frasco, bem como 7,5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs), como discutido mais detalhadamente abaixo. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão rápida (p. ex., às vezes referidos como CM2 ou o segundo meio de cultura celular), compreende IL-2, OKT-3, bem como as células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs), como discutido mais detalhadamente abaixo. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão rápida (p. ex., às vezes referidos como CM2 ou o segundo meio de cultura celular), compreende IL-2

6000 UI/mL, OKT-330 µg/frasco, bem como 5 x 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs), como discutido mais detalhadamente abaixo.

[00723] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida, por exemplo, Etapa D de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descritas. Em algumas modalidades, um biorreator é empregado. Em algumas modalidades, um biorreator é empregado as o recipiente. Em algumas modalidades, o biorreator empregado is por exemplo, a G-REX-100 ou a G-REX-500. Em algumas modalidades, o biorreator empregado is a G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator empregado is a G-REX-500.

1. Células alimentadoras e células apresentadoras de antígeno

[00724] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão rápida aqui descritos (por exemplo, incluindo a expansão tal como aquelas descritas na etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), bem como aquelas referidas como REP) requerem um excesso de células alimentadoras durante a expansão REP de TILs e/ou durante a segunda expansão rápida. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de unidades padrão de sangue total de doadores sadios de sangue. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação por gradiente de Ficoll-Paque.

[00725] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, quer por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de REP, como descrito nos exemplos, o qual fornece um protocolo exemplar para avaliar a incompetência na replicação de PBMCs alogênicas irradiadas.

[00726] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de

expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis no dia 7 ou 14 for inferior ao número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (ou seja, o dia de início da segunda expansão).

[00727] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14, não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (ou seja, o dia de início da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 30 ng/mL e IL-2 3000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 30 ng/mL e IL-2 6000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 15 ng/mL e IL-2 3000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 15 ng/mL e IL-2 6000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 60 ng/mL e IL-2 3000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 60 ng/mL e IL-2 6000 UI/mL.

[00728] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TILs aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14, não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (ou seja, o dia de início da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30-anticorpo OKT3 60 ng/mL e IL-2 1000-6000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30-anticorpo

OKT3 60 ng/mL e IL-2 2000-5000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30-anticorpo OKT3 60 ng/mL e IL-2 2000-4000 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30-anticorpo OKT3 60 ng/mL e IL-2 2500-3500 UI/mL. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30-anticorpo OKT3 60 ng/mL e IL-2 6000 UI/mL.

[00729] Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno são PBMCs. Em algumas modalidades, as células alimentadoras apresentadoras de antígeno são células alimentadoras apresentadoras de antígeno artificiais. Em uma modalidade, as razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é aproximadamente 1 para 10, aproximadamente 1 para 25, aproximadamente 1 para 50, aproximadamente 1 para 100, aproximadamente 1 para 125, aproximadamente 1 para 150, aproximadamente 1 para 175, aproximadamente 1 para 200, aproximadamente 1 para 225, aproximadamente 1 para 250, aproximadamente 1 para 275, aproximadamente 1 para 300, aproximadamente 1 para 325, aproximadamente 1 para 350, aproximadamente 1 para 375, aproximadamente 1 para 400 ou aproximadamente 1 para 500. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é entre 1 para 50 e 1 para 300. Em uma modalidade, a razão de TILs para células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é entre 1 para 100 e 1 para 200.

[00730] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descrito requerem uma razão de aproximadamente 5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 100 x 10^6 TILs. Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descrito requerem uma razão de aproximadamente 7,5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 100 x 10^6 TILs. Em outra modalidade, os procedimentos da segunda expansão

aqui descrito requerem uma razão de aproximadamente 5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 50 x 10^6 TILs. Em outra modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descrito requerem uma razão de aproximadamente 7,5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 50 x 10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descrito requerem aproximadamente 5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 25 x 10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descrito requerem aproximadamente 7,5 x 10^8 células alimentadoras para aproximadamente 25 x 10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, a segunda expansão rápida requer duas vezes o número de células alimentadoras que segunda expansão rápida. Em ainda outra modalidade, quando a primeira expansão de preparação aqui descrito requerer aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras, a segunda expansão rápida requer aproximadamente 5 x 10^8 células alimentadoras. Em ainda outra modalidade, quando primeira expansão de preparação aqui descrito requerer aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras, a segunda expansão rápida requer aproximadamente 7,5 x 10^8 células alimentadoras. Em ainda outra modalidade, a segunda expansão rápida requer duas vezes (2,0X), 2,5X, 3,0X, 3,5X ou 4,0X o número de células alimentadoras da primeira expansão de preparação.

[00731] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão rápida aqui descrito requerem um excesso de células alimentadoras durante a segunda expansão rápida. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de unidades padrão de sangue total de doadores sadios de sangue alogênico. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação por gradiente de Ficoll-Paque. Em uma modalidade, são usadas células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC) no lugar de PBMCs. Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à segunda expansão rápida com o dobro da

concentração de PBMCs que foram adicionadas à primeira expansão de preparação.

[00732] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, quer por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de expansão de TILs aqui descrito, incluindo os procedimentos exemplares descritos nos figuras e exemplos.

[00733] Em uma modalidade, células apresentadoras de antígeno artificiais são usadas na segunda expansão rápida em substituição ou em combinação com PBMCs.

2. Citocinas

[00734] Os métodos da segunda expansão rápida aqui descritos geralmente usam meios de cultura com doses elevadas de um citocina, em particular IL-2, como é conhecido na técnica.

[00735] Alternativamente, o uso de combinações de citocinas para a segunda expansão rápida de TILs é também possível, com combinações de duas ou mais dentre IL-2, IL-15 e IL-21 como é em geral delineado em WO 2015/189356 e WO 2015/189357, aqui expressamente incorporados, em sua totalidade, por referência. Assim, as possíveis combinações incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, sendo que a última encontra utilidade especialmente em muitas modalidades. O uso de combinações de citocinas favorece especificamente a geração de linfócitos e, em particular, células T como ali descrito.

E. Etapa E: Coleta de TILs

[00736] Depois da etapa da segunda expansão rápida, as células podem ser coletadas. Em algumas modalidades, os TILs são coletados depois de uma, duas, três, quatro ou mais etapas de expansão, por exemplo, como disposto na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades os TILs são coletados depois de duas etapas de expansão, por exemplo, como disposto na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas

modalidades, os TILs são coletados depois de duas etapas de expansão, uma primeira expansão de preparação e uma segunda expansão rápida, por exemplo, como disposto na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B).

[00737] TILs podem ser coletados de qualquer maneira adequada e estéril, incluindo, por exemplo, por centrifugação. Métodos para a coleta de TILs são bem conhecidos na técnica e qualquer um de tais métodos conhecidos pode ser empregado com o presente processo. Em algumas modalidades, TILS são coletadas usando um sistema automático.

[00738] Coletores de células e/ou sistemas de processamento de células são disponibilizados comercialmente por uma variedade de fontes, incluindo, por exemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer e Inotech Biosystems International, Inc. Qualquer coletor celular pode ser empregado com os presentes métodos. Em algumas modalidades, o coletor de células e/ou sistema de processamento de células é um coletor de células baseado em membrana. Em algumas modalidades, a coleta de células é por um sistema de processamento de células, tais como o sistema LOVO (fabricado por Fresenius Kabi). O termo “sistema de processamento de células LOVO” também se refere a qualquer instrumento ou dispositivo fabricado por qualquer fornecedor que possa bombear uma solução compreendendo células através de uma membrana ou filtro, tal como uma membrana giratória (*spinning*) ou filtro giratório em um ambiente estéril e/ou de sistema fechado, permitindo o fluxo contínuo e o processamento das células para remover o sobrenadante ou meio de cultura celular sem peletização. Em algumas modalidades, o coletor de células e/ou sistema de processamento de células pode realizar separação celular, lavagem, troca de líquidos, concentração, e/ou outras etapas do processamento de células em um sistema fechado, estéril.

[00739] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida, por exemplo, Etapa D de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura

85B), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, como aqui descritas. Em algumas modalidades, um biorreator é empregado. Em algumas modalidades, um biorreator é empregado como o recipiente. Em algumas modalidades, o biorreator empregado é, por exemplo, um G-REX-100 ou um G-REX-500. Em algumas modalidades, o biorreator empregado é um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator empregado é um G-REX-500.

[00740] Em algumas modalidades, a Etapa E de acordo com a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), é realizada de acordo com os processos aqui descritos. Em algumas modalidades, o acesso ao sistema fechado é através de seringas sob condições estéreis a fim de manter a esterilidade e natureza fechada do sistema. Em algumas modalidades, é empregado um sistema fechado como aqui descrito.

[00741] Em algumas modalidades, TILs são coletados de acordo com os métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, TILs são coletados entre 14 e 16 dias pelos métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, TILs são coletados em 14 dias pelos métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, TILs são coletados em 15 dias pelos métodos aqui descritos. Em algumas modalidades, TILs são coletados em 16 dias pelos métodos aqui descritos.

F. Etapa F: Formulação final/ Transferência para bolsa de infusão

[00742] Depois que as Etapas A até E, como disposto em uma ordem exemplar na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) e como delineado detalhadamente acima são completadas, as células são transferidas para um recipiente para uso na administração a um paciente. Em algumas modalidades, uma vez obtidos em número terapeuticamente suficiente pelos métodos de expansão descritos acima, os TILs são transferidos para um recipiente para uso na administração a um paciente.

[00743] Em uma modalidade, TILs expandidos pelos métodos da

presente invenção 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, como descrito acima, podem ser administrados por qualquer via adequada conhecida na técnica. Em algumas modalidades, os TILs são administrados em uma infusão intra-arterial ou intravenosa única, que dura, de preferência, aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[00744] Em uma modalidade, TILs expandidos pelos processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante. Em uma modalidade, TILs expandidos pelos processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante e um agente isotônico. Em uma modalidade, TILs expandidos pelos processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante, compreendendo dimetilsulfóxido, e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio. Em uma modalidade, TILs expandidos pelos processos descritos acima podem ser administrados como composições que compreendem ainda um crioconservante, compreendendo dimetilsulfóxido e dextrano 40, e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio. Em uma modalidade, TILs expandidos pelos processos descritos acima podem ser administrados como composições entregues em bolsa de infusão estéril, em que tais composições compreendem ainda um crioconservante, compreendendo dimetilsulfóxido e dextrano 40, e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio.

G. Razões de PBMP-células alimentadoras

[00745] Em algumas modalidades, o meio de cultura usado nos métodos de expansão aqui descritos (ver, por exemplo, Figura 85 (em

particular, p. ex., Figura 85B)) incluem um anticorpo anti-CD3 p. ex., OKT-3. Um anticorpo anti-CD3 em combinação com IL-2 induz ativação de células T e divisão celular na população de TILs. Esse efeito pode ser visto com anticorpos completos, assim como com fragmentos Fab e F(ab′)2, sendo os primeiros em geral preferidos; ver, p. ex., Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, aqui incorporado, em sua totalidade, por referência.

[00746] Em uma modalidade, o número de camadas de PBMC alimentadoras é calculado como segue:

A. Volume de célula T (10 µm de diâmetro): $V = (4/3)\ \pi r^3 = 523{,}6\ \mu m^3$

B. Coluna de G-Rex 100 (M) com 40 µm (4 células) de altura: $V = (4/3)\ \pi r^3 = 4x10^{12}\ \mu m^3$

C. Número de células necessário para preencher a coluna B: $4x10^{12}\ \mu m^3 / 523{,}6\ \mu m^3 = 7{,}6x10^8\ \mu m^3 * 0{,}64 = 4{,}86x10^8$

D. Número de células que podem ser otimamente ativadas em espaço 4D: $4{,}86x10^8 / 24 = 20{,}25x10^6$

E. Número de alimentadoras e TIL extrapolado para G-Rex 500: TIL: $100x10^6$ e Alimentadora: $2{,}5x10^9$

[00747] Nesse cálculo, usa-se uma aproximação do número de células mononucleares requeridas para fornecer uma geometria de icosaedro para ativação de TIL em um cilindro com uma base de 100 cm^2. O cálculo deriva do resultado experimental de ~$5x10^8$ para o limite de ativação de células T que reflete estreitamente dados experimentais de NCI.(1) (C) O multiplicador (0,64) é a densidade de empacotamento aleatório para esferas equivalentes como calculado por Jaeger e Nagel em 1992 (2). (D) O divisor 24 é o número de esferas equivalentes que poderiam entrar em contato com um objeto semelhante em espaço quadrimensional "o número de Newton"(3).

[00748] (1) Jin, Jianjian, *et. al*., *Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to*

Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283–292.

[00749] (2) Jaeger HM, Nagel SR. *Physics of the granular state*. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31.

[00750] (3) O. R. Musin (2003). "*The problem of the twenty-five spheres*". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

[00751] Em uma modalidade, o número de células alimentadoras apresentadoras de antígeno fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é aproximadamente a metade do número de células alimentadoras apresentadoras de antígeno fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida. Em certas modalidades, o método compreende realizar a primeira expansão de preparação em um meio de cultura celular que compreende aproximadamente 50% menos células apresentadoras de antígeno em comparação ao meio de cultura celular da segunda expansão rápida.

[00752] Em outra modalidade, o número de células alimentadoras apresentadoras de antígeno (APCs) fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é superior ao número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação.

[00753] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionado dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 20:1.

[00754] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 10:1.

[00755] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas

exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 9:1.

[00756] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 8:1.

[00757] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 7:1.

[00758] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 6:1.

[00759] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 5:1.

[00760] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 4:1.

[00761] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 3:1.

[00762] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,9:1.

[00763] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,8:1.

[00764] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,7:1.

[00765] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,6:1.

[00766] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou

próximo a 2,5:1.

[00767] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,4:1.

[00768] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,3:1.

[00769] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,2:1.

[00770] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,1:1.

[00771] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2:1.

[00772] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é

selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 10:1.

[00773] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 5:1.

[00774] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 4:1.

[00775] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 3:1.

[00776] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,9:1.

[00777] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,8:1.

[00778] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs

fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,7:1.

[00779] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,6:1.

[00780] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,5:1.

[00781] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,4:1.

[00782] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,3:1.

[00783] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,2:1.

[00784] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas

exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,1:1.

[00785] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é igual ou próxima a 2:1.

[00786] Em outra modalidade, a razão do número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida para o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é igual ou próxima a 1,1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1, 4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1 ou 5:1.

[00787] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é igual ou próximo a 1×10^8, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, 2×10^8, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, 3×10^8, $3,1 \times 10^8$, $3,2 \times 10^8$, $3,3 \times 10^8$, $3,4 \times 10^8$ ou $3,5 \times 10^8$ APCs, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é igual ou próximo a $3,5 \times 10^8$, $3,6 \times 10^8$, $3,7 \times 10^8$, $3,8 \times 10^8$, $3,9 \times 10^8$, 4×10^8, $4,1 \times 10^8$, $4,2 \times 10^8$, $4,3 \times 10^8$, $4,4 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, $4,6 \times 10^8$, $4,7 \times 10^8$, $4,8 \times 10^8$, $4,9 \times 10^8$, 5×10^8, $5,1 \times 10^8$, $5,2 \times 10^8$, $5,3 \times 10^8$, $5,4 \times 10^8$, $5,5 \times 10^8$, $5,6 \times 10^8$, $5,7 \times 10^8$, $5,8 \times 10^8$, $5,9 \times 10^8$, 6×10^8, $6,1 \times 10^8$, $6,2 \times 10^8$, $6,3 \times 10^8$, $6,4 \times 10^8$, $6,5 \times 10^8$, $6,6 \times 10^8$, $6,7 \times 10^8$, $6,8 \times 10^8$, $6,9 \times 10^8$, 7×10^8, $7,1 \times 10^8$, $7,2 \times 10^8$, $7,3 \times 10^8$, $7,4 \times 10^8$, $7,5 \times 10^8$, $7,6 \times 10^8$, $7,7 \times 10^8$, $7,8 \times 10^8$, $7,9 \times 10^8$, 8×10^8, $8,1 \times 10^8$, $8,2 \times 10^8$, $8,3 \times 10^8$, $8,4 \times 10^8$, $8,5 \times 10^8$, $8,6 \times 10^8$, $8,7 \times 10^8$, $8,8 \times 10^8$,

$8,9 \times 10^8$, 9×10^8, $9,1 \times 10^8$, $9,2 \times 10^8$, $9,3 \times 10^8$, $9,4 \times 10^8$, $9,5 \times 10^8$, $9,6 \times 10^8$, $9,7 \times 10^8$, $9,8 \times 10^8$, $9,9 \times 10^8$ ou 1×10^9 APCs.

[00788] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a $1,5 \times 10^8$ APCs a igual ou próximo a 3×10^8 APCs, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 4×10^8 APCs a igual ou próximo a $7,5 \times 10^8$ APCs.

[00789] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 2×10^8 APCs a igual ou próximo a $2,5 \times 10^8$ APCs, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a $4,5 \times 10^8$ APCs a igual ou próximo a $5,5 \times 10^8$ APCs.

[00790] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de preparação é igual ou próxima a $2,5 \times 10^8$ APCs, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é igual ou próxima a 5×10^8 APCs.

[00791] Em uma modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) adicionadas no dia 0 da primeira expansão de preparação é aproximadamente a metade do número de PBMCs adicionadas no dia 7 da primeira expansão de preparação (p. ex., dia 7 do método).Em certas modalidades, o método compreende adicionar células apresentadoras de antígeno no dia 0 da primeira expansão de preparação à primeira população de TILs e adicionar células apresentadoras de antígeno no dia 7 à segunda população de TILs, em que o número de células apresentadoras de antígeno adicionadas no dia 0 é aproximadamente 50% do número de células apresentadoras de antígeno adicionadas no dia 7 da primeira expansão de preparação (p. ex., dia 7 do método).

[00792] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é superior ao número de PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação.

[00793] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 4,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00794] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00795] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3 x 10^6 APCs/cm^2.

[00796] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade igual ou próxima a 2 x 10^6 APCs/cm^2.

[00797] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade igual ou próxima a 1,0 x 10^6, 1,1 x 10^6, 1,2 x 10^6, 1,3 x 10^6, 1,4 x 10^6, 1,5 x 10^6, 1,6 x 10^6, 1,7 x 10^6, 1,8 x 10^6, 1,9 x 10^6, 2 x 10^6, 2,1 x 10^6, 2,2 x 10^6, 2,3 x 10^6, 2,4 x 10^6, 2,5 x 10^6, 2,6 x 10^6, 2,7 x 10^6, 2,8 x 10^6, 2,9 x 10^6, 3 x 10^6, 3,1 x 10^6, 3,2 x 10^6, 3,3 x 10^6, 3,4 x 10^6, 3,5 x 10^6, 3,6 x 10^6, 3,7 x 10^6, 3,8 x 10^6, 3,9 x 10^6, 4 x 10^6, 4,1 x 10^6, 4,2 x 10^6, 4,3 x 10^6, 4,4 x 10^6 ou 4,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00798] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade

selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 7,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00799] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2 a aproximadamente 6,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[00800] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 4,0 x 10^6 APCs/cm^2 a aproximadamente 5,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00801] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 4,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[00802] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade igual ou próxima a 2,5 x 10^6 APCs/cm^2, 2,6 x 10^6 APCs/cm^2, 2,7 x 10^6 APCs/cm^2, 2,8 x 10^6, 2,9 x 10^6, 3 x 10^6, 3,1 x 10^6, 3,2 x 10^6, 3,3 x 10^6, 3,4 x 10^6, 3,5 x 10^6, 3,6 x 10^6, 3,7 x 10^6, 3,8 x 10^6, 3,9 x 10^6, 4 x 10^6, 4,1 x 10^6, 4,2 x 10^6, 4,3 x 10^6, 4,4 x 10^6, 4,5 x 10^6, 4,6 x 10^6, 4,7 x 10^6, 4,8 x 10^6, 4,9 x 10^6, 5 x 10^6, 5,1 x 10^6, 5,2 x 10^6, 5,3 x 10^6, 5,4 x 10^6, 5,5 x 10^6, 5,6 x 10^6, 5,7 x 10^6, 5,8 x 10^6, 5,9 x 10^6, 6 x 10^6, 6,1 x 10^6, 6,2 x 10^6, 6,3 x 10^6, 6,4 x 10^6, 6,5 x 10^6, 6,6 x 10^6, 6,7 x 10^6, 6,8 x 10^6, 6,9 x 10^6, 7 x 10^6, 7,1 x 10^6, 7,2 x 10^6, 7,3 x 10^6, 7,4 x 10^6 ou 7,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00803] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade igual ou próxima a 1,0 x 10^6, 1,1 x 10^6, 1,2 x 10^6, 1,3 x 10^6, 1,4 x 10^6, 1,5 x 10^6, 1,6 x 10^6, 1,7 x 10^6, 1,8 x 10^6, 1,9 x 10^6, 2 x 10^6, 2,1 x 10^6, 2,2 x 10^6, 2,3 x 10^6, 2,4 x 10^6, 2,5 x 10^6, 2,6 x 10^6, 2,7 x 10^6, 2,8 x 10^6, 2,9 x 10^6, 3 x 10^6, 3,1 x 10^6, 3,2 x 10^6, 3,3 x 10^6, 3,4 x 10^6, 3,5 x 10^6, 3,6 x 10^6, 3,7 x

10^6, 3,8 x 10^6, 3,9 x 10^6, 4 x 10^6, 4,1 x 10^6, 4,2 x 10^6, 4,3 x 10^6, 4,4 x 10^6 ou 4,5 x 10^6 APCs/cm^2 e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade igual ou próxima a 2,5 x 10^6 APCs/cm^2, 2,6 x 10^6 APCs/cm^2, 2,7 x 10^6 APCs/cm^2, 2,8 x 10^6, 2,9 x 10^6, 3 x 10^6, 3,1 x 10^6, 3,2 x 10^6, 3,3 x 10^6, 3,4 x 10^6, 3,5 x 10^6, 3,6 x 10^6, 3,7 x 10^6, 3,8 x 10^6, 3,9 x 10^6, 4 x 10^6, 4,1 x 10^6, 4,2 x 10^6, 4,3 x 10^6, 4,4 x 10^6, 4,5 x 10^6, 4,6 x 10^6, 4,7 x 10^6, 4,8 x 10^6, 4,9 x 10^6, 5 x 10^6, 5,1 x 10^6, 5,2 x 10^6, 5,3 x 10^6, 5,4 x 10^6, 5,5 x 10^6, 5,6 x 10^6, 5,7 x 10^6, 5,8 x 10^6, 5,9 x 10^6, 6 x 10^6, 6,1 x 10^6, 6,2 x 10^6, 6,3 x 10^6, 6,4 x 10^6, 6,5 x 10^6, 6,6 x 10^6, 6,7 x 10^6, 6,8 x 10^6, 6,9 x 10^6, 7 x 10^6, 7,1 x 10^6, 7,2 x 10^6, 7,3 x 10^6, 7,4 x 10^6 ou 7,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00804] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 4,5 x 10^6 APCs/cm^2, e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 7,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00805] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2, e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 6 x 10^6 APCs/cm^2.

[00806] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3 x 10^6 APCs/cm^2, e as APCs fornecidas

exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 4 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 5,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[00807] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de preparação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade igual ou próxima a 2 x 10^6 APCs/cm^2 e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade igual ou próxima a 4 x 10^6 APCs/cm^2.

[00808] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 20:1.

[00809] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 10:1.

[00810] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 9:1.

[00811] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 8:1.

[00812] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 7:1.

[00813] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 6:1.

[00814] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 5:1.

[00815] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 4:1.

[00816] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou

próximo a 3:1.

[00817] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,9:1.

[00818] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,8:1.

[00819] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,7:1.

[00820] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,6:1.

[00821] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é

selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,5:1.

[00822] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,4:1.

[00823] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,3:1.

[00824] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,2:1.

[00825] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,1:1.

[00826] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs)

fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2:1.

[00827] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 10:1.

[00828] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 5:1.

[00829] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 4:1.

[00830] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 3:1.

[00831] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda

expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,9:1.

[00832] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,8:1.

[00833] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,7:1.

[00834] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,6:1.

[00835] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,5:1.

[00836] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo,

por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,4:1.

[00837] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,3:1.

[00838] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,2:1.

[00839] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,1:1.

[00840] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é igual ou próxima a 2:1.

[00841] Em outra modalidade, a razão do número de APCs (incluindo,

por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida para o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é igual ou próxima a 1,1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1, 4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1 ou 5:1.

[00842] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é igual ou próximo a 1 x 10^8, 1,1 x 10^8, 1,2 x 10^8, 1,3 x 10^8, 1,4 x 10^8, 1,5 x 10^8, 1,6 x 10^8, 1,7 x 10^8, 1,8 x 10^8, 1,9 x 10^8, 2 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3 x 10^8, 3,1 x 10^8, 3,2 x 10^8, 3,3 x 10^8, 3,4 x 10^8 ou 3,5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é igual ou próximo a 3,5 x 10^8, 3,6 x 10^8, 3,7 x 10^8, 3,8 x 10^8, 3,9 x 10^8, 4 x 10^8, 4,1 x 10^8, 4,2 x 10^8, 4,3 x 10^8, 4,4 x 10^8, 4,5 x 10^8, 4,6 x 10^8, 4,7 x 10^8, 4,8 x 10^8, 4,9 x 10^8, 5 x 10^8, 5,1 x 10^8, 5,2 x 10^8, 5,3 x 10^8, 5,4 x 10^8, 5,5 x 10^8, 5,6 x 10^8, 5,7 x 10^8, 5,8 x 10^8, 5,9 x 10^8, 6 x 10^8, 6,1 x 10^8, 6,2 x 10^8, 6,3 x 10^8, 6,4 x 10^8, 6,5 x 10^8, 6,6 x 10^8, 6,7 x 10^8, 6,8 x 10^8, 6,9 x 10^8, 7 x 10^8, 7,1 x 10^8, 7,2 x 10^8, 7,3 x 10^8, 7,4 x 10^8, 7,5 x 10^8, 7,6 x 10^8, 7,7 x 10^8, 7,8 x 10^8, 7,9 x 10^8, 8 x 10^8, 8,1 x 10^8, 8,2 x 10^8, 8,3 x 10^8, 8,4 x 10^8, 8,5 x 10^8, 8,6 x 10^8, 8,7 x 10^8, 8,8 x 10^8, 8,9 x 10^8, 9 x 10^8, 9,1 x 10^8, 9,2 x 10^8, 9,3 x 10^8, 9,4 x 10^8, 9,5 x 10^8, 9,6 x 10^8, 9,7 x 10^8, 9,8 x 10^8, 9,9 x 10^8 ou 1 x 10^9 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00843] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 1 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a igual ou próximo a 3,5 x 10^8 APCs

(incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 3,5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a igual ou próximo a 1 x 10^9 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00844] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 1,5 x 10^8 APCs a igual ou próximo a 3 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 4 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a igual ou próximo a 7,5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00845] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 2 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a igual ou próximo a 2,5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 4,5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a igual ou próximo a 5,5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00846] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação é igual ou próximo a 2,5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é igual ou próximo a 5 x 10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00847] Em uma modalidade, o número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) adicionadas no dia 0 da primeira expansão de preparação é aproximadamente a metade do número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) adicionadas no dia 7 da segunda expansão rápida. Em certas modalidades, o método compreende adicionar camadas de células apresentadoras de antígeno no dia 0 da primeira expansão de preparação à primeira população de TILs e adicionar camadas de células apresentadoras de antígeno no dia 7 à segunda população de TILs, em que o número de camadas de células apresentadoras de antígeno adicionadas no dia 0 é aproximadamente 50% do número de camadas de células apresentadoras de antígeno adicionadas no dia 7.

[00848] Em outra modalidade, o número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é superior ao número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de preparação.

[00849] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual próxima à de 2 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 4 camadas de células.

[00850] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de uma camada de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 3 camadas de células.

[00851] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de

preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 1,5 camada de células a igual ou próxima à de 2,5 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 3 camadas de células.

[00852] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de uma camada de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual próxima à de 2 camadas de células.

[00853] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 1; 1,1; 1,2, 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2; 2,1; 2,2, 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9 ou 3 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 ou 8 camadas de células.

[00854] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 1 camada de células a igual ou próxima à de 2 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 3 camadas de células a igual ou próxima à de 10 camadas de

células.

[00855] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual próxima à de 2 camadas de células a igual ou próxima à de 3 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 4 camadas de células a igual ou próxima à de 8 camadas de células.

[00856] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual próxima à de 2 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 4 camadas de células a igual ou próxima à de 8 camadas de células.

[00857] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima a 1, 2 ou 3 camadas de células e dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média igual ou próxima à de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[00858] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a

um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:10.

[00859] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:8.

[00860] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:7.

[00861] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por

exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:6.

[00862] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:5.

[00863] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo,

por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:4.

[00864] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:3.

[00865] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:2.

[00866] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas

(incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,2 a igual ou próximo a 1:8.

[00867] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,3 a igual ou próximo a 1:7.

[00868] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,4 a igual ou próximo a 1:6.

[00869] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de

preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,5 a igual ou próximo a 1:5.

[00870] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,6 a igual ou próximo a 1:4.

[00871] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por

exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,7 a igual ou próximo a 1:3.5.

[00872] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,8 a igual ou próximo a 1:3.

[00873] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,9 a igual ou próximo a 1:2,5.

[00874] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da

segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é igual ou próxima a 1: 2.

[00875] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de preparação ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma primeira espessura média igual a um primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs dispostas em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma segunda espessura média igual a um segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), em que a razão do primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) para o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é selecionada em ou próxima a 1:1,1; 1:1,2; 1:1,3; 1:1,4; 1:1,5; 1:1,6; 1:1,7; 1:1,8; 1:1,9; 1:2; 1:2,1; 1:2,2; 1:2,3; 1:2,4; 1:2,5; 1:2,6; 1:2,7; 1:2,8; 1:2,9; 1:3; 1:3,1; 1:3,2; 1:3,3; 1:3,4; 1:3,5; 1:3,6; 1:3,7; 1:3,8; 1:3,9; 1:4; 1:4,1; 1:4,2; 1:4,3; 1:4,4; 1:4,5; 1:4,6; 1:4,7; 1:4,8; 1:4,9; 1:5; 1:5,1; 1:5,2; 1:5,3; 1:5,4; 1:5,5; 1:5,6; 1:5,7; 1:5,8; 1:5,9; 1:6; 1:6,1; 1:6,2; 1:6,3; 1:6,4; 1:6,5; 1:6,6; 1:6,7; 1:6,8; 1:6,9; 1:7; 1:7,1; 1:7,2; 1:7,3; 1:7,4; 1:7,5; 1:7,6; 1:7,7; 1:7,8; 1:7,9; 1:8; 1:8,1; 1:8,2; 1:8,3; 1:8,4; 1:8,5; 1:8,6; 1:8,7; 1:8,8; 1:8,9; 1:9; 1:9,1; 1:9,2; 1:9,3; 1:9,4; 1:9,5; 1:9,6; 1:9,7; 1:9,8; 1:9,9 ou 1:10.

V. Componentes opcionais do meio celular

1. Anticorpos anti-CD3

[00876] Em algumas modalidades do Processo 2A, o meio de cultura usado nos métodos de expansão aqui descrito (incluindo aqueles referidos como REP, ver, por exemplo, Figura 1) também inclui um anticorpo anti-

CD3. Um anticorpo anti-CD3 em combinação com IL-2 induz ativação de células T e divisão celular na população de TILs. Esse efeito pode ser visto com anticorpos completos e com fragmentos Fab e F(ab′)2, sendo os primeiros geralmente preferidos; ver, p. ex., Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, aqui incorporado, em sua totalidade, por referência.

[00877] Tal qual será reconhecido pelos técnicos no assunto, há vários anticorpos anti-CD3 humano adequados que encontram uso na invenção, incluindo anticorpos policlonais e monoclonais anti-CD3 humano de vários mamíferos, incluindo, entre outros, anticorpos murino, humanos, de primatas, ratos e caninos. Em modalidades em particular, o anticorpo OKT3 anti-CD3 é usado (disponibilizado comercialmente pela Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

Tabela 4: Sequências de aminoácidos de muromonabe (anticorpo OKT-3 exemplar)

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

2. Agonistas de 4-1BB (CD137)

[00878] Em uma modalidade, o agonista de TNFRSF é um agonista de 4-1BB (CD137). O agonista de 4-1BB pode ser qualquer molécula de ligação a 4-1BB conhecida na técnica. A molécula de ligação a 4-1BB pode ser um

anticorpo monoclonal ou proteína de fusão capaz de ligar-se ao 4-1BB humano ou de mamíferos. Os agonistas de 4-1BB ou moléculas de ligação a 4-1BB pode compreender uma cadeia pesada de imunoglobulina de qualquer isotipo (p. ex., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (p. ex., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. O agonista de 4-1BB ou molécula de ligação a 4-1BB pode ter ambas, uma cadeia pesada e uma leve. Neste relatório descritivo, o termo molécula de ligação também inclui anticorpos (incluindo anticorpos completos), anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais completos), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (p. ex., anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos e fragmentos de anticorpos, p. ex., fragmentos Fab, fragmentos, F(ab′), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, fragmentos de ligação a epítopo de qualquer um dos acima e formas modificadas de anticorpos, p. ex., moléculas de scFv que se ligam a 4-1BB. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de ligação a antígeno que é um anticorpo inteiramente humano. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de ligação a antígeno que é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, os agonistas de 4-1BB para uso nos métodos e composições presentemente descritos incluem anticorpos anti-4-1BB, anticorpos humanos anti-4-1BB, anticorpos de camundongo anti-4-1BB, anticorpos de mamíferos anti-4-1BB, anticorpos monoclonais anti-4-1BB, anticorpos policlonais anti-4-1BB, anticorpos quiméricos anti-4-1BB, adnectinas anti-4-1BB, anticorpos com domínio anti-4-1BB, fragmentos de cadeia única anti-4-1BB, fragmentos de cadeia pesada anti-4-1BB, fragmentos de cadeia leve anti-4-1BB, proteínas de fusão e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos anti-4-1BB. Anticorpos agonistas anti-4-1BB são conhecidos por induzir respostas imunes fortes. Lee, *et al.*, *PLOS One* **2013**, *8,* e69677. Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal

inteiramente humano ou humanizado agonista anti-4-1BB (ou seja, um anticorpo derivado de uma única linhagem celular). Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), utomilumabe ou urelumabe, ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar dos mesmos. Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é utomilumabe ou urelumabe, ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar dos mesmos.

[00879] Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB ou molécula de ligação a 4-1BB pode também ser uma proteína de fusão. Em uma modalidade preferida, um agonista multimérico de 4-1BB, tal como um agonista trimérico ou hexamérico de 4-1BB (com três ou seis domínios de ligação a ligante), pode induzir um *clustering* (agregação) superior com o receptor (4-1BBL) e formação do complexo de sinalização celular interna quando comparado a um anticorpo monoclonal agonista, que possui tipicamente dois domínios de ligação a ligante. Proteínas de fusão triméricas (trivalentes) ou hexaméricas (hexavalentes) ou maiores compreendendo três domínios de ligação a TNFRSF e IgG1-Fc e opcionalmente ligando ainda duas ou mais dessas proteínas de fusão são descritas, p. ex., em Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* **2013,** *12,* 2735-47.

[00880] Anticorpos e proteínas de fusão agonistas de 4-1BB são conhecidos por induzir respostas imunes fortes. Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão que se liga especificamente a um antígeno de 4-1BB de maneira suficiente para reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão agonista de 4-1BB que anula a toxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), por exemplo, citotoxicidade de células NK. Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão agonista de 4-1BB que anula a fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP). Em algumas

modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão agonista de 4-1BB que anula a toxicidade dependente do complemento (CDC). Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão agonista de 4-1BB que anula a funcionalidade da região Fc.

[00881] Em algumas modalidades, os agonistas de 4-1BB são caracterizados por ligação ao 4-1BB humano (SEQ ID NO:9) com alta afinidade e atividade agonista. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma molécula de ligação que se liga ao 4-1BB humano (SEQ ID NO:9). Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma molécula de ligação que se liga ao 4-1BB murino (SEQ ID NO:10). As sequências de aminoácidos do antígeno de 4-1BB ao qual se liga um agonista de 4-1BB ou molécula de ligação são resumidas na Tabela DD.

Tabela 5. Sequências de aminoácidos de antígenos de 4-1BB

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:9 4-1BB humano, Superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, membro 9 (*Homo sapiens*)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:10 4-1BB murino, Superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, membro 9 (*Mus musculus*)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

[00882] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que se liga ao 4-1BB humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 100 pM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 90 pM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 80 pM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 70 pM, liga-se ao 4-1BB

humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 60 pM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 50 pM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 40 pM ou liga-se ao 4-1BB humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 30 pM.

[00883] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que se liga ao 4-1BB humano ou murino com k_{assoc} próxima a 7,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{assoc} próxima a 7,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{assoc} próxima a 8 x 10^5 l/M·s ou mais rápida, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{assoc} próxima a 8,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{assoc} próxima a 9 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{assoc} próxima a 9,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida ou liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{assoc} próxima a 1 x 10^6 1/M·s ou mais rápida.

[00884] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que se liga ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,1 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta , liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,2 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,3 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,4 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,5 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,6 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta ou liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,7 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,8 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,9 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, ou liga-se ao 4-1BB humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 3 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta.

[00885] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que se liga ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 10 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 9 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 8 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 7 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 6 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 5 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 4 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 3 nM, liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 2 nM, ou liga-se ao 4-1BB humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 1 nM.

[00886] Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é utomilumabe, também conhecido como PF-05082566 ou MOR-7480, ou um fragmento, derivado, variante ou biossimilar do mesmo. Utomilumabe é disponibilizado pela Pfizer, Inc. Utomilumabe é uma imunoglobulina G2-lambda, anti-[TNFRSF9 de *Homo sapiens* (membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), 4-1BB, antígeno ILA de células T, CD137)], anticorpo monoclonal (inteiramente humano) de *Homo sapiens*. As sequências de aminoácidos de utomilumabe são apresentadas na Tabela EE. Utomilumabe compreende sítios de glicosilação em Asn59 e Asn292; pontes dissulfeto intracadeia - cadeia pesada nas posições 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) e 362-420 (C_H3); pontes dissulfeto intracadeia - cadeia leve nas posições 22'-87' (V_H-V_L) e 136'-195' (C_H1-C_L); pontes dissulfeto intercadeia cadeia pesada-cadeia pesada nas posições 218-218, 219-219, 222-222 e 225-225 da isoforma IgG2A, nas posições 218-130, 219-219, 222-222, e 225-225 da isoforma IgG2A/B e nas posições 219-130 (2), 222-222 e 225-225 da isoforma IgG2B; e pontes dissulfeto intercadeia cadeia pesada-cadeia leve nas posições 130-213' da isoforma IgG2A (2), nas

posições 218-213' e 130-213' da isoforma IgG2A/B e nas posições 218-213' da isoforma IgG2B (2). A preparação e propriedades de utomilumabe e suas variantes e fragmentos são descritas nas Patentes U.S. Nos 8 821 867; 8 337 850; e 9 468 678, e Publicação de Pedido de Patente Internacional No WO 2012/032433 A1, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Características pré-clínicas de utomilumabe são descritas em Fisher, *et al.*, *Cancer Immunolog. & Immunother.* **2012,** *61,* 1721-33. Os estudos clínicos atuais de utomilumabe em uma variedade de indicações hematológicas e de tumores sólidos incluem os identificadores NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 e NCT02554812 no U.S. National Institutes of Health, clinicaltrials.gov.

[00887] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende uma cadeia pesada fornecida por SEQ ID NO:11 e uma cadeia leve fornecida por SEQ ID NO:12. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas em SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos Fab, fragmentos únicos da cadeia variável (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende

cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12, respectivamente.

[00888] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou as regiões variáveis (VRs) de utomilumabe. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada (V_H) do agonista de 4-1BB compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:13, e a região variável da cadeia leve (V_L) do agonista de 4-1BB compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:14, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende um anticorpo scFV compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14.

[00889] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 e SEQ ID NO:17, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas, e

os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19e SEQ ID NO:20, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas.

[00890] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista de 4-1BB, aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos tendo como referência utomilumabe. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo contra 4-1BB compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 97% de identidade de sequência, p. ex., 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de um medicamento de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe. Em algumas modalidades, uma ou mais das modificações pós-traducionais são selecionadas dentre uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de 4-1BB autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de 4-1BB é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe. O anticorpo agonista de 4-1BB pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, tal como a agência FDA dos Estados Unidos e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe. Em algumas modalidades, o

biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe.

Tabela 6. Sequências de aminoácidos para anticorpos agonistas de 4-1BB relacionados ao utomilumabe

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:11 cadeia pesada de utomilumabe	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
SEQ ID NO:12 cadeia leve de utomilumabe	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
SEQ ID NO:13 região variável da cadeia pesada for utomilumabe	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:14 região variável da cadeia leve de utomilumabe	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
SEQ ID NO:15 CDR1 da cadeia pesada de utomilumabe	STYWIS 6
SEQ ID NO:16 CDR2 da cadeia pesada de utomilumabe	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
SEQ ID NO:17 CDR3 da cadeia pesada de utomilumabe	RGYGIFDY 8
SEQ ID NO:18 CDR1 da cadeia leve de utomilumabe	SGDNIGDQYA H 11

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:19 CDR2 da cadeia leve de utomilumabe	QDKNRPS 7
SEQ ID NO:20 CDR3 da cadeia leve de utomilumabe	ATYTGFGSLA V 11

[00891] Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é o anticorpo monoclonal urelumabe, também conhecido como BMS-663513 e 20H4.9.h4a, ou um fragmento, derivado, variante ou biossimilar do mesmo. Urelumabe é disponibilizado pela Bristol-Myers Squibb, Inc., e Creative Biolabs, Inc. Urelumabe é uma imunoglobulina G4-kappa, anti-[TNFRSF9 de *Homo sapiens* (membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), 4-1BB, antígeno ILA de células T, CD137)], anticorpo monoclonal (inteiramente humano) de *Homo sapiens*. As sequências de aminoácidos de urelumabe são apresentadas na Tabela EE. Urelumabe compreende sítios de N-glicosilação nas posições 298 (e 298'') ; pontes dissulfeto intracadeia - cadeia pesada nas posições 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 262-322 (C_H2) e 368-426 (C_H3) (e nas posições 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' e 368''-426'') ; pontes dissulfeto intracadeia - cadeia leve nas posições 23'-88' (V_H-V_L) e 136'-196' (C_H1-C_L) (e nas posições 23'''-88''' e 136'''-196''') ; pontes dissulfeto intercadeia cadeia pesada-cadeia pesada nas posições 227-227'' e 230-230'' ; e pontes dissulfeto intercadeia cadeia pesada-cadeia leve em 135-216' e 135''-216'''. A preparação e propriedades de urelumabe e suas variantes e fragmentos são descritas in Patentes U.S. N^{os} 7 288 638 e 8 962 804, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. As características pré-clínicas e clínicas de urelumabe são descritas em Segal, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2016,** disponível em http:/dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272. Os estudos clínicos atuais de urelumabe em uma variedade de indicações hematológicas e de tumores sólidos incluem os identificadores NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 e NCT01471210 do U.S. National Institutes of Health

clinicaltrials.gov.

[00892] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende uma cadeia pesada fornecida por SEQ ID NO:21 e uma cadeia leve fornecida por SEQ ID NO:22. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas em SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:22, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos Fab, fragmentos únicos da cadeia variável (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:22, respectivamente.

[00893] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou as regiões variáveis (VRs) de urelumabe. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada (V_H) do agonista de 4-1BB compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:23, e a região variável da cadeia leve (V_L) do agonista de 4-1BB compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:24, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências

mostradas em SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende um anticorpo scFV compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24.

[00894] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26e SEQ ID NO:27, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29e SEQ ID NO:30, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas.

[00895] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista de 4-1BB, aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos tendo como referência urelumabe. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo contra 4-1BB compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 97% de identidade de sequência, p. ex., 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de um medicamento

de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é urelumabe. Em algumas modalidades, uma ou mais das modificações pós-traducionais são selecionadas dentre uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de 4-1BB autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de 4-1BB é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é urelumabe. O anticorpo agonista de 4-1BB pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, tal como a agência FDA dos Estados Unidos e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é urelumabe. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é urelumabe.

Tabela 7: Sequências de aminoácidos de anticorpos agonistas de 4-1BB relacionados ao urelumabe

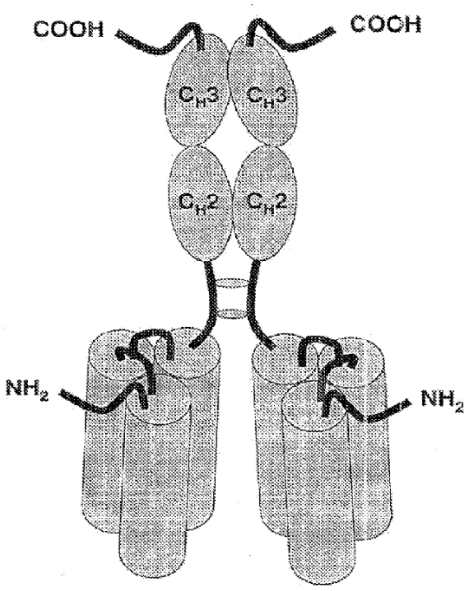
Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:21 cadeia pesada de urelumabe	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO:22 cadeia leve de urelumabe	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO:23 cadeia pesada variável de urelumabe	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 cadeia leve variável de urelumabe	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO:25 CDR1 da cadeia pesada de urelumabe	GYYWS 5
SEQ ID NO:26 CDR2 da cadeia pesada de urelumabe	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO:27 CDR3 da cadeia pesada de urelumabe	DYGPGNYDWY FDL 13
SEQ ID NO:28 CDR1 da cadeia leve de urelumabe	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:29 CDR2 da cadeia leve de urelumabe	DASNRAT 7
SEQ ID NO:30 CDR3 da cadeia leve de urelumabe	QQRSDWPPAL T 11

[00896] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é selecionado dentre o grupo que consiste em 1D8, 3Elor, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), o anticorpo produzido pela linhagem

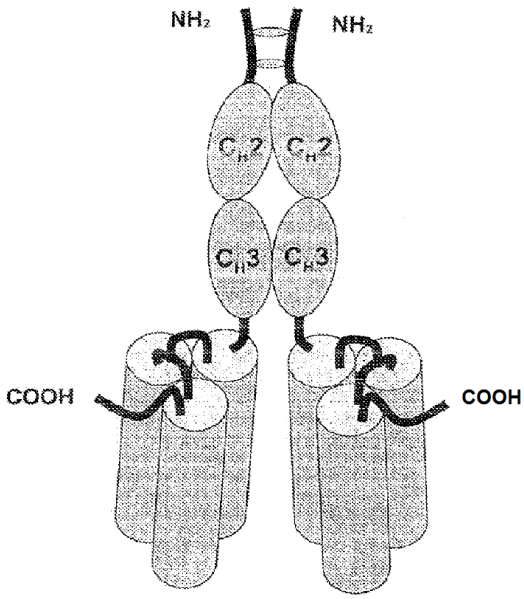
celular depositada como ATCC Nº HB-11248 e descrito na Patente U.S. Nº 6 974 863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), anticorpos descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2005/0095244, anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 7 288 638 (tais como 20H4.9-IgGl (BMS-663031)), anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 887 673 (tais como 4E9 ou BMS-554271), anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 7 214 493, anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 303 121, anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 569 997, anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 905 685 (tais como 4E9 ou BMS-554271), anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 362 325 (tais como 1D8 ou BMS-469492; 3H3 ou BMS-469497; ou 3El), anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 974 863 (tais como 53A2); anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 210 669 (tais como 1D8, 3B8, ou 3El), anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 5 928 893, anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 303 121, anticorpos descritos na Patente U.S. Nº 6 569 997, anticorpos descritos na Publicação do Pedido de Patente Internacional Nºs WO 2012/177788, WO 2015/119923 e WO 2010/042433, e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos, em que o conteúdo de cada uma das patentes ou publicações de pedido de patente anteriores é aqui incorporado por referência.

[00897] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de fusão agonista de 4-1BB descrita na Publicação do Pedido de Patente Internacional Nºs WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1 e WO 2010/078966 A1; Publicação do Pedido de Patente U.S. Nºs US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 e US 2015/0126710 A1; e Patentes U.S. Nºs 9 359 420, 9 340 599, 8 921 519 e 8 450 460, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[00898] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de fusão agonista de 4-1BB como representada na Estrutura I-A (Proteína de fusão com fragmento Fc de anticorpo C-terminal) ou Estrutura I-B (Proteína de fusão com fragmento Fc de anticorpo N-terminal), ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar dos mesmos:



(I-A)



(I-B)

[00899] Nas estruturas I-A e I-B, os cilindros referem-se aos domínios de ligação de polipeptídeos individuais. As Estruturas I-A e I-B compreendem três domínios de ligação ao TNFRSF ligados linearmente, derivados de, p. ex., 4-1BBL ou um anticorpo que se liga a 4-1BB, que se dobram para formar uma proteína trivalente, a qual é então ligada a uma segunda proteína trivalente através de IgG1-Fc (incluindo os domínios C_H3 e C_H2) que é usado para unir duas das proteínas trivalentes através de ligações dissulfeto (pequenos ovais alongados), estabilizando a estrutura e fornecendo um agonista capaz de juntar os domínios de sinalização intracelular dos seis receptores e proteínas de sinalização para formar um complexo de sinalização. Os domínios de ligação ao TNFRSF indicados como cilindros podem ser domínios scFv compreendendo, p. ex., uma cadeia V_H e uma V_L conectadas por um *linker* que pode compreender resíduos hidrofílicos e sequências de Gly e Ser para flexibilidade, bem como Glu e Lys para

solubilidade. Qualquer desenho do domínio scFv pode ser usado, tal como aqueles descritos em de Marco, *Microbial Cell Factories*, **2011,** *10*, 44; Ahmad, *et al.*, *Clin. & Dev. Immunol.* **2012,** 980250; Monnier, *et al.*, *Anticorpos,* **2013,** *2,* 193-208; ou em referências incorporadas em outro lugar no presente. As estruturas de proteínas de fusão dessa forma são descritas in Patentes U.S. N^{os} 9 359 420, 9 340 599, 8 921 519 e 8 450 460, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[00900] Sequências de aminoácidos de domínios para outros polipeptídeos da estrutura I-A são fornecidas na Tabela GG. De preferência, o domínio Fc compreende um domínio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO:31), o domínio *hinge* completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID NO:31) ou uma parte do domínio *hinge* (p. ex., aminoácidos 4-16 de SEQ ID NO:31). Os *linker*s preferidos para conectar um anticorpo-Fc C-terminal Fc pode ser selecionado dentre as modalidades fornecidas em SEQ ID NO:32 a SEQ ID NO:41, incluindo *linker*s adequados para fusão de polipeptídeos adicionais.

Tabela 8: Sequências de aminoácidos para proteínas de fusão de TNFRSF, incluindo proteínas de fusão de 4-1BB com desenho de proteína de fusão com fragmento Fc de anticorpo C-terminal (estrutura I-A).

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:31 Domínio Fc	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO:32 *linker*	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 *linker*	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:34 *linker*	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:35 *linker*	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:36 *linker*	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:37 *linker*	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:38 *linker*	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
SEQ ID NO:39 *linker*	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
SEQ ID NO:40 *linker*	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
SEQ ID NO:41 *linker*	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

[00901] Sequências de aminoácidos de domínios para outros polipeptídeos da estrutura I-B são fornecidas na Tabela 9. Se um fragmento Fc de anticorpo é fundido ao N-terminal de uma proteína de fusão de TNRFSF como na estrutura I-B, a sequência do módulo Fc é, de preferência, aquela mostrada em SEQ ID NO:42, e as sequências de *linker* são preferivelmente selecionadas dentre aquelas modalidades apresentadas em SED ID NO:43 a SEQ ID NO:45.

Tabela 9: Sequências de aminoácidos para proteínas de fusão de TNFRSF, incluindo proteínas de fusão de 4-1BB com desenho de proteína de fusão com fragmento Fc de anticorpo N-terminal (estrutura I-B).

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:42 Domínio Fc	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
SEQ ID NO:43 *linker*	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO:44 *linker*	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO:45 *linker*	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

[00902] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com estruturas as I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB selecionados dentre o grupo que consiste em uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de utomilumabe, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de urelumabe, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de utomilumabe, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável selecionadas dentre as cadeias pesadas

variáveis e cadeias leves variáveis descritas na Tabela GG, qualquer combinação de cadeia pesada variável e cadeia leve variável das anteriores, e fragmentos, derivados, conjugados, variantes e biossimilares das mesmas.

[00903] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB compreendendo uma sequência de 4-1BBL. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO:46. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB compreendendo uma sequência de 4-1BBL solúvel. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO:47.

[00904] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a 4-1BB que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada

uma, pelo menos 95% idênticas às sequências de V_H e V_L fornecidas na Tabela II, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*.

Tabela 10: Domínios polipeptídicos adicionais úteis como domínios de ligação a 4-1BB em proteínas de fusão ou como anticorpos agonistas de scFv 4-1BB

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO:47 Domínio 4-1BBL solúvel	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO:48 cadeia pesada variável de 4B4-1-1 versão 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 cadeia leve variável de 4B4-1-1 versão 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 cadeia pesada variável de 4B4-1-1 versão 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 cadeia leve variável de 4B4-1-1 versão 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:52 cadeia pesada variável de H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO:53 cadeia leve variável de H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[00905] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonista de 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio solúvel de ligação a 4-1BB, (ii) um primeiro *linker* peptídico, (iii) um segundo domínio solúvel de ligação a 4-1BB, (iv) um segundo *linker* peptídico e (v) um terceiro domínio solúvel de ligação a 4-1BB,

compreendendo ainda um domínio adicional na extremidade N-terminal e/ou C-terminal, e em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonista de 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio solúvel de ligação a 4-1BB, (ii) um primeiro *linker* peptídico, (iii) um segundo domínio solúvel de ligação a 4-1BB, (iv) um segundo *linker* peptídico e (v) um terceiro domínio solúvel de ligação a 4-1BB, compreendendo ainda um domínio adicional na extremidade N-terminal e/ou C-terminal, em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc, em que cada um dos domínios solúveis de 4-1BB não contém uma região de haste (*stalk*) (que contribui para trimerização e fornece certa distância até a membrana celular, mas não faz parte do domínio de ligação a 4-1BB) e o primeiro e o segundo *linker* peptídico têm independentemente um comprimento de 3-8 aminoácidos.

[00906] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonista de 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio solúvel de citocina da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), (ii) um primeiro *linker* peptídico, (iii) um segundo domínio solúvel de citocina da superfamília TNF, (iv) um segundo *linker* peptídico e (v) um terceiro domínio solúvel de citocina da superfamília TNF, em que cada uma das citocinas solúveis da superfamília TNF não contém uma região de haste e o primeiro e o segundo *linker* peptídico têm independentemente um comprimento de 3-8 aminoácidos, e em que cada domínio de citocina da superfamília TNF é um domínio de ligação a 4-1BB.

[00907] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um anticorpo scFv agonista de 4-1BB compreendendo qualquer um dos domínios V_H anteriores ligados a qualquer um dos domínios V_L anteriores.

[00908] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é o anticorpo agonista de 4-1BB da BPS Bioscience, nº de catálogo 79097-2,

disponibilizado comercialmente pela BPS Bioscience, San Diego, CA, EUA. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é o anticorpo agonista de 4-1BB da Creative Biolabs, nº de catálogo MOM-18179, disponibilizado comercialmente pela Creative Biolabs, Shirley, NY, EUA.

3. Agonistas de OX40 (CD134)

[00909] Em uma modalidade, o agonista de TNFRSF é um agonista de OX40 (CD134). O agonista de OX40 pode ser qualquer molécula de ligação a OX40 conhecida na técnica. A molécula de ligação a OX40 pode ser um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão capaz de ligar-se ao OX40 humano ou de mamíferos. Os agonistas de OX40 ou moléculas de ligação ao OX40 podem compreender uma cadeia pesada de imunoglobulina de qualquer isotipo (p. ex., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), classe (p. ex., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. O agonista de OX40 ou molécula de ligação a OX40 pode ter ambas, uma cadeia pesada e uma leve. Neste relatório descritivo, o termo molécula de ligação também inclui anticorpos (incluindo anticorpos completos), anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais completos), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (p. ex., anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos e fragmentos de anticorpos, p. ex., fragmentos Fab, fragmentos, F(ab′), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, fragmentos de ligação a epítopo de qualquer um dos acima e formas modificadas de anticorpos, p. ex., moléculas de scFv que se ligam a OX40. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de ligação a antígeno que é um anticorpo inteiramente humano. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de ligação a antígeno que é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, os agonistas de OX40 para uso nos métodos e composições presentemente descritos incluem anticorpos anti-OX40, anticorpos humanos anti-OX40, anticorpos de camundongo anti-OX40, anticorpos de mamíferos anti-OX40,

anticorpos monoclonais anti-OX40, anticorpos, policlonais anti-OX40, anticorpos quiméricos anti-OX40, adnectinas anti-OX40, anticorpos com domínio anti-OX40, fragmentos de cadeia única anti-OX40, fragmentos de cadeia pesada anti-OX40, fragmentos de cadeia leve anti-OX40, proteínas de fusão anti-OX40 e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos. Em uma modalidade preferida, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal inteiramente humano ou humanizado agonista anti-OX40 (ou seja, um anticorpo derivado de uma única linhagem celular).

[00910] Em uma modalidade preferida, o agonista de OX40 ou molécula de ligação a OX40 pode também ser uma proteína de fusão. proteínas de fusão com OX40 compreendendo um domínio Fc fundido a OX40L são descritas, por exemplo, em Sadun, *et al.*, *J. Immunother.* **2009,** *182,* 1481-89. Em uma modalidade preferida, um agonista multimérico de OX40, tal como um agonista trimérico ou hexamérico de OX40 (com três ou seis domínios de ligação a ligante), pode induzir *clustering* superior do receptor (OX40L) e formação do complexo de sinalização celular interna quando comparado a um anticorpo monoclonal agonista, que tipicamente possui dois domínios de ligação a ligante. Proteínas de fusão triméricas (trivalentes) ou hexaméricas (hexavalentes) ou maiores compreendendo três domínios de ligação a TNFRSF e IgG1-Fc e opcionalmente ligando ainda duas ou mais dessas proteínas de fusão são descritas, p. ex., em Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* **2013,** *12,* 2735-47.

[00911] Anticorpos e proteínas de fusão agonistas de OX40 são conhecidos por induzir respostas imunes fortes. Curti, *et al.*, *Cancer Res.* **2013**, *73,* 7189-98. Em uma modalidade preferida, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão que se liga especificamente a um antígeno de OX40 de maneira suficiente para reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal ou

proteína de fusão agonista de OX40 que anula a toxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), por exemplo, citotoxicidade de células NK. Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão agonista de OX40 que anula a fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão agonista de OX40 que anula a toxicidade dependente do complemento (CDC). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão agonista de OX40 que anula a funcionalidade da região Fc.

[00912] Em algumas modalidades, os agonistas de OX40 são caracterizados por ligação ao OX40 humano (SEQ ID NO:54) com alta afinidade e atividade agonista. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma molécula de ligação que se liga ao OX40 humano (SEQ ID NO:54). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma molécula de ligação que se liga ao OX40 murino (SEQ ID NO:55). As sequências de aminoácidos do antígeno de OX40 ao qual se liga o agonista ou molécula de ligação a OX40 são resumidas na Tabela 11.

Tabela 11: Sequências de aminoácidos de antígenos de OX40

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:54 OX40 humano (*Homo sapiens*)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO:55 OX40 murino (*Mus musculus*)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

[00913] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de OX40 que se liga ao OX40

humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 100 pM, liga-se ao OX40 humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 90 pM, liga-se ao OX40 humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 80 pM, liga-se ao OX40 humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 70 pM, liga-se ao OX40 humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 60 pM, liga-se ao OX40 humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 50 pM, liga-se ao OX40 humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 40 pM ou liga-se ao OX40 humano ou murino com K_D próxima ou inferior a 30 pM.

[00914] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de OX40 que se liga ao OX40 humano ou murino com k_{assoc} próxima a 7,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{assoc} próxima a 7,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{assoc} próxima a 8 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{assoc} próxima a 8,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{assoc} próxima a 9 x 10^5 1/M·s ou mais rápida, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{assoc} próxima a 9,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápida ou liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{assoc} próxima a 1 x 10^6 1/M·s ou mais rápida.

[00915] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de OX40 que se liga ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,1 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta , liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,2 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,3 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,4 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,5 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,6 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta ou liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,7 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao OX40

humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,8 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta, liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 2,9 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta ou liga-se ao OX40 humano ou murino com k_{dissoc} próxima a 3 x 10^{-5} 1/s ou mais lenta.

[00916] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de OX40 que se liga ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 10 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 9 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 8 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 7 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 6 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 5 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 4 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 3 nM, liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 2 nM ou liga-se ao OX40 humano ou murino com IC_{50} próxima ou inferior a 1 nM.

[00917] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é tavolixizumabe, também conhecido como MEDI0562 ou MEDI-0562. Tavolixizumabe disponibilizado pela subsidiária MedImmune da AstraZeneca, Inc. Tavolixizumabe é uma imunoglobulina G1-kappa, anticorpo monoclonal humanizado e quimérico anti-[TNFRSF4 de *Homo sapiens* (membro 4 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), OX40, CD134)]. As sequências de aminoácidos de tavolixizumabe são apresentadas na Tabela KK. Tavolixizumabe compreende sítios de N-glicosilação nas posições 301 e 301'', com glicanos fucosilados complexos biantenários do tipo CHO; pontes dissulfeto intracadeia - cadeia pesada nas posições 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 265-325 (C_H2) e 371-429 (C_H3) (e nas posições 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'', e 371''-429''); pontes dissulfeto intracadeia - cadeia leve nas posições 23'-88' (V_H-V_L) e 134'-194'

(C_H1-C_L) (e nas posições 23’’’-88’’’ e 134’’’-194’’’); pontes dissulfeto intercadeia cadeia pesada-cadeia pesada nas posições 230-230’’ e 233-233’’; e pontes dissulfeto intercadeia cadeia pesada-cadeia leve em 224-214’ e 224’’-214’’’. Os estudos clínicas atuais de tavolixizumabe em uma variedade de indicações para tumores sólidos incluem os identificadores NCT02318394 e NCT02705482 do U.S. National Institutes of Health, clinicaltrials.gov.

[00918] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada fornecida por SEQ ID NO:56 e uma cadeia leve fornecida por SEQ ID NO:57. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas em SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:57, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos Fab, fragmentos únicos da cadeia variável (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:57, respectivamente. Em uma modalidade, cadeias pesadas e leves de um agonista de OX40 que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:57, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:57, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:57, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:56 e SEQ ID NO:57, respectivamente.

[00919] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou as regiões variáveis (VRs) de

tavolixizumabe. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada (V_H) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:58, e a região variável da cadeia leve (V_L) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:59, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende um anticorpo scFV compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:59.

[00920] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 e SEQ ID NO:62, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 e SEQ ID NO:65, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas.

[00921] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo

monoclonal biossimilar agonista de OX40, aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos tendo como referência tavolixizumabe. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo contra OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 97% de identidade de sequência, p. ex., 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de um medicamento de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is tavolixizumabe. Em algumas modalidades, uma ou mais das modificações pós-traducionais são selecionadas dentre uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumabe. O anticorpo agonista de OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, tal como a agência FDA dos Estados Unidos e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumabe. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto

biológico de referência é tavolixizumabe.

Tabela 12: Sequências de aminoácidos para anticorpos agonistas de OX40 relacionados ao tavolixizumabe

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:56 cadeia pesada de tavolixizumabe	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:57 cadeia leve de tavolixizumabe	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:58 região variável da cadeia pesada de tavolixizumabe	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO:59 região variável da cadeia leve for tavolixizumabe	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:60 CDR1 da cadeia pesada de tavolixizumabe	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO:61 CDR2 da cadeia pesada de tavolixizumabe	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO:62 CDR3 da cadeia pesada de tavolixizumabe	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 CDR1 da cadeia leve de tavolixizumabe	QDISNYLN 8
SEQ ID NO:64 CDR2 da cadeia leve de tavolixizumabe	LLIYYTSKLH S 11

SEQ ID NO:65 CDR3 da cadeia leve de tavolixizumabe	QQGSALPW 8

[00922] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é 11D4, que é um anticorpo inteiramente humano disponibilizado pela Pfizer, Inc. A preparação e propriedades de 11D4 são descritas nas Patentes U.S. N^{os} 7 960 515; 8 236 930; e 9 028 824, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. As sequências de aminoácidos de 11D4 são apresentadas na Tabela 13.

[00923] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada fornecida por SEQ ID NO:66 e uma cadeia leve fornecida por SEQ ID NO:67. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas em SEQ ID NO:66 e SEQ ID NO:67, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos Fab, fragmentos únicos da cadeia variável (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:66 e SEQ ID NO:67, respectivamente. Em uma modalidade, cadeias pesadas e leves de um agonista de OX40 que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:66 e SEQ ID NO:67, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:66 e SEQ ID NO:67, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:66 e SEQ ID NO:67, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:66 e SEQ ID NO:67, respectivamente.

[00924] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou as regiões variáveis (VRs) de 11D4. Em uma modalidade, o agonista de OX40 região variável da cadeia pesada (V_H) compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:68, e o agonista de OX40 região variável da cadeia leve (V_L) compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:69, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:68 e SEQ ID NO:69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:68 e SEQ ID NO:69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:68 e SEQ ID NO:69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:68 e SEQ ID NO:69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:68 e SEQ ID NO:69, respectivamente.

[00925] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71e SEQ ID NO:72, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74e SEQ ID NO:75, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas.

[00926] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista de OX40, aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos tendo como referência 11D4. Em uma modalidade, o

anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo contra OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 97% de identidade de sequência, p. ex., 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de um medicamento de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is 11D4. Em algumas modalidades, uma ou mais das modificações pós-traducionais são selecionadas dentre uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is 11D4. O anticorpo agonista de OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, tal como a agência FDA dos Estados Unidos e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is 11D4. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is 11D4.

TABLE 13: Sequências de aminoácidos de anticorpos agonistas de OX40

relacionados a 11D4

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:66 cadeia pesada de 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
SEQ ID NO:67 cadeia leve de 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:68 região variável da cadeia pesada for 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:69 região variável da cadeia leve for 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO:70 CDR1 da cadeia pesada de 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO:71 CDR2 da cadeia pesada de 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO:72 CDR3 da cadeia pesada de 11D4	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO:73 CDR1 da cadeia leve de 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO:74 CDR2 da cadeia leve de 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO:75 CDR3 da cadeia leve de 11D4	QQYNSYPPT 9

[00927] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é 18D8, que é um anticorpo inteiramente humano disponibilizado pela Pfizer, Inc. A preparação e propriedades de 18D8 são descritas nas Patentes U.S. N^{os} 7 960 515; 8 236 930; e 9 028 824, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. As sequências de aminoácidos de 18D8 são apresentadas na

Tabela 14.

[00928] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada fornecida por SEQ ID NO:76 e uma cadeia leve fornecida por SEQ ID NO:77. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas em SEQ ID NO:76 e SEQ ID NO:77, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos Fab, fragmentos únicos da cadeia variável (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:76 e SEQ ID NO:77, respectivamente. Em uma modalidade, cadeias pesadas e leves de um agonista de OX40 que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:76 e SEQ ID NO:77, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:76 e SEQ ID NO:77, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:76 e SEQ ID NO:77, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:76 e SEQ ID NO:77, respectivamente.

[00929] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou as regiões variáveis (VRs) de 18D8. Em uma modalidade, o agonista de OX40 região variável da cadeia pesada (V_H) compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:78, e o agonista de OX40 região variável da cadeia leve (V_L) compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:79, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que

são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:78 e SEQ ID NO:79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:78 e SEQ ID NO:79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:78 e SEQ ID NO:79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:78 e SEQ ID NO:79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:78 e SEQ ID NO:79, respectivamente.

[00930] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81e SEQ ID NO:82, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84e SEQ ID NO:85, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas.

[00931] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista de OX40, aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos tendo como referência 18D8. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo contra OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 97% de identidade de sequência, p. ex., 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de um medicamento de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao medicamento de

referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é 18D8. Em algumas modalidades, uma ou mais das modificações pós-traducionais são selecionadas dentre uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is 18D8. O anticorpo agonista de OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, tal como a agência FDA dos Estados Unidos e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é 18D8. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é 18D8.

Tabela 14: Sequências de aminoácidos de anticorpos agonistas de OX40 relacionados a 18D8

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:76 cadeia pesada de 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:77 cadeia leve de 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO:78 região variável da cadeia pesada de 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO:79 região variável da cadeia leve for 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO:80 CDR1 da cadeia pesada de 18D8	DYAMH 5
SEQ ID NO:81 CDR2 da cadeia pesada de 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO:82 CDR3 da cadeia pesada de 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO:83 CDR1 da cadeia leve de 18D8	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:84 CDR2 da cadeia leve de 18D8	DASNRAT 7
SEQ ID NO:85 CDR3 da cadeia leve de 18D8	QQRSNWPT 8

[00932] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é Hu119-122, que é um anticorpo humanizado disponibilizado pela GlaxoSmithKline plc. A preparação e propriedades de Hu119-122 são descritas nas Patentes U.S. Nos 9 006 399 e 9 163 085 e na Publicação de Patente Internacional Nº WO 2012/027328, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. As

sequências de aminoácidos de Hu119-122 são apresentadas na Tabela 15.

[00933] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou as regiões variáveis (VRs) de Hu119-122. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada (V_H) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:86, e a região variável da cadeia leve (V_L) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:87, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:86 e SEQ ID NO:87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:86 e SEQ ID NO:87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:86 e SEQ ID NO:87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:86 e SEQ ID NO:87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:86 e SEQ ID NO:87, respectivamente.

[00934] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 e SEQ ID NO:90, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 e SEQ ID NO:93, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas.

[00935] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo

monoclonal biossimilar agonista de OX40, aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos tendo como referência Hu119-122. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo contra OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 97% de identidade de sequência, p. ex., 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de um medicamento de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. Em algumas modalidades, uma ou mais das modificações pós-traducionais são selecionadas dentre uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que anticorpo agonista de OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is Hu119-122. O anticorpo agonista de OX40pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, tal como a agência FDA dos Estados Unidos e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de

referência é Hu119-122.

Tabela 15: Sequências de aminoácidos de anticorpos agonistas de OX40 relacionados a Hu119-122.

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:86 região variável da cadeia pesada de Hu119-122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:87 região variável da cadeia leve de Hu119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 CDR1 da cadeia pesada de Hu119-122	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 CDR2 da cadeia pesada de Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO:90 CDR3 da cadeia pesada de Hu119-122	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO:91 CDR1 da cadeia leve de Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMH 15
SEQ ID NO:92 CDR2 da cadeia leve de Hu119-122	LASNLES 7
SEQ ID NO:93 CDR3 da cadeia leve de Hu119-122	QHSRELPLT 9

[00936] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é Hu106-222, que é um anticorpo humanizado disponibilizado pela GlaxoSmithKline plc. A preparação e propriedades de Hu106-222 são descritas nas Patentes U.S. Nos 9 006 399 e 9 163 085 e na Publicação de Patente Internacional Nº WO 2012/027328, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. As sequências de aminoácidos de Hu106-222 são apresentadas na Tabela 16.

[00937] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou as regiões variáveis (VRs) de Hu106-222. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada (V_H) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:94, e a região variável da cadeia leve (V_L) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:95, e substituições conservadoras de aminoácidos

das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:94 e SEQ ID NO:95, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:94 e SEQ ID NO:95, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:94 e SEQ ID NO:95, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:94 e SEQ ID NO:95, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:94 e SEQ ID NO:95, respectivamente.

[00938] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97e SEQ ID NO:98, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve tendo as sequências apresentadas em SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100 e SEQ ID NO:101, respectivamente, e substituições conservadoras de aminoácidos das mesmas.

[00939] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista de OX40, aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos tendo como referência Hu106-222. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo contra OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 97% de identidade de sequência, p. ex., 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de um medicamento de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou

mais modificações pós-traducionais quando comparado ao medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. Em algumas modalidades, uma ou mais das modificações pós-traducionais são selecionadas dentre uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência is Hu106-222. O anticorpo agonista de OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, tal como a agência FDA dos Estados Unidos e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda uma ou mais excipientes, em que um ou mais dos excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um medicamento de referência ou produto biológico de referência, em que o medicamento de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222.

Tabela 16: Sequências de aminoácidos de anticorpos agonistas de OX40 relacionados a Hu106-222

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:94 região variável da cadeia pesada de Hu106-222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:95 região variável da cadeia leve de Hu106-222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO:96 CDR1 da cadeia pesada de Hu106-222	DYSMH 5
SEQ ID NO:97 CDR2 da cadeia pesada de Hu106-222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO:98 CDR3 da cadeia pesada de Hu106-222	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO:99 CDR1 da cadeia leve de Hu106-222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:100 CDR2 da cadeia leve de Hu106-222	SASYLYT 7
SEQ ID NO:101 CDR3 da cadeia leve de Hu106-222	QQHYSTPRT 9

[00940] Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 é MEDI6469 (também referido como 9B12). MEDI6469 é um anticorpo monoclonal murino. Weinberg, *et al.*, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575-585. Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo produzido pelo hibridoma 9B12, depositado com a Biovest Inc. (Malvern, MA, EUA), como descrito em Weinberg, *et al.*, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575-585, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende as sequências de CDRs de MEDI6469. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma sequência da região variável da cadeia pesada e/ou uma sequência da região variável da cadeia leve de MEDI6469.

[00941] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é L106 BD (Pharmingen, Produto nº 340420). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende as CDRs do anticorpo L106 (BD Pharmingen, Produto nº 340420). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende uma

sequência da região variável da cadeia pesada e/ou uma sequência da região variável da cadeia leve do anticorpo L106 (BD Pharmingen Produto nº 340420). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo nº 20073). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende as CDRs do anticorpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo nº 20073). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende uma sequência da região variável da cadeia pesada e/ou uma sequência da região variável da cadeia leve do anticorpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo nº 20073). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é o anticorpo monoclonal murino anti-mCD134/mOX40 (clone OX86), disponibilizado comercialmente pela InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH.

[00942] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é selecionado dentre os agonistas de OX40 descritos na Publicação do Pedido de Patente Internacional Nºs WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 e WO 2014/148895; Pedido de Patente Europeia EP 0672141; Publicação de Pedido de Patente U.S. Nºs US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 e US 2015/132288 (incluindo os clones 20E5 e 12H3); e Patentes U.S. Nºs 7 504 101, 7 550 140, 7 622 444, 7 696 175, 7 960 515, 7 961 515, 8 133 983, 9 006 399, e 9 163 085, cujos conteúdos são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência.

[00943] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de fusão agonista de OX40 como representada na Estrutura I-A (Proteína de fusão com fragmento Fc de anticorpo C-terminal) ou Estrutura I-B (Proteína de fusão com fragmento Fc de anticorpo N-terminal), ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar dos mesmos. As propriedades das estruturas I-A e I-B são descritas acima e nas Patentes U.S. Nºs 9,359,420, 9 340 599, 8 921 519 e 8 450 460, cujos conteúdos são aqui incorporados por

referência. As sequências de aminoácidos dos domínios polipeptídicos da estrutura I-A são fornecidas na Tabela GG. De preferência, o domínio Fc compreende um domínio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO:31) o domínio *hinge* completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID NO:31) ou uma parte do domínio *hinge* (p. ex., aminoácidos 4-16 de SEQ ID NO:31). Os *linker*s preferidos para conectar um anticorpo-Fc C-terminal podem ser selecionados dentre as modalidades fornecidas em SEQ ID NO:32 a SEQ ID NO:41, incluindo *linker*s adequados para fusão de polipeptídeos adicionais. Do mesmo modo, as sequências de aminoácidos dos domínios polipeptídicos da estrutura I-B são fornecidas na Tabela 9. Se um fragmento Fc de anticorpo for fundido ao N-terminal de uma proteína de fusão com TNRFSF como na estrutura I-B, a sequência do módulo Fc é preferivelmente aquela mostrada em SEQ ID NO:42, e as sequências do *linker* são selecionadas, de preferência, dentre aquelas modalidades apresentadas em SED ID NO:43 a SEQ ID NO:45.

[00944] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 selecionados dentre o grupo que consiste em uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de tavolixizumabe, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de 11D4, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de 18D8, a cadeia pesada variável e cadeia leve variável de Hu119-122, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de Hu106-222, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável selecionada dentre as cadeias pesadas variáveis e cadeias leves variáveis descritas na Tabela OO, qualquer combinação de cadeia pesada variável e cadeia leve variável das anteriores, e fragmentos, derivados, conjugados, variantes e biossimilares das mesmas.

[00945] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de

ligação a OX40 compreendendo uma sequência de OX40L. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO:102. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 compreendendo uma sequência de OX40L solúvel. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO:103. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO:104.

[00946] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:58 e SEQ ID NO:59, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:68 e SEQ ID NO:69, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:78 e SEQ ID NO:79, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*.

Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:86 e SEQ ID NO:87, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas em SEQ ID NO:94 e SEQ ID NO:95, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação a OX40 que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são, cada uma, pelo menos 95% idênticas às sequências de V_H e V_L fornecidas na Tabela 17, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um *linker*.

Tabela 17: Domínios de polipeptídeos adicionais úteis como domínios de ligação a OX40 em proteínas de fusão (p. ex., estruturas I-A e I-B) ou como anticorpos scFv agonistas de OX40

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 domínio OX40L solúvel	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 domínio OX40L solúvel (alternativo)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 cadeia pesada variável de 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:106 cadeia leve variável de 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 cadeia pesada variável de 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:108 cadeia leve variável de 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 cadeia pesada variável de 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 cadeia leve variável de 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 cadeia pesada variável de 023	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:112 cadeia leve variável de 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 região variável da cadeia pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 região variável da cadeia leve	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 região variável da cadeia pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:116 região variável da cadeia leve	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:117 região variável da cadeia pesada de anticorpo humanizado	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118 região variável da cadeia pesada de anticorpo humanizado	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:119 região variável da cadeia leve de anticorpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107

Identificador	Sequência (Símbolos de uma letra dos aminoácidos)
SEQ ID NO:120 região variável da cadeia leve de anticorpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:121 região variável da cadeia pesada de anticorpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO:122 região variável da cadeia pesada de anticorpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:123 região variável da cadeia leve de anticorpo humanizado	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO:124 região variável da cadeia leve de anticorpo humanizado	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 região variável da cadeia pesada	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:126 região variável da cadeia leve	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[00947] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonista de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação a OX40 solúvel, (ii) um primeiro *linker* peptídico, (iii) um segundo domínio de ligação a OX40 solúvel, (iv) um segundo *linker* peptídico e (v) um terceiro domínio de ligação a OX40 solúvel, compreendendo ainda um domínio adicional na extremidade N-terminal e/ou C-terminal, e em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonista de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação a OX40 solúvel, (ii) um primeiro *linker* peptídico, (iii) um segundo domínio de ligação a OX40 solúvel, (iv) um segundo *linker* peptídico e (v) um terceiro domínio de ligação a OX40 solúvel, compreendendo ainda um domínio

adicional na extremidade N-terminal e/ou C-terminal, em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc, em que cada ligação do OX40 solúvel não contém uma região de haste (que contribui para trimerização e fornece certa distância até a membrana celular, mas não faz parte do domínio de ligação a OX40) e o primeiro e o segundo *linker* peptídico têm independentemente um comprimento de 3-8 aminoácidos.

[00948] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonista de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio solúvel de citocina da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), (ii) um primeiro *linker* peptídico, (iii) um segundo domínio solúvel de citocina da superfamília TNF, (iv) um segundo *linker* peptídico e (v) um terceiro domínio solúvel de citocina da superfamília TNF, em que cada uma das citocinas solúveis da superfamília TNF não contém uma região de haste e o primeiro e o segundo *linker* peptídico têm independentemente um comprimento de 3-8 aminoácidos, e em que o domínio de citocina da superfamília TNF é um domínio de ligação a OX40.

[00949] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é MEDI6383. MEDI6383 é uma proteína de fusão agonista de OX40 e pode ser preparada como descrito na Patente U.S. Nº 6 312 700, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

[00950] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo scFv agonista de OX40 compreendendo qualquer um dos domínios V_H anteriores ligado a qualquer um dos domínios V_L anteriores.

[00951] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é o anticorpo monoclonal agonista de OX40 da Creative Biolabs MOM-18455, disponibilizado comercialmente pela Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, EUA.

[00952] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é o clone Ber-ACT35 de anticorpo agonista de OX40, disponibilizado comercialmente pela

BioLegend, Inc., San Diego, CA, EUA.

VI. Análises opcionais de viabilidade celular

[00953] Opcionalmente, um ensaio de viabilidade celular pode ser realizado depois da Etapa B primeira expansão do Processo 2A (Gen 2) ou de processos Gen 3, por meio de ensaios padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, um ensaio de exclusão do azul de Trypan pode ser realizado em uma amostra dos TILs a granel, o qual marca seletivamente as células mortas e permite avaliar a viabilidade. Outros ensaios para uso em testes da viabilidade podem incluir, entre outros, o ensaio do Alamar; e o ensaio de MTT.

1. Contagens de células, viabilidade, citometria de fluxo

[00954] Em algumas modalidades do Processo 2A (Gen 2) ou Gen 3, medem-se contagens de células e/ou a viabilidade. A expressão de marcadores tais como, entre outros, CD3, CD4, CD8 e CD56, bem como qualquer outro aqui descrito ou descrito, pode ser medida por citometria de fluxo com anticorpos, por exemplo, entre outros, aqueles disponibilizado comercialmente pela BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA) usando um citômetro de fluxo FACSCanto™ (BD Biosciences). As células podem ser contadas manualmente usando um hemocitômetro com c-chip descartável (VWR, Batavia, IL), e a viabilidade pode ser avaliada por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, entre outros, coloração com Trypan blue. Em algumas modalidades do Processo 2A (Gen 2) e/ou Gen 3, os TILs exibem um aumento nas células CD8+ depois da primeira expansão, da segunda expansão, da primeira expansão de preparação ou da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades do Processo 2A (Gen 2), os TILs exibem um aumento nas células CD8+ depois da primeira expansão e/ou da segunda expansão. Em algumas modalidades de Gen 3, os TILs exibem um aumento nas células CD8+ depois da primeira expansão de preparação ou da segunda expansão rápida.

[00955] Em alguns casos, a população de TIL a granel pode ser crioconservada imediatamente, usando os protocolos discutidos abaixo. Alternativamente, a população de TIL a granel pode ser submetida a REP e então crioconservada como discutido abaixo. Do mesmo modo, caso os TILs geneticamente modificados venham a ser usados em terapia, as populações de TIL a granel ou REP podem ser submetidas a modificações genéticas por tratamentos adequados.

2. Culturas celulares

[00956] Em uma modalidade, um método para a expansão de TILs pode incluir usar entre aproximadamente 5.000 mL e 25.000 mL de meio celular, entre aproximadamente 5.000 mL e 10.000 mL de meio celular ou entre aproximadamente 5.800 mL e 8.700 mL de meio celular. Em uma modalidade, a expansão do número de TILs não usa mais do que um tipo de meio de cultura celular. Qualquer meio de cultura celular adequado pode ser utilizado, p. ex., meio de cultura celular AIM-V (L-glutamina, sulfato de estreptomicina 50 μM e sulfato de gentamicina 10 μM) (Invitrogen, Carlsbad CA). A esse respeito, os métodos da invenção reduzem vantajosamente a quantidade de meio e o número de tipos de meio requeridos para expandir o número de TIL. Em uma modalidade, a expansão do número de TIL pode compreender adicionar meio de cultura celular fresco às células (também referido como alimentar as células) não mais frequentemente do que a cada três ou quatro dias. A expansão do número de células em um recipiente permeável a gases simplifica os procedimentos necessários para expandir o número de células reduzindo a frequência de alimentação necessária para expandir as células.

[00957] Em uma modalidade, o meio celular no primeiro e/ou segundo recipiente permeáveis a gases não é filtrado. O uso de meio celular não filtrado pode simplificar os procedimentos necessários para expandir o número de células. Em uma modalidade, o meio celular no primeiro e/ou

segundo recipiente permeáveis a gases não contém beta-mercaptoetanol (BME).

[00958] Em uma modalidade, os TILs são expandidos em recipientes permeáveis a gases. Recipientes permeáveis a gases têm sido usados para expandir TILs usando PBMCs por métodos, composições e dispositivos conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2005/0106717 A1, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Em uma modalidade, os TILs são expandidos em bolsas permeáveis a gases. Em uma modalidade, os TILs são expandidos usando um sistema de expansão celular que expande TILs em bolsas permeáveis a gases, tal como o Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). Em uma modalidade, os TILs são expandidos usando um sistema de expansão celular que expande TILs em bolsas permeáveis a gases, tal como o WAVE Bioreactor System, também conhecido como o Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). Em uma modalidade, o sistema de expansão celular inclui uma bolsa para células permeável a gases com um volume selecionado dentre o grupo que consiste em aproximadamente 100 mL, aproximadamente 200 mL, aproximadamente 300 mL, aproximadamente 400 mL, aproximadamente 500 mL, aproximadamente 600 mL, aproximadamente 700 mL, aproximadamente 800 mL, aproximadamente 900 mL, aproximadamente 1 L, aproximadamente 2 L, aproximadamente 3 L, aproximadamente 4 L, aproximadamente 5 L, aproximadamente 6 L, aproximadamente 7 L, aproximadamente 8 L, aproximadamente 9 L e aproximadamente 10 L. Em uma modalidade, os TILs podem ser expandidos em frascos G-Rex (disponibilizados comercialmente pela Wilson Wolf Manufacturing). Tais modalidades permitem a expansão de populações celulares desde aproximadamente 5 x 10^5 células/cm^2 a entre 10 x 10^6 e 30 x 10^6 células/cm^2. Em uma modalidade, essa expansão é conduzida sem adicionar meio de cultura celular fresco às células (também referido como alimentar as células).

Em uma modalidade, esta é sem alimentação desde que o meio esteja a uma altura próxima de 10 cm no frasco GRex. Em uma modalidade, esta é sem alimentação, mas com a adição de uma ou mais citocinas. Em uma modalidade, a citocina pode ser adicionada como um bolus sem qualquer necessidade de misturar a citocina com o meio. Tais recipientes, dispositivos, e métodos são conhecidos na técnica e têm sido usados para expandir TILs, e incluem aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2014/0377739A1, Publicação Internacional Nº WO 2014/210036 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2013/0115617 A1, Publicação Internacional Nº WO 2013/188427 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. No US 2011/0136228 A1, Patente U.S. Nº US 8,809,050 B2, Publicação Internacional Nº WO 2011/072088 A2, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2016/0208216 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2012/0244133 A1, Publicação Internacional Nº WO 2012/129201 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2013/0102075 A1, Patente U.S. Nº US 8 956 860 B2, Publicação Internacional Nº WO 2013/173835 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2015/0175966 A1, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Tais processos são também descritos em Jin *et al.*, *J. Immunotherapy,* **2012**, 35:283-292.

VII. Saúde metabólica de TILs expandidos

[00959] A capacidade respiratória de reserva (SRC) e a reserva glicolítica podem ser avaliadas de TILs expandidos com os métodos aqui descritos. O teste Seahorse XF Cell Mito Stress mede a função mitocondrial pela taxa de consumo de oxigênio (OCR) das células, medida diretamente com moduladores de respiração que visam componentes da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. Os compostos em teste (oligomicina, FCCP e uma mistura de rotenona e antimicina A, descrita abaixo) são injetados em série para medir a produção de ATP, respiração máxima e respiração não mitocondrial, respectivamente. O vazamento de prótons e a

capacidade respiratória de reserva são então calculados usando esses parâmetros e a respiração basal. Cada modulador visa um componente específico da cadeia de transporte de elétrons. A oligomicina inibe ATP sintase (complexo V), e a diminuição na OCR após injeção de oligomicina correlaciona-se com a respiração mitocondrial associada com a produção de ATP celular. Carbonilcianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP) é um agente de desacoplamento que colapsa o gradiente de prótons e perturba o potencial de membrana de mitocôndrias. Como resultado, o fluxo de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons é desinibido e o oxigênio é consumido ao máximo pelo complexo IV. A RCO estimulada por FCCP-pode então ser usada para calcular a capacidade respiratória de reserva, definida como a diferença entre respiração máxima e respiração basal. A capacidade respiratória de reserva (SRC) é medida da capacidade com que a célula responde à demanda aumentada de energia. A terceira injeção é uma mistura de rotenona, um inibidor do complexo I, e antimicina A, um inibidor do complexo III. Essa combinação interrompe a respiração mitocondrial e permite o cálculo da respiração não mitocondrial por processos fora da mitocôndria.

[00960] Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é a respiração basal.

[00961] Em geral, TILs apresentam uma taxa de respiração basal que é pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 50% e 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 60% e 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em

algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 70% e 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 80% e 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 90% e 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 95% e 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, os TILs apresentam uma taxa de respiração basal que não é estatística e significativamente diferente da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados.

[00962] Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é capacidade respiratória de reserva.

[00963] Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é reserva glicolítica. Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é capacidade respiratória de reserva. Para medir o metabolismo celular (respiratório), as células foram tratadas com inibidores de respiração mitocondrial e glicólise para determinar um perfil metabólico do TIL que consistia nas seguintes medidas: fosforilação oxidativa basal (conforme medida por OCR), capacidade respiratória de reserva, atividade glicolítica basal (conforme medida por ECAR) e reserva glicolítica. Os perfis metabólicos foram realizados utilizando o ensaio Seahorse Combination Mitochondrial/Glycolysis Stress Test Assay (incluindo o kit disponibilizado comercialmente pela Agilent®), que permite determinar a capacidade com que as células realizam glicólise quando do bloqueio da produção de ATP mitocondrial. Em algumas modalidades, as células são privadas de glicose, então injeta-se glicose, seguida por um agente de estresse. Em algumas modalidades, o agente de estresse é selecionado dentre o grupo que consiste em oligomicina, FCCP, rotenona, antimicina A e/ou 2-desoxiglicose (2-DG),

bem como combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, oligomicina é adicionada a 10 mM. Em algumas modalidades, FCCP é adicionado a 10 mM. Em algumas modalidades, rotenona é adicionada a 2,5 mM. Em algumas modalidades, antimicina A é adicionada a 2,5 mM. Em algumas modalidades, 2-desoxiglicose (2-DG) é adicionada a 500 mM. Em algumas modalidades, capacidade glicolítica, reserva glicolítica e/ou acidificação não glicolítica são medidas. Em geral, TILs têm uma reserva glicolítica que é pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98%,ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 50% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 60% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 70% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 80% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 90% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 95% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados.

[00964] Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é glicólise basal. Em alguns, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal de pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos seis vezes, pelo menos 7

vezes, pelo menos oito vezes, pelo menos nove vezes, ou pelo menos dez vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e dez vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e oito vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente três vezes e sete vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e quatro vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e três vezes.

[00965] Em geral, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) têm uma capacidade respiratória de reserva que é pelo menos is pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade

respiratória de reserva é entre aproximadamente 50% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 50% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 60% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 70% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 80% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 90% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 95% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) têm uma capacidade respiratória de reserva que não é estatística e significativamente diferente da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados.

VIII. Caracterização funcional de TILs

[00966] Produção de Granzima B: Granzima B é outra medida da capacidade de TIL para eliminar células alvo. Sobrenadantes do meio, reestimulados como descrito acima com anticorpos contra CD3, CD28 e CD137/4-1BB, tiveram também seus níveis de Granzima B avaliados utilizando o kit Human Granzyme B DuoSet ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7,

incluindo TILs referidos como TILs reREP) aumentaram a produção de Granzima B. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) aumentaram a atividade citotóxica.

[00967] Em algumas modalidades, o comprimento dos telômeros pode ser usado como uma medida de viabilidade celular e/ou função celular. Medição do comprimento dos telômeros: Diversos métodos têm sido utilizados para medir o comprimento de telômeros em preparados de DNA genômico e citológicos. A análise de fragmentos de restrição terminal (TRF) é o padrão ouro para medir o comprimento dos telômeros (de Lange *et al.*, 1990). No entanto, a principal limitação da análise de TRF é a necessidade de uma quantidade grande de DNA (1.5 μg). Duas técnicas amplamente utilizadas para medir o comprimento dos telômeros, a saber, hibridização fluorescente *in situ* (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e PCR quantitativa podem ser empregadas com a presente invenção. Em algumas modalidades, não há alteração no comprimento dos telômeros entre os TILs coletados inicialmente na etapa A e os TILs expandidos de, por exemplo, a Etapa D como disposto na Figura 7.

[00968] Em algumas modalidades, a saúde dos TILs é medida pela secreção de IFN-gama. Em algumas modalidades, emprega-se um ensaio de potência para a produção de IFN-γ. A produção de IFN-γ é outra medida do potencial citotóxico. A produção de IFN-γ pode ser medida determinando os níveis da citocina IFN-γ no meio de TILs estimulados com anticorpos contra CD3, CD28 e CD137/4-1BB. Os níveis de IFN-γ no meio desses TILs estimulados podem ser determinados medindo-se a liberação de IFN-γ. Em algumas modalidades, um aumento na produção de IFN-γ em, por exemplo, TILS da Etapa D como disposto na Figura 7, quando comparados aos TILs coletados inicialmente em, por exemplo, a Etapa A como disposto na Figura 7

é indicativo de um aumento no potencial citotóxico dos TILs da Etapa D.

[00969] Em algumas modalidades, o Ensaio de bioluminescência de lise redirecionada: O potencial citotóxico de TILs para lisar células alvo foi avaliado com um ensaio de cocultura de TILs com a linhagem de células bioluminescentes, P815 (Clone G6), de acordo com um ensaio de bioluminescência de lise redirecionada (ensaio de potência) para análise de TILs que mede a citotoxicidade dos TILs de maneira dose-dependente altamente sensível.

[00970] Em algumas modalidades, os presentes métodos incluem um ensaio para avaliar a viabilidade dos TILs, pelos métodos descritos acima e aqui, incluindo, por exemplo, como descrito nos Exemplos e Figuras. Em algumas modalidades, os TILs são expandidos como discutido acima, incluindo por exemplo, como disposto na Figura 7. Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados antes de serem avaliados quanto à viabilidade. Em algumas modalidades, a avaliação da viabilidade inclui descongelar os TILs antes de realizar uma primeira expansão, uma segunda expansão e uma segunda expansão adicional. Em algumas modalidades, os presentes métodos fornecem um ensaio para avaliar proliferação celular, toxicidade celular, morte celular e/ou outros termos relacionados à viabilidade da população de TILs. A viabilidade pode ser medida por qualquer um dos ensaios metabólicos de TILs descritos acima bem como quaisquer métodos conhecidos para avaliar a viabilidade de células que são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, os presentes métodos fornecem um ensaio para avaliar proliferação celular, toxicidade celular, morte celular e/ou outros termos relacionados à viabilidade dos TILs expandidos pelos métodos aqui descrito, incluindo aqueles exemplificados na Figura 7.

[00971] Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é respiração basal. Em geral, TILs da segunda expansão apresentam uma taxa de respiração basal que é pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%,

pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, the taxa de respiração basal é entre aproximadamente 50% a aproximadamente 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 60% e 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 70% e 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 80% e 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 90% e 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a taxa de respiração basal é entre aproximadamente 95% e 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam uma taxa de respiração basal que não é estatística e significativamente diferente da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7).

[00972] Em geral, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) têm uma capacidade respiratória de reserva que é pelo menos is pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo

menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 50% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 50% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 60% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 70% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 80% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 90% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a capacidade respiratória de reserva é entre aproximadamente 95% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) têm uma capacidade respiratória de reserva que não é estatística e significativamente diferente da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7).

[00973] Em geral, TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) têm uma capacidade respiratória de reserva que é pelo menos is pelo menos 50%, pelo menos 55%,

pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, o ensaio metabólico medido é reserva glicolítica. Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é capacidade respiratória de reserva. Para medira o metabolismo celular (respiratório), as células foram tratadas com inibidores de respiração mitocondrial e glicólise para determinar um perfil metabólico para o TIL que consistia nas seguintes medidas: fosforilação oxidativa basal (conforme medida pela OCR), capacidade respiratória de reserva, atividade glicolítica basal (conforme medida por ECAR) e reserva glicolítica. Os perfis metabólicos foram realizados utilizando o ensaio Seahorse Combination Mitochondrial/Glycolysis Stress Test Assay (incluindo o kit disponibilizado comercialmente pela Agilent®), que permite determinar a capacidade com que as células realizam glicólise quando do bloqueio da produção de ATP mitocondrial. Em algumas modalidades, células são privadas de glicose, então injeta-se glicose, seguida por um agente de estresse. Em algumas modalidades, o agente de estresse é selecionado dentre o grupo que consiste em oligomicina, FCCP, rotenona, antimicina A e/ou 2-desoxiglicose (2-DG), bem como combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, oligomicina é adicionada a 10 mM. Em algumas modalidades, FCCP é adicionado a 10 mM. Em algumas modalidades, rotenona é adicionada a 2,5 mM. Em algumas modalidades, antimicina A é adicionada a 2,5 mM. Em algumas modalidades, 2-desoxiglicose (2-DG) é adicionada a 500 mM. Em algumas modalidades, capacidade glicolítica, reserva glicolítica e/ou acidificação não glicolítica são medidas. Em geral, TILs têm uma reserva glicolítica que é pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo

menos 98% ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 50% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 60% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs recentemente coletados. Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 70% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 80% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 90% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 95% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7).

[00974] Em algumas modalidades, o ensaio metabólico é glicólise basal. Em algumas modalidades, TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal de pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes, pelo menos quatro vezes, pelo menos cinco vezes, pelo menos seis vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos oito vezes, pelo menos nove vezes ou pelo menos dez vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e dez vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs

reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e oito vezes. Em algumas modalidades, TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente três vezes e sete vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e quatro vezes. Em algumas modalidades, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) apresentam um aumento na glicólise basal entre aproximadamente duas vezes e três vezes.

[00975] Em geral, os TILs da segunda expansão ou TILs da segunda expansão adicional (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 7, incluindo TILs referidos como TILs reREP) têm uma reserva glicolítica que é pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%¸ pelo menos 75%, pelo menos 80%¸ pelo menos 85%¸ pelo menos 90%¸ pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% da taxa de respiração basal de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 50% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 60% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 70% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre

aproximadamente 80% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 90% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7). Em algumas modalidades, a reserva glicolítica é entre aproximadamente 95% e 99% da *taxa de respiração basal* de TILs do processo 2A (ver, por exemplo, Figura 7).

[00976] Produção de Granzima B: Granzima B é outra medida da capacidade dos TILs para eliminar células alvo. Sobrenadantes do meio, reestimulados como descrito acima com anticorpos contra CD3, CD28 e CD137/4-1BB, tiveram também seus níveis de Granzima B avaliados utilizando o kit Human Granzyme B DuoSet ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante.

[00977] Em algumas modalidades, os presentes métodos fornecem um ensaio para avaliar a viabilidade dos TILs pelos métodos descritos acima. Em algumas modalidades, os TILs são expandidos como discutido acima, incluindo por exemplo, como disposto na Figura 7. Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados antes de serem avaliados quanto à viabilidade. Em algumas modalidades, a avaliação da viabilidade inclui descongelar os TILs antes de realizar uma primeira expansão, uma segunda expansão e uma segunda expansão adicional. Em algumas modalidades, os presentes métodos fornecem um ensaio para avaliar a proliferação celular, toxicidade celular, morte celular e/ou outros termos relacionados à viabilidade da população de TILs. A viabilidade pode ser medida por qualquer um dos ensaios metabólicos de TILs descritos acima bem como quaisquer métodos conhecidos para avaliar a viabilidade de células que são conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, os presentes métodos fornecem um ensaio para avaliar a proliferação celular, toxicidade celular, morte celular e/ou outros termos relacionados à viabilidade dos TILs expandidos pelos métodos

aqui descrito, incluindo aqueles exemplificados na Figura 7.

[00978] A presente invenção também provê métodos de ensaio para determinar a viabilidade dos TILs. A presente invenção provê métodos para avaliar TILs quanto à viabilidade pela expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população maior de TILs, compreendendo:

(i) obter uma primeira população de TILs que tenha sido expandida anteriormente;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs em aproximadamente 10 dias a 19 dias quando a primeira população de TILs é de uma biópsia por agulha grossa; e

realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número da terceira população de TILs é pelo menos 100 vezes maior do que o da segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 11 dias a aproximadamente 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, e em que a terceira população é analisada ainda quanto à viabilidade. Em algumas modalidades, o método compreende ainda:

(iv) realizar uma segunda expansão adicional, suplementando o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 adicional e APCs adicionais, em que a segunda expansão adicional é

realizada for pelo menos 14 dias para obter uma população de TILs maior do que a obtida na etapa (iii), em que a população maior de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à terceira população de TILs, e em que a terceira população é analisada ainda quanto à viabilidade.

[00979] Em algumas modalidades, antes da etapa (i), as células são crioconservadas.

[00980] Em algumas modalidades, as células são descongeladas antes de realizar a etapa (i).

[00981] Em algumas modalidades, a etapa (iv) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes para análise.

[00982] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 33 dias.

[00983] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 30 dias.

[00984] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 28 dias.

[00985] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de aproximadamente 24 dias.

[00986] Em algumas modalidades, as células das etapas (iii) ou (iv) expressam CD4, CD8 e TCR α β em níveis semelhantes aos de células recentemente coletadas.

[00987] Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[00988] Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 9 ao 17 na etapa (iii).

[00989] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central na população maior de TILs na etapa (iv) exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de

CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras, e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[00990] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[00991] Em algumas modalidades, as APCs são APCs artificiais (aAPCs).

[00992] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa de transdução da primeira população de TILs com um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico que codifica um receptor de células T de alta afinidade.

[00993] Em algumas modalidades, a etapa de transdução ocorre antes da etapa (i).

[00994] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa de transdução da primeira população de TILs com um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) que compreende um anticorpo de fragmento variável de cadeia única fundido com pelo menos um endodomínio de uma molécula de sinalização de células T.

[00995] Em algumas modalidades, a etapa de transdução ocorre antes da etapa (i).

[00996] Em algumas modalidades, os TILs são analisados quanto à viabilidade.

[00997] Em algumas modalidades, os TILs são analisados quanto à viabilidade depois da crioconservação.

[00998] Em algumas modalidades, os TILs são analisados quanto à viabilidade depois da crioconservação e depois da etapa (iv).

[00999] Em algumas modalidades, a presente invenção provê um

método de tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos, compreendendo: (i) obter uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma biópsia por agulha grossa obtida de um tumor em um paciente; (ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs em aproximadamente 10 dias a 19 dias quando primeira população de TILs é de uma biópsia por agulha grossa; (iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 11 dias a aproximadamente 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e (iv) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs ao paciente.

[001000] De acordo com a presente invenção, é provido um método para análise de TILs quanto à viabilidade e/ou uso adicional na administração a um indivíduo. Em algumas modalidades, o método para análise de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) compreende:

(i) obter uma primeira população de TILs;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é

suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs em aproximadamente 10 dias a 19 dias quando a primeira população de TILs é de uma biópsia por agulha grossa; e

(iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 50 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 11 dias a 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs;

(iv) coletar, lavar e crioconservar a terceira população de TILs;

(v) armazenar os TILs crioconservados a uma temperatura criogênica;

(vi) descongelar a terceira população de TILs para fornecer uma terceira população de TILs descongelados; e

(vii) realizar uma segunda expansão adicional de uma parte da terceira população de TILs descongelados, suplementando o meio de cultura celular da terceira população com IL-2, OKT-3 e APCs por um período de reREP de pelo menos 3 dias, em que a terceira expansão é realizada para obter uma quarta população de TILs, em que o número de TILs na quarta população de TILs é compara ao número de TILs na terceira população de TILs para obter uma razão;

(viii) determinar, com base na razão da etapa (vii), se a população de TILs descongelados é adequada para administração a um paciente;

(ix) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da população de TILs descongelados ao paciente quando a razão determinada do

número de TILs na quarta população de TILs para o número de TILs na terceira população de TILs é maior que 5:1 na etapa (viii).

[001001] Em algumas modalidades, o período reREP é realizado até que a razão do número de TILs na quarta população de TILs para o número de TILs na terceira população de TILs seja superior a 50:1.

[001002] Em algumas modalidades, o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[001003] Em algumas modalidades, as etapas (i) a (vii) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 33 dias. Em algumas modalidades, as etapas (i) a (vii) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 30 dias. Em algumas modalidades, as etapas (i) a (vii) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e aproximadamente 28 dias. Em algumas modalidades, as etapas (i) a (vii) são realizadas dentro de aproximadamente 24 dias. Em algumas modalidades, as células das etapas (iii) ou (vii) expressam CD4, CD8 e TCR α β em níveis semelhantes aos de células recentemente coletadas. Em algumas modalidades as células são TILs.

[001004] Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (ii) e/ou qualquer um dos dias 11 ao 14 na etapa (iii).

[001005] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central na população maior de TILs nas etapas (iii) ou (vii) exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de

células.

[001006] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[001007] Em algumas modalidades, as APCs são APCs artificiais (aAPCs).

[001008] Em algumas modalidades, a etapa de transdução da primeira população de TILs com vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico que codifica um receptor de células T de alta afinidade.

[001009] Em algumas modalidades, a etapa de transdução ocorre antes da etapa (i).

[001010] Em algumas modalidades, a etapa de transdução da primeira população de TILs com um vetor de expressão compreendendo um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) que compreende um anticorpo de fragmento variável de cadeia única fundido com pelo menos um endodomínio de uma molécula de sinalização de células T.

[001011] Em algumas modalidades, a etapa de transdução ocorre antes da etapa (i).

[001012] Em algumas modalidades, os TILs são analisados quanto à viabilidade depois da etapa (vii).

[001013] A presente invenção também provê ainda métodos for para análise de TILs. Em algumas modalidades, a invenção provê um método para análise de TILs que compreende:

(i) obter uma parte de uma primeira população de TILs crioconservados obtidos de uma amostra de uma biópsia por agulha grossa;

(ii) descongelar a parte da primeira população de TILs crioconservados;

(iii) realizar uma primeira expansão, cultivando a parte da primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo

IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) por um período de reREP de pelo menos 3 dias, para produzir uma segunda população de TILs, em que a parte da primeira população de TILs é comparada à segunda população de TILs para obter uma razão do número de TILs, em que a razão do número de TILs na segunda população de TILs para o número de TILs na parte da primeira população de TILs é superior a 5:1, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs em aproximadamente 10 dias a 19 dias;

(iv) determinar, com base na razão da etapa (iii) e o número de TILs na etapa (iii), se a primeira população de TILs é adequada para uso na administração terapêutica a um paciente;

(v) determinar que a primeira população de TILs é adequada para uso na administração terapêutica quando a razão determinada do número de TILs na segunda população de TILs para o número de TILs na primeira população de TILs é maior 5:1 na etapa (iv).

[001014] Em algumas modalidades, a razão do número de TILs na segunda população de TILs para o número de TILs na parte da primeira população de TILs é superior a 50:1.

[001015] Em algumas modalidades, o método compreende ainda realizar a expansão da primeira população inteira de TILs crioconservados da etapa (i) de acordo com os métodos descritos em qualquer uma das modalidades aqui providas.

[001016] Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar a primeira população inteira de TILs crioconservados da etapa (i) ao paciente.

IX. Sistemas fechados para produção de TIL

[001017] A presente invenção provê o uso de sistemas fechados durante o processo de cultivo de TIL pelos processos Gen 2 ou processos Gen 3. Tais sistemas fechados permitem prevenir e/ou reduzir a contaminação

microbiana, permite o uso de menos frascos e permitem reduções de custo. Em algumas modalidades, o sistema fechado usa dois recipientes.

[001018] Tais sistemas fechados são bem conhecidos na técnica e podem ser encontrados, por exemplo, em http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm e https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.

[001019] Dispositivos estéreis de conexão (STCDs) produzem soldas estéreis entre dois pedaços de tubos compatíveis. Esse procedimento permite a conexão estéril de uma variedade de recipientes e diâmetros de tubos. Em algumas modalidades, os sistemas fechados incluem trava luer e sistemas termicamente selados. Em algumas modalidades, o acesso ao sistema fechado é através de seringas sob condições estéreis a fim de manter a esterilidade e a natureza fechada do sistema. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado. Em algumas modalidades, os TILs são formulados em um recipiente para formulação do produto final.

[001020] Em algumas modalidades, o sistema fechado usa um recipiente desde o momento em que os fragmentos do tumor são obtidos até que os TILs estejam prontos para administração ao paciente ou para crioconservação. Em algumas modalidades, quando dois recipientes são usados, o primeiro recipiente é um recipiente G fechado e a população de TILs é centrifugada e transferida para uma bolsa de infusão sem abrir o primeiro recipiente G fechado. Em algumas modalidades, quando dois recipientes são usados, a bolsa de infusão é uma bolsa de infusão contendo HyperThermosol. Um sistema fechado ou sistema fechado para cultura de TILs é caracterizado pelo fato de que, uma vez a amostra do tumor ou fragmentos do tumor tenham sido adicionados, o sistema é hermeticamente fechado do meio exterior para formar um ambiente fechado livre da invasão de bactérias, fungos e/ou qualquer outra contaminação microbiana.

[001021] Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 5% e 100%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 5% e 95%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 5% e 90%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 10% e 90%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 15% e 85%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% ou aproximadamente 100%.

[001022] O sistema fechado permite o crescimento de TILs na ausência e/ou com uma redução significativa na contaminação microbiana.

[001023] Além disso, o pH, a pressão parcial de dióxido de carbono e a pressão parcial de oxigênio do ambiente da cultura celular de TILs variam, cada um, à medida que as células são cultivadas. Consequentemente, mesmo que um meio apropriado para cultura celular seja circulado, o ambiente fechado ainda precisa ser constantemente mantido como um ambiente ótimo para proliferação de TILs. Para isso, é desejável que os fatores físicos de pH, pressão parcial de dióxido de carbono e pressão parcial de oxigênio dentro do líquido de cultura do ambiente fechado seja monitorado por um sensor, cujo sinal seja usado para controlar um trocador de gases instalado na entrada do ambiente de cultura, e que a pressão parcial daquele gás do ambiente fechado seja ajustada em tempo real de acordo com mudanças no líquido de cultura a

fim otimizar o ambiente da cultura celular. Em algumas modalidades, a presente invenção provê um sistema fechado de cultura celular que incorpora na entrada para o ambiente fechado um trocador de gases equipado com um dispositivo de monitoramento que mede o pH, a pressão parcial de dióxido de carbono e a pressão parcial de oxigênio do ambiente fechado e otimiza o ambiente da cultura celular ao ajustar automaticamente as concentrações de gases com base em sinais emitidos pelo dispositivo de monitoramento.

[001024] Em algumas modalidades, a pressão dentro do ambiente fechado é controlada de modo contínuo ou intermitente. Ou seja, a pressão no ambiente fechado pode ser variada por meio de um dispositivo para manutenção da pressão, por exemplo, assegurando, assim, que o espaço seja adequado para o crescimento de TILs em um estado de pressão positiva, ou promovendo a exsudação de líquido em um estado de pressão negativa e, assim, promovendo a proliferação celular. Além disso, com a aplicação intermitente de pressão negativa, é possível substituir de modo uniforme e eficiente o líquido circulante no ambiente fechado.

[001025] Em algumas modalidades, componentes da cultura, ótimos para proliferação dos TILs, podem ser substituídos ou adicionados, incluindo fatores tais como IL-2 e/ou OKT3, além de combinações, que podem ser adicionados.

X. Engenharia genética opcional de TILs

[001026] Em algumas modalidades de processos Gen 2 ou Gen 3, os TILs expandidos da presente invenção são manipulados mais antes, durante ou depois de uma etapa de expansão, incluindo durante processos fechados, estéreis de produção, cada um como aqui disposto, visando alterar a expressão proteica de maneira transitória. Em algumas modalidades, a expressão proteica alterada transitoriamente deve-se à edição gênica transitória. Em algumas modalidades, os TILs expandidos da presente invenção são tratados com fatores de transcrição (TFs) e/ou outras moléculas capazes de alterar

transitoriamente a expressão proteica nos TILs. Em algumas modalidades, os TFs e/ou outras moléculas que são capazes de alterar transitoriamente a expressão proteica permitem alterar a expressão de antígenos tumorais e/ou uma alteração no número de células T específicas para antígenos do tumor em uma população de TILs.

[001027] Em certas modalidades, o método compreende editar geneticamente uma população de TILs. Em certas modalidades, o método compreende editar geneticamente a primeira população de TILs, a segunda população de TILs e/ou a terceira população de TILs.

[001028] Em algumas modalidades, a presente invenção inclui a edição genética através da inserção de nucleotídeos, tais como através da inserção de ácido ribonucleico (RNA), incluindo a inserção de RNA mensageiro (mRNA) ou de pequeno (ou curto) RNA interferente (siRNA), em uma população de TILs para promoção da expressão de uma ou mais proteínas ou inibição da expressão de uma ou mais proteínas, bem como combinações simultâneas de promoção de um conjunto de proteínas com inibição de outro conjunto de proteínas.

[001029] Em algumas modalidades, os TILs expandidos da presente invenção sofrem alteração transitória da expressão proteica. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica ocorre em uma população de TIL a granel antes da primeira expansão, incluindo, por exemplo, em uma população de TIL obtidos, por exemplo, na Etapa A como indicado na Figura 85 (especialmente na Figura 85B). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica ocorre durante a primeira expansão, incluindo, por exemplo, na população de TILs expandidos em, por exemplo, a Etapa B como indicado na Figura 85 (por exemplo, Figura 85B). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica ocorre depois da primeira expansão, incluindo, por exemplo, na população de TILs em transição entre a primeira e a segunda expansão (p. ex., a segunda

população de TILs como aqui descrito), uma população de TIL obtidos, por exemplo, na Etapa B e incluídos na etapa C como indicado na Figura 85. Em algumas modalidades, a alteração transitória a expressão proteica ocorre em uma população de TIL a granel antes da segunda expansão, incluindo, por exemplo, em uma população de TIL obtidos, por exemplo, na Etapa C e antes de sua expansão na etapa D como indicado na Figura 85. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica ocorre durante a segunda expansão, incluindo, por exemplo, na população de TILs expandidos em, por exemplo, a Etapa D como indicado na Figura 85 (p. ex., a terceira população de TILs). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica ocorre depois da segunda expansão, incluindo, por exemplo, na população de TILs obtidos pela expansão em, por exemplo, a Etapa D como indicado na Figura 85.

[001030] Em uma modalidade, a método para alterar transitoriamente a expressão proteica em uma população de TILs inclui a etapa de eletroporação. Métodos de eletroporação são conhecidos na técnica e estão descritos, p. ex., em Tsong, *Biophys. J.* **1991,** *60,* 297-306, e na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2014/0227237 A1, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, um método para alterar transitoriamente a expressão proteica na população de TILs inclui a etapa de transfecção com fosfato de cálcio. Métodos de transfecção com fosfato de cálcio (precipitação do DNA com fosfato de cálcio, revestimento da superfície celular e endocitose) são conhecidos na técnica e estão descritos em Graham and van der Eb, *Virology* **1973,** *52,* 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979,** *76,* 1373-1376; e Chen and Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* **1987,** *7,* 2745-2752; e na Patente U.S. Nº 5 593 875, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, um método para alterar transitoriamente a expressão proteica em uma população de TILs inclui a etapa de transfecção com lipossomas. Métodos de transfecção com lipossomas, tais como métodos

que empregam uma formulação de lipossomos 1:1 (p/p) do lipídio catiônico cloreto de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*n*,*n*,*n*-trimetilamônio (DOTMA) e dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE) em água filtrada, são conhecidos na técnica e estão descritos em Rose, *et al.*, *Biotechniques* **1991,** *10,* 520-525 e Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987,** *84,* 7413-7417 e nas Patentes U.S. N^{os} 5 279 833; 5 908 635; 6 056 938; 6 110 490; 6 534 484; e 7 687 070, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, um método para alterar transitoriamente a expressão proteica em uma população de TILs inclui a etapa de transfecção por métodos descritos nas Patentes U.S. N^{os} 5 766 902; 6 025 337; 6 410 517; 6 475 994; e 7 189 705; cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[001031] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em aumento nas células T de memória semelhantes a células-tronco (TSCMs). TSCMs são progenitoras iniciais de células T de memória central com experiência em antígenos. TSCMs geralmente exibem as habilidades de sobrevivência por longo prazo, auto-renovação e multipotência que definem as células-tronco e, em geral, são desejáveis para a geração de produtos eficazes de TILs. TSCM demonstraram atividade antitumoral reforçada em comparação com outros subconjuntos de células T em modelos de transferência celular adotiva em camundongos (Gattinoni *et al*. Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri *et al*. Blood 2013). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em uma população de TILs com uma composição que compreende alta proporção de TSCM. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta in em um aumento de pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos

95% na porcentagem de TSCM. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em um aumento de pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes ou 10 vezes de TSCMs na população de TILs. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em uma população de TILs com pelo menos pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de TSCMs. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em uma população terapêutica de TILs com pelo menos pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de TSCMs.

[001032] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta no rejuvenescimento de células T com experiência em antígenos. Em algumas modalidades, o rejuvenescimento inclui, por exemplo, proliferação aumentada, ativação aumentada de células T e/ou reconhecimento aumentado de antígenos.

[001033] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica altera a expressão em uma grande fração de células T com objetivo de preservar o repertório de TCR derivados do tumor. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica não altera o repertório de TCR derivados do tumor. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica mantém o repertório de TCR derivados do tumor.

[001034] Em algumas modalidades, a alteração transitória da proteína

resulta em expressão alterada de um determinado gene. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica atinge um gene incluindo, entre outros, PD-1 (também referido como PDCD1 ou CC279), TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCRs (receptores co-estimulatórios quiméricos), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGFβ, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 e/ou proteína quinase A (PKA) dependente de cAMP. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica atinge um gene selecionado dentre o grupo que consiste em PD-1, TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCRs (receptores co-estimulatórios quiméricos), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGFβ, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1, e/ou proteína quinase A (PKA) dependente de cAMP. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica atinge PD-1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica atinge TGFBR2. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica atinge CCR4/5. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCRs (receptores co-estimulatórios quiméricos). Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge IL-2. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge IL-12. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge IL-15. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge IL-21. Em algumas modalidades, a alteração transitória de

expressão proteica atinge NOTCH 1/2 ICD. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge TIM3. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge LAG3. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge TIGIT. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge TGFβ. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCR1. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCR2. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCR4. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCR5. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CXCR1. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CXCR2. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CSCR3. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCL2 (MCP-1). Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCL3 (MIP-1α). Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCL4 (MIP1-β). Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCL5 (RANTES). Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CXCL1. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CXCL8. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCL22. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CCL17. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge VHL. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge CD44. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge PIK3CD. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge SOCS1. Em algumas modalidades, a alteração transitória de expressão proteica atinge

proteína quinase A (PKA) dependente de cAMP.

[001035] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou superexpressão de um receptor de quimiocinas. Em algumas modalidades, o receptor de quimiocinas que é superexpresso pela expressão proteica transitória inclui um receptor com um ligante que inclui, entre outros, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22 e/ou CCL17.

[001036] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em uma diminuição e/ou expressão reduzida de PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβR2 e/ou TGFβ (inclusive resultando em bloqueio, por exemplo, da via de TGFβ). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em uma diminuição e/ou expressão reduzida CBLB (CBL-B). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em uma diminuição e/ou expressão reduzida de CISH.

[001037] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de receptores de quimiocinas a fim de, por exemplo, melhorar o tráfego ou movimento de TIL para o sítio tumoral. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de um CCR (receptor co-estimulatório quimérico). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de um receptor de quimiocina selecionado dentre o grupo que consiste em CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 e/ou CSCR3.

[001038] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de uma interleucina. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de uma

interleucina selecionada dentre o grupo que consiste em IL-2, IL-12, IL-15 e/ou IL-21.

[001039] Em algumas modalidades, a alteração transitória of expressão proteica da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de NOTCH 1/2 ICD. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de VHL. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de CD44. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de PIK3CD. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão aumentada e/ou na superexpressão de SOCS1.

[001040] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de proteína quinase A (PKA) dependente de cAMP.

[001041] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de uma molécula selecionada dentre o grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de duas moléculas selecionadas dentre o grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 de uma molécula selecionada dentre o grupo que consiste em LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1, LAG-3,

CISH, CBLB, TIM3 e combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e um dentre LAG3, CISH, CBLB, TIM3, e combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e LAG3. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de LAG3 e CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de LAG3 e CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de CISH e CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e PD-1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e LAG3. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e CBLB.

[001042] Em algumas modalidades, uma molécula de adesão, selecionada dentre o grupo que consiste em CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 e combinações das mesmas, é inserida por um método com retrovírus gama ou lentivírus na primeira população de TILs, na segunda população de TILs ou na população de TILs coletados (p. ex., a expressão da molécula de adesão é aumentada).

[001043] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de uma molécula selecionada dentre o grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas, e em expressão aumentada e/ou melhorada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 e combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de uma molécula selecionada dentre o grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CISH, CBLB e combinações das mesmas, e em expressão aumentada e/ou melhorada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 e combinações das mesmas.

[001044] Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades,

há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 80%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 85%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 90%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 99%.

[001045] Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 80%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 85%, Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 90%. Em algumas modalidades,

há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos aproximadamente 99%.

[001046] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica é induzida pelo tratamento dos TILs com fatores de transcrição (TFs) e/ou outras moléculas capazes de alterar transitoriamente a expressão proteica nos TILs. Em algumas modalidades, a plataforma microfluídica sem vetor SQZ é empregada para entrega intracelular dos fatores de transcrição (TFs) e/ou de outras moléculas capazes de alterar transitoriamente a expressão proteica. Tais métodos, que demonstram a capacidade para entregar proteínas, incluindo fatores de transcrição, a uma variedade de células humanas primárias, incluindo células T (Sharei *et al*. PNAS 2013, além de Sharei *et al.,* PLOS ONE 2015 e Greisbeck *et al.,* J. Immunology, vol. 195, 2015) já foram descritos; ver, por exemplo, Publicações de Patente Internacional WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 e WO 2017/123663A1, todos os quais aqui incorporados, em sua totalidade, por referência. Tais métodos, como descritos nas Publicações de Patente Internacional WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 e WO 2017/123663A1 podem ser empregados com a presente invenção com objetivo de expor uma população de TILs a fatores de transcrição (TFs) e/ou outras moléculas capazes de induzir expressão proteica transitória, em que os ditos TFs e/ou outras moléculas capazes de induzir expressão proteica transitória aumentam a expressão de antígenos tumorais e/ou o número de células T específicas para antígenos do tumor na população de TILs, resultando, assim, na reprogramação da população de TILs e um aumento na eficácia terapêutica da população de TILs reprogramada em comparação a uma população de TILs não reprogramada. Em algumas modalidades, a reprogramação resulta em uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à população inicial ou anterior (ou seja, antes da reprogramação) de TILs, como aqui

descritas.

[001047] Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) inclui, entre outros, TCF-1, NOTCH 1/2 ICD e/ou MYB. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é TCF-1. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é NOTCH 1/2 ICD. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é MYB. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é administrado com uma cultura de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), tais como o KNOCKOUT Serum Replacement (Gibco/ThermoFisher) disponível comercialmente, para induzir reprogramação adicional de TILs. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é administrado com um coquetel de iPSC para induzir reprogramação adicional de TILs. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é administrado sem um coquetel de iPSC. Em algumas modalidades, a reprogramação resulta em aumento na percentagem de TSCMs. Em algumas modalidades, a reprogramação resulta em aumento na percentagem de TSCMs de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95% de TSCMs.

[001048] Em algumas modalidades, um método de alteração transitória da expressão proteica, como descrito acima, pode ser combinado com um método para modificar geneticamente uma população de TILs e inclui a etapa de incorporação estável de genes para produção de uma ou mais proteínas. Em certas modalidades, o método compreende uma etapa de modificação genética de uma população de TILs. Em certas modalidades, o método compreende modificar geneticamente a primeira população de TILs, a

segunda população de TILs e/ou a terceira população de TILs. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução lentiviral. Sistemas de transdução lentiviral são conhecidos na técnica e estão descritos, p. ex., em Levine, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* **2006,** *103,* 17372-77; Zufferey, *et al., Nat. Biotechnol.* **1997,** *15,* 871-75; Dull, *et al.*, *J. Virology* **1998,** *72*, 8463-71 e Patente U.S. Nº 6 627 442, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral gama. Sistemas de transdução retroviral gama são conhecidos na técnica e estão descritos, p. ex., Cepko and Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* **1996,** 9.9.1-9.9.16, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transferência de genes mediada por transposon. Sistemas de transferência de genes mediada por transposon são conhecidos na técnica e incluem sistemas em que a transposase é fornecida como um vetor de expressão de DNA ou um RNA ou uma proteína expressável, tal que a expressão por longo prazo da transposase não ocorra nas células transgênicas, por exemplo, uma transposase fornecida como um mRNA (p. ex., um mRNA compreendendo um cap e uma cauda poli-A). Sistemas adequados para transferência de genes mediada por transposon, incluindo uma transposase Tel-like do tipo salmonídeo (transposase SB ou Sleeping Beauty), tais como SB10, SB11, e SB100x, e enzimas modificadas com atividade enzimática aumentada, são descritas em, p. ex., Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* **2010,** *18,* 674-83 e na Patente U.S. Nº 6 489 458, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[001049] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão proteica é uma redução na expressão induzida por RNA de interferência de

auto-entrega (sdRNA), que é um duplex de siRNA assimétrico sintetizado quimicamente com uma porcentagem alta de substituições 2′-OH (tipicamente flúor ou -OCH_3) e que compreende uma fita *antisense* (guia) com 20 nucleotídeos e uma fita *sense* (passageiro) com 13 a 15 bases conjugada a colesterol em sua extremidade 3′ usando um *linker* tetraetilenoglicol (TEG). Em algumas modalidades, o método compreende a alteração transitória da expressão proteica em uma população de TILs, compreendendo o uso de RNA de interferência de auto-entrega (sdRNA), que é um duplex de siRNA assimétrico sintetizado quimicamente com uma porcentagem alta de substituições 2′-OH (tipicamente flúor ou -OCH_3) e que compreende uma fita *antisense* (guia) com 20 nucleotídeos e uma fita *sense* (passageiro) com 13 a 15 bases conjugada a colesterol em sua extremidade 3′ usando um *linker* tetraetilenoglicol (TEG). Métodos que fazem uso de sdRNA foram descritos em Khvorova and Watts, *Nat. Biotechnol.* **2017,** *35,* 238-248; Byrne, *et al.*, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2013,** *29,* 855-864; e Ligtenberg, *et al.*, *Mol. Therapy,* **2018,** no prelo, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TILs é conseguida sem o uso de eletroporação, SQZ ou outros métodos, usando, em vez disso, um período de 1 toa 3 dias no qual uma população de TILs é exposta ao sdRNA a uma concentração de 1 μM/10.000 TILS no meio. Em certas modalidades, o método compreende a entrega de sdRNA a uma população de TILs, o qual compreende expor a população de TILs ao sdRNA a uma concentração de 1 μM/10.000 TILS no meio por um período entre 1 e 3 dias. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TILs é conseguida em um período de 1 a 3 dias no qual uma população de TILs é exposta ao sdRNA a uma concentração de 10 μM/10.000 TILS no meio. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TILs é conseguida em um período de 1 a 3 dias no qual uma população de TILs é exposta ao sdRNA a uma concentração de 50 μM/10.000 TILS no meio. Em uma

modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TILs é conseguida em um período de 1 a 3 dias no qual uma população de TILs é exposta ao sdRNA a uma concentração de entre 0,1 μM/10.000 TILS e 50 μM/10.000 TILS no meio. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TILs é conseguida em um período de 1 a 3 dias no qual uma população de TILs é exposta ao sdRNA a uma concentração de entre 0,1 μM/10.000 TILS e 50 μM/10.000 TILS no meio, em que a exposição ao sdRNA é realizada duas, três, quatro ou cinco vezes pela adição de sdRNA fresco ao meio. Outros processos adequados são descritos, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº US 2011/0039914 A1, US 2013/0131141 A1, e US 2013/0131142 A1 e Patente U.S. No 9,080,171, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[001050] Em algumas modalidades, o sdRNA é inserido em uma população de TILs durante a produção. Em algumas modalidades, o sdRNA codifica o RNA que interfere com NOTCH 1/2 ICD, PD-1, CTLA-4 TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβ, TGFBR2, proteína quinase A (PKA) dependente de cAMP, BAFF BR3, CISH e/ou CBLB. Em algumas modalidades, a redução na expressão é determinada com base em uma percentagem de silenciamento gênico, por exemplo, como avaliado por citometria de fluxo e/ou qPCR. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, ou

aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 85%, aproximadamente 90% ou aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 80%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 85%, Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 90%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos aproximadamente 99%.

[001051] A tecnologia *self-deliverable RNAi* (auto-entrega), com base na modificação química de siRNAs, pode ser empregada com os métodos da presente invenção para entrega dos sdRNAs com êxito aos TILs como aqui descritos. A combinação de modificações na cadeia principal com estrutura assimétrica do siRNA e um ligante hidrofóbico (ver, por exemplo, Ligtenberg, *et al.*, *Mol. Therapy,* **2018** e US20160304873) permite que os sdRNAs penetrem células cultivadas de mamíferos, sem formulações e métodos adicionais, pela simples adição ao meio de cultura, capitalizando a estabilidade da nuclease de sdRNAs. Essa estabilidade permite o suporte de níveis constantes de redução mediada pelo RNAi da atividade de genes alvo, simplesmente mantendo a concentração ativa de sdRNA no meio. Enquanto sem estar vinculado à teoria, a estabilização da cadeia principal do sdRNA prolonga a redução nos efeitos da expressão gênica que podem durar meses em células que não estão se dividindo.

[001052] Em algumas modalidades, a eficiência na transfecção de TILs

e a redução na expressão de alvo por vários sdRNA específicos ocorre com mais de 95%. Em algumas modalidades, sdRNAs contendo diversos resíduos de ribose não modificados foram substituídos por sequências totalmente modificadas para aumentar a potência e/ou a longevidade do efeito de RNAi. Em algumas modalidades, um efeito de redução na expressão é mantido por 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 8 dias ou mais. Em algumas modalidades, o efeito de redução na expressão diminui em 10 dias ou mais após o tratamento com sdRNA dos TILs. Em algumas modalidades, mais de 70% de redução na expressão da expressão alvo é mantido. Em algumas modalidades, mais de 70% de redução na expressão da expressão alvo é mantido nos TILs. Em algumas modalidades, uma redução na expressão na via PD-1/PD-L1 permite que os TILs exibam um efeito mais potente *in vivo*, o qual se deve, em algumas modalidades, ao fato de serem evitados os efeitos supressivos da via PD-1/PD-L1. Em algumas modalidades, uma redução na expressão de PD-1 por sdRNA resulta em um aumento na proliferação de TILs.

[001053] Pequeno RNA de interferência (siRNA), conhecido, às vezes, como RNA interferente curto ou RNA de silenciamento, é uma molécula de RNA dupla-fita, em geral com 19-25 pares de base de comprimento. siRNA é usado no RNA de interferência (RNAi), que interfere com a expressão de genes específicos com sequências nucleotídicas complementares.

[001054] DNA dupla-fita (dsRNA) pode ser geralmente usado para definir qualquer molécula que compreenda um par de fitas complementares de RNA, geralmente uma fita *sense* (passageiro) e fitas *antisense* (guia), e pode incluir regiões salientes (*overhang*) de fita simples. O termo dsRNA, em contraste com siRNA, em geral refere-se a uma molécula precursora que inclui a sequência de uma molécula de siRNA que é liberada da molécula maior de dsRNA pela ação de sistemas enzimáticos de clivagem, incluindo Dicer.

[001055] sdRNA (RNA de auto-entrega) são uma nova classe de compostos de RNAi modificados covalentemente que não requerem um veículo de entrega para entrar nas células e com farmacologia melhorada em comparação aos siRNAs tradicionais. “RNA de auto-entrega” ou “sdRNA” é um híbrido antisense de RNA interferente modificado hidrofobicamente, demonstrado como altamente eficaz *in vitro* em células primárias e *in vivo* mediante administração local. Absorção e/ou silenciamento robustos sem toxicidade foram demonstrados. sdRNAs são geralmente moléculas de ácido nucleico assimétrico quimicamente modificadas com regiões dupla-fita mínimas. As moléculas de sdRNA contêm tipicamente regiões fita simples e regiões dupla-fita, e podem conter uma variedade de modificações químicas tanto em regiões fita simples como em dupla-fita da molécula. Além disso, as moléculas de sdRNA podem ser anexadas a um conjugado hidrofóbico, tal como uma molécula convencional e avançada do tipo esterol, como aqui descrito. sdRNAs e métodos associados para produção de tais sdRNAs foram também extensamente descritos em, por exemplo, US20160304873, WO2010033246, WO2017070151, WO2009102427, WO2011119887, WO2010033247A2, WO2009045457, WO2011119852, todos os quais aqui incorporados, em sua totalidade, por referência para todos os efeitos. Para otimizar a estrutura, química, posição de direcionamento, preferências em relação à sequência de sdRNA, um algoritmo de propriedade exclusiva foi desenvolvido e utilizado para predição da potência de sdRNA (ver, por exemplo, US 20160304873). Com base nessas análises, sequências funcionais de sdRNA foram em geral definidas como apresentando redução acima de 70% na expressão à concentração de 1 μM, com mais de 40% de probabilidade.

[001056] Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem redução de 70% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem redução de

75% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem redução de 80% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem redução de 85% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem redução de 90% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem redução de 95% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem redução de 99% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração entre aproximadamente 0,25 μM e 4 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 0,25 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 0,5 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 0,75 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 1,0 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração entre aproximadamente 1,25 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 1,5 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 1,75 μM. Em

algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 2,0 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 2,25 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 2,5 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 2,75 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 3,0 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 3,25 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 3,5 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 3,75 μM. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução na expressão do gene alvo quando entregue a uma concentração de aproximadamente 4,0 μM.

[001057] Em algumas modalidades, os agentes oligonucleotídicos compreendem uma ou mais modificação para aumentar a estabilidade e/ou eficácia do agente terapêutico, e para efetuar uma entrega eficiente do oligonucleotídeo às células ou tecido a ser tratado. Tais modificações podem incluir uma modificação 2'-O-metila, uma modificação 2'-O-fluoro, uma modificação difosforotioato, nucleotídeo 2' F-modificado, nucleotídeo 2'-O-

metila e/ou a 2'desoxi. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é modificado para incluir uma ou mais modificações hidrofóbicas incluindo, por exemplo, esterol, colesterol, vitamina D, naftila, isobutila, benzila, indol, triptofano e/ou fenila. Em uma modalidade adicional em particular, nucleotídeos quimicamente modificados são uma combinação de fosforotioatos, 2'-O-metila, 2'deoxi, modificações hidrofóbicas e fosforotioatos. Em algumas modalidades, os açúcares podem ser modificados e os açúcares modificados podem incluir, entre outros, D-ribose, 2'-O-alquila (incluindo 2'-O-metila e 2'-0-etila), ou seja, 2'-alcoxi, 2'-amino, 2'-S-alquila, 2'-halo (incluindo 2'-fluoro), T-metoxietoxi, 2'-aliloxi ($-OCH_2CH=CH_2$), 2'-propargila, 2'-propila, etinila, etenila, propenila e ciano e similares. Em uma modalidade, a porção açúcar pode ser uma hexose e incorporada em um oligonucleotídeo como descrito (Augustyns, K., *et al.*, Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)).

[001058] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo dupla-fita da invenção é dupla-fita em toda sua extensão, ou seja, sem sequência fita simples saliente em qualquer uma das extremidades da molécula, ou seja, é *blunt-ended* (com extremidade cega). Em algumas modalidades, as moléculas individuais de ácido nucleico podem ser de comprimentos diferentes. Em outras palavras, a oligonucleotídeo dupla-fita da invenção não é dupla-fita em toda sua extensão. Por exemplo, quando duas moléculas separadas de ácido nucleico moléculas são usadas, uma das moléculas, p. ex., a primeira molécula compreendendo uma sequência *antisense*, pode ser mais longa do que a segunda molécula que se hibridiza com a mesma (deixando uma parte da molécula com fita simples). Em algumas modalidades, quando uma única molécula de ácido nucleico é usada, uma parte da molécula em qualquer extremidade pode permanecer fita simples.

[001059] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo dupla-fita da invenção contém erros de pareamento (*mismatches*) e/ou alças ou

protuberâncias, mas é dupla-fita em pelo menos aproximadamente 70% do comprimento do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo dupla-fita da invenção é dupla-fita em pelo menos aproximadamente 80% do comprimento do oligonucleotídeo. Em outra modalidade, um oligonucleotídeo dupla-fita da invenção é dupla-fita em pelo menos aproximadamente 90%-95% do comprimento do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo dupla-fita da invenção é dupla-fita em pelo menos aproximadamente 96%-98% do comprimento do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo dupla-fita da invenção contém pelo menos ou até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou 15 erros de pareamento.

[001060] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo pode ser substancialmente protegido de nucleases, p. ex., modificando as ligações 3' ou 5' (p. ex., Patente U.S. Nº 5 849 902 e WO 98/13526). Por exemplo, é possível tornar oligonucleotídeos resistentes pela inclusão de um "grupo bloqueador". O termo "grupo bloqueador", neste relatório descritivo, refere-se a substituintes (p. ex., além de grupos OH) que podem ser anexados aos oligonucleotídeos ou nucleomonômeros, quer como grupos protetores ou grupos de acoplamento para síntese (p. ex., FITC, propila (CH_2-CH_2-CH_3), glicol (-0-CH_2-CH_2-O-), fosfato (PO_3^{2+}), hidrogenofosfonato ou fosforamidita). "Grupos bloqueadores" podem também incluir "grupos bloqueadores finais" ou "grupos bloqueadores de exonucleases" que protegem as terminações 5' e 3' do oligonucleotídeo, incluindo nucleotídeos modificados e estruturas não nucleotídicas resistentes às exonucleases.

[001061] Em algumas modalidades, pelo menos uma parte dos polinucleotídeos contíguos dentro do sdRNA é unida por uma ligação substituta, p. ex., uma ligação fosforotioato.

[001062] Em algumas modalidades, a modificação química pode levar a pelo menos a 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55;

60; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95; 100; 105; 110; 115; 120; 125; 130; 135; 140; 145; 150; 155; 160; 165; 170; 175; 180; 185; 190; 195; 200; 225; 250; 275; 300; 325; 350; 375; 400; 425; 450; 475; 500 melhorias na absorção celular. Em algumas modalidades, pelo menos um dos resíduos C ou U inclui uma modificação hidrofóbica. Em algumas modalidades, uma pluralidade de Cs e Us contêm uma modificação hidrofóbica. Em algumas modalidades, pelo menos 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60% 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou pelo menos 95% dos Cs e Us podem conter uma modificação hidrofóbica. Em algumas modalidades, todos os Cs e Us contêm uma modificação hidrofóbica.

[001063] Em algumas modalidades, o sdRNA ou sd-rxRNAs exibe liberação endossomal melhorada de moléculas de sd-rxRNA através de aminas protonáveis. Em algumas modalidades, aminas protonáveis são incorporadas na fita *sense* (na parte da molécula que é descartada após carregamento do RISC). Em algumas modalidades, os compostos de sdRNA da invenção compreendem um composto assimétrico compreendendo uma região duplex (necessária para entrada eficiente de RISC com 10-15 bases de comprimento) e uma região fita simples com 4-12 nucleotídeos de comprimento; com um duplex de 13 nucleotídeos. Em algumas modalidades, é empregada uma região fita simples com 6 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a região fita simples do sdRNA compreende 2-12 ligações fosforotioato internucleotídicas (referidas como modificações fosforotioato). Em algumas modalidades, são empregadas 6-8 ligações fosforotioato internucleotídicas. Em algumas modalidades, os compostos de sdRNA da invenção também incluem um padrão único de modificações químicas, o qual proporciona estabilidade e é compatível com a entrada do RISC.

[001064] A fita guia, por exemplo, pode também ser modificada por qualquer modificação química que confirme a estabilidade sem interferir com a entrada do RISC. Em algumas modalidades, o padrão de modificações

químicas na fita guia inclui a modificação 2’ F na maioria dos nucleotídeos C e U e fosforilação da extremidade 5’.

[001065] Em algumas modalidades, pelo menos 30% dos nucleotídeos no sdRNA ou sd-rxRNA são modificados. Em algumas modalidades, pelo menos 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% dos nucleotídeos no sdRNA ou sd-rxRNA são modificados. Em algumas modalidades, 100% dos nucleotídeos no sdRNA ou sd-rxRNA são modificados.

[001066] Em algumas modalidades, as moléculas de sdRNA têm regiões mínimas dupla-fita. Em algumas modalidades, a região da molécula que é dupla-fita varia de 8-15 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região da molécula que é dupla-fita tem 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região dupla-fita tem 13 nucleotídeos de comprimento. Pode haver 100% de complementaridade entre as fitas guia e passageiro, ou pode haver um ou mais erros de pareamento entre as fitas guia e passageiro. Em algumas modalidades, em uma extremidade da molécula dupla-fita, a molécula é *blunt-ended* ou possui uma saliência de um nucleotídeo. A região fita simples da molécula tem, em algumas modalidades, entre 4-12 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região fita simples pode ter 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região fita simples pode ter menos de 4 ou mais de 12 nucleotídeos de comprimento. Em certas modalidades, a região fita simples tem 6 ou 7 nucleotídeos de comprimento.

[001067] Em algumas modalidades, as moléculas de sdRNA apresentam

estabilidade aumentada. Em alguns casos, uma molécula de sdRNA ou sd-rxRNA modificada quimicamente tem meia-vida, em média, mais longa do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou mais de 24 horas, incluindo quaisquer valores intermediários. Em algumas modalidades, o sd-rxRNA tem meia-vida, em média, mais longa do que 12 horas.

[001068] Em algumas modalidades, o sdRNA é otimizado para aumentar a potência e/ou reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, o comprimento do nucleotídeo da fita guia e/ou passageiro e/ou o número de modificações fosforotioato na fita guia e/ou passageiro podem, em alguns aspectos, influenciar a potência da molécula de RNA, enquanto substituir modificações 2'-fluoro (2'F) por modificações 2'-0-metila (2'OMe) pode, em alguns aspectos, influenciar a toxicidade da molécula. Em algumas modalidades, prevê-se que a redução no teor de 2'F de uma molécula reduza a toxicidade da molécula. Em algumas modalidades, o número de modificações fosforotioato em uma molécula de RNA pode influenciar a absorção da molécula em uma célula, por exemplo, a eficiência da absorção passiva da molécula em uma célula. Em algumas modalidades, o sdRNA não tem modificação 2'F e, ainda assim, é caracterizado por eficácia igual em absorção celular e penetração em tecidos.

[001069] Em algumas modalidades, uma fita guia em aproximadamente 18-19 nucleotídeos de comprimento e aproximadamente 2-14 modificações fosfato. Por exemplo, uma fita guia pode conter 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou mais de 14 nucleotídeos que são modificados no fosfato. A fita guia pode conter uma ou mais modificações que conferem estabilidade aumentada sem interferir com a entrada do RISC. Os nucleotídeos modificados no fosfato, tais como nucleotídeos modificados com fosforotioato, podem estar na extremidade 3', 5' extremidade ou espalhados por toda a fita guia. Em algumas modalidades, os 10 nucleotídeos terminais 3'

da fita guia contêm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos modificados com fosforotioato. A fita guia pode também conter modificações 2'F e/ou 2'OMe, que podem estar localizadas por toda a molécula. Em algumas modalidades, o nucleotídeo na posição um da fita guia (o nucleotídeo na posição mais 5' da fita guia) é 2'OMe-modificado e/ou fosforilado. Nucleotídeos C e U dentro da fita guia podem ser 2'F-modificados. Por exemplo, nucleotídeos C e U nas posições 2-10 de uma fita guia com 19 nt (ou posições correspondentes em uma fita guia de comprimento diferente) podem ser 2'F-modificados. Nucleotídeos C e U dentro da fita guia podem também ser 2'OMe-modificados. Por exemplo, nucleotídeos C e U nas posições 11-18 de uma fita guia com 19 nt (ou posições correspondentes in uma fita guia de comprimento diferente) podem ser 2'OMe-modificados. Em algumas modalidades, o nucleotídeo na extremidade mais 3' da fita guia não é modificado. Em certas modalidades, a maioria dos Cs e Us dentro da fita guia é 2'F-modificada e a extremidade 5' da fita guia é fosforilada. Em outras modalidades, a posição 1 e os Cs ou Us nas posições 11-18 são 2'OMe-modificados e a extremidade 5' da fita guia é fosforilada. Em outras modalidades, a posição 1 e os Cs ou Us nas posições 11-18 são 2'OMe-modificados, a extremidade 5' da fita guia é fosforilada e os Cs ou Us nas posições 2-10 são 2'F-modificados.

[001070] A tecnologia *self-deliverable RNAi* provê um método para transfectar diretamente células com o agente RNAi, sem a necessidade de formulações ou técnicas adicionais. A capacidade para transfecção de linhagens celulares de difícil transfecção, alta atividade *in vivo* e simplicidade de uso são características das composições e métodos que apresentam vantagens funcionais significativas em relação a técnicas tradicionais baseadas em siRNA e, assim, os métodos com sdRNA são empregados em diversas modalidades relacionadas aos métodos de redução na expressão do gene alvo nos TILs da presente invenção. Os métodos com sdRNAi permitem

a entrega direta de compostos sintetizados quimicamente para uma ampla gama de células primárias e tecidos, *ex-vivo* e *in vivo*. Os sdRNAs descritos em algumas modalidades da invenção são disponibilizados comercialmente pela Advirna LLC, Worcester, MA, EUA.

[001071] Os sdRNA são formados como estruturas híbridas siRNA modificado hidrofobicamente-oligonucleotídeo *antisense*, e são descritas, por exemplo, em Byrne *et al.*, December 2013, *J. Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(10): 855-864, aqui incorporado, em sua totalidade, por referência.

[001072] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos-sdRNA podem ser entregues aos TILs aqui descritos por eletroporação estéril. Em certas modalidades, o método compreende a eletroporação estéril de uma população de TILs para entre dos oligonucleotídeos-sdRNA.

[001073] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos podem ser entregues às células em combinação com um sistema para entrega transmembrana. Em algumas modalidades, esse sistema para entrega transmembrana compreende lipídios, vetores virais e similares. Em algumas modalidades, o agente oligonucleotídeo é um agente RNAi de auto-entrega, que não requer agentes para entrega. Em certas modalidades, o método compreende o uso de um sistema para entrega transmembrana para entrega dos oligonucleotídeos-sdRNA a uma população de TILs.

[001074] Oligonucleotídeos e composições de oligonucleotídeos são colocados em contato com (p. ex., levados ao contato com, também aqui referido como administrados ou liberados para) e absorvidos pelos TILs descritos, incluindo através de absorção passiva pelos TILs. O sdRNA pode ser adicionados aos TILs aqui descritos durante a primeira expansão, por exemplo, Figura 7 e/ou Figura 85, Etapa B, depois da primeira expansão, por exemplo, durante a Etapa C, antes ou durante a segunda expansão, por exemplo, antes ou durante a Etapa D, depois da Etapa D e antes da coleta na

etapa E, durantes ou depois da coleta na etapa F, antes ou durante a formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão na etapa F, bem como antes de qualquer etapa adicional de crioconservação na etapa F. Além disso, o sdRNA pode ser adicionado depois do descongelamento de qualquer etapa de crioconservação na etapa F. Em uma modalidade, um ou mais sdRNAs direcionados a genes aqui descritos, incluindo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB, podem ser adicionados ao meio de cultura celular compreendendo TILs e outros agentes em concentrações selecionadas dentre o grupo que consiste em 100 nM a 20 mM, 200 nM a 10 mM, 500 nm a 1 mM, 1 μM a 100 μM e 1 μM a 100 μM. Em uma modalidade, um ou mais sdRNAs direcionados a genes aqui descritos, incluindo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB, podem ser adicionados ao meio de cultura celular compreendendo TILs e outros agentes em quantidades selecionadas dentre o grupo que consiste em sdRNA 0,1 μM/10.000 TILS/100 μL de meio, sdRNA 0,5 μM/10.000 TILS /100 μL de meio, sdRNA 0,75 μM/10.000 TILS /100 μL de meio, sdRNA 1 μM/10.000 TILS /100 μL de meio, sdRNA 1,25 μM/10.000 TILS /100 μL de meio, sdRNA 1,5 μM/10.000 TILS /100 μL de meio, sdRNA 2 μM/10.000 TILS /100 μL de meio, sdRNA 5 μM/10.000 TILS /100 μL de meio ou sdRNA 10 μM/10.000 TILS /100 μL de meio. Em uma modalidade, um ou mais sdRNAs direcionados a genes aqui descritos, incluindo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB, podem ser adicionados a culturas de TILs durante os estágios pré-REP ou REP duas vezes ao dia, uma vez a dia, a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada cinco dias, a cada seis dias ou a cada sete dias.

[001075] As composições de oligonucleotídeos da invenção, incluindo sdRNA, podem ser colocadas em contato com TILs como aqui descritos durante o processo de expansão, por exemplo, dissolvendo sdRNA em concentrações elevadas no meio de cultura celular e permitindo tempo suficiente para que ocorra absorção passiva. Em certas modalidades, o método

da presente invenção compreende colocar uma população de TILs em contacto com uma composição de oligonucleotídeo como aqui descrita. Em certas modalidades, o método compreende dissolver um oligonucleotídeo, p. ex., sdRNA em um meio de cultura celular e colocar o meio de cultura celular em contacto com uma população de TILs. Os TILs podem ser uma primeira população, uma segunda população e/ou uma terceira população como aqui descritas.

[001076] Em algumas modalidades, a entrega de oligonucleotídeos a células pode ser aumentada por métodos adequados reconhecidos na técnica, incluindo com fosfato de cálcio, DMSO, glicerol ou dextrano, eletroporação, ou por transfecção, p. ex., usando composições lipídicas catiônicas, aniônicas ou neutras ou lipossomas por métodos conhecidos na técnica (ver, p. ex., WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; Patente U.S. Nº 4 897 355; Bergan *et al*, 1993. Nucleic Acids Research. 21:3567).

[001077] Em algumas modalidades, mais de um sdRNA é usado para reduzir a expressão de um gene alvo. Em algumas modalidades, sdRNA direcionados a um ou mais dentre PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 e/ou CISH são usados junto. Em algumas modalidades, um sdRNA de PD-1 é usado com um ou mais dentre TIM-3, CBLB, LAG3 e/ou CISH visando reduzir a expressão de mais de um gene alvo. Em algumas modalidades, um sdRNA de LAG3 é usado em combinação com um sdRNA direcionado a CISH para reduzir a expressão gênica de ambos os alvos. Em algumas modalidades, os sdRNAs direcionados a um ou mais dentre PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 e/ou CISH são disponibilizados comercialmente pela Advirna LLC, Worcester, MA, EUA.

[001078] Em algumas modalidades, o sdRNA é direcionado a um gene selecionado dentre o grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, sdRNA é direcionado a um gene selecionado dentre o grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4,

TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a PD-1 e outro sdRNA é direcionado a um gene selecionado dentre o grupo que consiste em LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o sdRNA é direcionado a um gene selecionado dentre PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3, e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o sdRNA é direcionado a um gene selecionado dentre PD-1 e um dentre LAG3, CISH, CBLB, TIM3, e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a PD-1 e outro sdRNA é direcionado a LAG3. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a PD-1 e outro sdRNA é direcionado a CISH. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a PD-1 e um sdRNA é direcionado a CBLB. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a LAG3 e outro sdRNA é direcionado a CISH. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a LAG3 e outro sdRNA é direcionado a CBLB. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a CISH e outro sdRNA é direcionado a CBLB. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a TIM3 e outro sdRNA é direcionado a PD-1. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a TIM3 e outro sdRNA é direcionado a LAG3. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a TIM3 e outro sdRNA é direcionado a CISH. Em algumas modalidades, um sdRNA é direcionado a TIM3 e outro sdRNA é direcionado a CBLB.

[001079] Como discutido acima, modalidades da presente invenção provêm linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que foram modificados geneticamente, através de edição gênica, para melhorar o seu efeito terapêutico. Modalidades da presente invenção adotam a edição genética através da inserção de nucleotídeos (RNA ou DNA) em uma população de TILs para promoção da expressão de uma ou mais proteínas e para inibição da expressão de uma ou mais proteínas, bem como combinações dos mesmos.

Modalidades da presente invenção também provêm métodos para expansão de TILs em uma população terapêutica, em que os métodos compreendem a edição gênica dos TILs. Existem diversas tecnologias de edição gênica que podem ser usadas para modificar geneticamente uma população de TILs, e que são adequadas para uso de acordo com a presente invenção.

[001080] Em algumas modalidades, o método compreende um método para modificar geneticamente uma população de TILs, o qual inclui a etapa de incorporação estável de genes para produção de uma ou mais proteínas. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução lentiviral. Sistemas de transdução lentiviral são conhecidos na técnica e estão descritos, p. ex., em Levine, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* **2006,** *103,* 17372-77; Zufferey, *et al., Nat. Biotechnol.* **1997,** *15,* 871-75; Dull, *et al.*, *J. Virology* **1998,** *72*, 8463-71, e Patente U.S. Nº 6 627 442, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral gama. Sistemas de transdução retroviral gama são conhecidos na técnica e estão descritos, p. ex., Cepko and Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* **1996,** 9.9.1-9.9.16, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transferência de genes mediada por transposon. Sistemas para transferência de genes mediada por transposon são conhecidos na técnica e incluem sistemas em que a transposase é fornecida como um vetor de expressão de DNA ou como um RNA ou uma proteína expressível, de tal modo que a expressão por longo prazo da transposase não ocorra em células transgênicas, por exemplo, uma transposase fornecida como mRNA (p. ex., um mRNA compreendendo um cap e uma cauda poli-A). Sistemas adequados para transferência de genes mediada por transposon,

incluindo um transposase Tel-like do tipo salmonídeo (transposase SB ou Sleeping Beauty), tais como SB10, SB11 e SB100x, e enzimas modificadas com atividade enzimática aumentada, são descritos em, p. ex., Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* **2010,** *18,* 674-83 e Patente U.S. Nº 6 489 458, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[001081] Em uma modalidade, o método compreende um método para modificar geneticamente uma população de TILs, p. ex., uma primeira população, uma segunda população e/ou uma terceira população como aqui descritas. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de incorporação estável de genes para produção ou inibição (p. ex., silenciamento) de uma ou mais proteínas. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de eletroporação. Métodos de eletroporação são conhecidos na técnica e estão descritos, p. ex., em Tsong, *Biophys. J.* **1991,** *60,* 297-306, e Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2014/0227237 A1, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Outros métodos de eletroporação conhecidos na técnica, tais como aqueles descritos nas Patentes U.S. Nºs 5,019,034; 5,128,257; 5,137,817; 5,173,158; 5,232,856; 5,273,525; 5,304,120; 5,318,514; 6,010,613 e 6,078,490, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência, podem ser usados. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação estéril. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada, o qual compreende as etapas de tratar TILs com pulsos de campos elétricos para alterar, manipular ou provocar alterações definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com intensidades do campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que a

sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC possui uma, duas ou três das seguintes características: (1) pelo menos dois dos menos três pulsos diferem um do outro em amplitude do pulso; (2) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro em largura do pulso; e (3) um primeiro intervalo entre os pulsos para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente de um segundo intervalo entre os pulsos é diferente para um segundo conjunto de dois dos pelos menos três pulsos. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada, o qual compreende as etapas de tratar TILs com pulsos de campos elétricos para alterar, manipular ou provocar alterações definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com intensidades do campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que pelo menos dois dos menos três pulsos diferem um do outro em amplitude do pulso. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada, o qual compreende as etapas de tratar TILs com pulsos de campos elétricos para alterar, manipular ou provocar alterações definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com intensidades do campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro em largura do pulso. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada o qual compreende as etapas de tratar TILs com pulsos de campos elétricos para alterar, manipular ou provocar alterações definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com

intensidades do campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que um primeiro intervalo entre os pulsos para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente de um segundo intervalo entre os pulsos é diferente para um segundo conjunto de dois dos pelos menos três pulsos. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada o qual compreende as etapas de tratar TILs com pulsos de campos elétricos para alterar, manipular ou provocar alterações definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com intensidades do campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que a sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC possui uma, duas ou três das seguintes características: (1) pelo menos dois dos menos três pulsos diferem um do outro em amplitude do pulso; (2) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro em largura do pulso; e (3) um primeiro intervalo entre os pulsos para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente de um segundo intervalo entre os pulsos é diferente para um segundo conjunto de dois dos pelos menos três pulsos, tal que poros induzidos sejam sustentados por um período de tempo relativamente longo, e tal que a viabilidade dos TILs seja mantida. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção com fosfato de cálcio. Os métodos de transfecção com fosfato de cálcio (precipitação do DNA com fosfato de cálcio, revestimento da superfície celular e endocitose) são conhecidos na técnica e estão descritos em Graham and van der Eb, *Virology* **1973,** *52,* 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979,** *76,* 1373-1376; e Chen and Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* **1987,** *7,* 2745-2752; e na Patente U.S. Nº 5 593 875, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção com

lipossomas. Métodos de transfecção com lipossomas, tais como métodos que empregam uma formulação 1:1 (p/p) de lipossomas do lipídio catiônico cloreto de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*n*,*n*,*n*-trimetilamônio (DOTMA) e dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE) em água filtrada, são conhecidos na técnica e estão descritos em Rose, *et al.*, *Biotechniques* **1991,** *10,* 520-525 e Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987,** *84,* 7413-7417 e nas Patentes U.S. Nos 5 279 833; 5 908 635; 6 056 938; 6 110 490; 6 534 484; e 7 687 070, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção por métodos descrito em Patentes U.S. Nos 5 766 902; 6 025 337; 6 410 517; 6 475 994; e 7 189 705; cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Os TILs podem ser uma primeira população, uma segunda população e/ou uma terceira população de TILs como aqui descritas.

[001082] De acordo com uma modalidade, o processo de edição gênica pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma quebra de dupla-fita ou de fita simples em um ou mais genes de *checkpoint* (controle) imunológico. Tais nucleases programáveis permitem a edição do genoma com precisão ao introduzirem quebras em *loci* genômicos específicos, ou seja, eles baseiam-se no reconhecimento de uma sequência de DNA específica dentro do genoma para atingir um domínio nuclease nessa localização e mediar a geração de uma quebra de fita dupla na sequência alvo. Uma quebra de fita dupla no DNA recruta subsequentemente o maquinário de reparo endógeno ao local da quebra para mediar a edição do genoma por junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou reparo direcionado por homologia (HDR). Assim, o reparo da quebra pode resultar na introdução de mutações por inserção/deleção que atingem (p. ex., silenciam, reprimem ou aumentam) o produto do gene alvo.

[001083] As principais classes de nucleases que foram desenvolvidas

para permitir a edição genômica sítio-específica incluam as nucleases dedo de zinco (*zinc finger nucleases*, ZFNs), nucleases efetoras semelhantes a ativadores da transcrição (*transcription activator-like nucleases*, TALENs) e nucleases associadas a CRISPR (p. ex., CRISPR/Cas9). Esses sistemas de nuclease systems podem ser classificados de modo amplo em duas categorias tendo por base o modo com que reconhecem DNA: ZFNs e TALENs realizam ligação específica ao DNA através de interações proteína-DNA, enquanto que sistemas CRISPR, tais como Cas9, são direcionadas para sequências específicas do DNA por uma molécula de RNA guia curto que pareia bases diretamente com o DNA alvo e por interações proteína-DNA. Ver, p. ex., Cox *et al.*, *Nature Medicine,* 2015, Vol. 21, No. 2.

[001084] Exemplos não limitantes de métodos para edição de genes que podem ser utilizados de acordo com os métodos de expansão de TILs da presente invenção incluem métodos com CRISPR, métodos com TALE e métodos com ZFN, os quais são descritos mais detalhadamente abaixo. De acordo com uma modalidade, um método para a expansão de TILs em uma população terapêutica pode ser realizado out de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (p. ex., processos GEN 3) ou como descrito em PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605, ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição gênica de pelo menos uma parte dos TILs por um ou mais dentre um método com CRISPR, um método com TALE ou um método com ZFN, a fim de gerar TILs que possam proporcionar um efeito terapêutico aumentado. De acordo com uma modalidade, TILs de genes editados podem ser avaliados quanto a um efeito terapêutico melhorado comparando-os com TILs não modificados *in vitro,* p. ex., avaliando a função efetora *in vitro*, perfis de citocinas etc. em comparação a TILs não modificados. Em certas modalidades, o método compreende a edição de genes de uma população de TILs usando métodos CRISPR, TALE e/ou ZFN.

[001085] Em algumas modalidades da presente invenção, usa-se eletroporação para entrega de um sistema de edição gênica, tal como sistema CRISPR, TALEN e ZFN. Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação é um sistema de fluxo de eletroporação. Um exemplo de um sistema de fluxo de eletroporação adequado para uso com algumas modalidades da presente invenção é o sistema MaxCyte STX disponível comercialmente. Há diversos instrumentos de eletroporação alternativos, disponíveis comercialmente que podem ser adequados para uso com a presente invenção, tais como o sistema AgilePulse ou ECM 830 disponibilizado pela BTX-Harvard Apparatus, Cellaxess Elektra (Cellectricon), Nucleofector (Lonza/Amaxa), GenePulser MXcell (BIORAD), iPorator-96 (Primax) ou siPORTer96 (Ambion). Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação forma um sistema fechado, estéril com o restante do método de expansão de TILs. Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação é um sistema de eletroporação pulsada como aqui descrita, e forma um sistema fechado, estéril com o restante do método de expansão de TILs.

[001086] Um método para a expansão de TILs em uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (p. ex., processo GEN 3), ou como descrito em PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição gênica de pelo menos uma parte dos TILs por um método CRISPR (p. ex., CRISPR/Cas9 ou CRISPR/Cpf1). De acordo com modalidades em particular, o uso de um método CRISPR durante o processo de expansão de TILs faz com que a expressão de um ou mais genes de *checkpoint* imunológico seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma parte da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método CRISPR durante o processo de expansão de faz com que a expressão de um ou mais genes de *checkpoint* imunológico seja reforçada em pelo

menos uma parte da população terapêutica de TILs.

[001087] CRISPR significa "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*" [Repetições palindrômicas curtas, interespaçadas regularmente agrupadas]. Um método de uso de um sistema CRISPR para edição gênica é também aqui mencionado como método CRISPR. Existem três tipos de sistemas CRISPR que incorporam RNAs e proteínas Cas, e que podem ser usados de acordo com a presente invenção: Tipos I, II, e III. O CRISPR Tipo II (exemplificado por Cas9) é um dos sistemas mais bem caracterizados.

[001088] A tecnologia CRISPR foi adaptada dos mecanismos naturais de defesa de bactérias e arqueias (o domínio de microrganismos unicelulares). Esses organismos usam RNA derivado de CRISPR e várias proteínas Cas, incluindo Cas9, para frustrar ataques por vírus e outros corpos estranhos cortando em pedaços e destruindo o DNA de um invasor estranho. CRISPR é uma região especializada do DNA com duas características distintas: a presença de repetições de nucleotídeos e espaçadores. Sequências repetidas de nucleotídeos estão distribuídas por toda uma região CRISPR com segmentos curtos de DNA estranho (espaçadores) intercalados entre as sequências repetidas. No sistema CRISPR/Cas tipo II, os espaçadores são integrados dentro dos *loci* genômicos de CRISPR e transcritos e processados no RNA curto de CRISPR (crRNA). Esses crRNAs anelam em crRNAs de transativação em trans (tracrRNAs) e direcionam uma clivagem direta sequência-específica e silenciamento do DNA patogênico por proteínas Cas. O reconhecimento do alvo pela proteína Cas9 requer uma sequência "semente" dentro do crRNA e uma sequência de motivo adjacente ao protoespaçador (PAM) contendo dinucleotídeo conservado a montante da região de ligação do crRNA. O sistema CRISPR/Cas pode, assim, ser redirecionado para clivar virtualmente qualquer sequência de DNA ao redesenhar o crRNA. O crRNA e o tracrRNA no sistema nativo podem ser

simplificados em um único RNA guia (sgRNA) de aproximadamente 100 nucleotídeos para uso na engenharia genética. O sistema CRISPR/Cas pode ser diretamente transferido para células humanos pela entrega em conjunto de plasmídeos que expressam a Cas9 endo-nuclease e os componentes necessários do crRNA. Variantes diferentes de proteínas Cas podem ser usadas para reduzir limitações ao direcionamento (p. ex., ortólogos de Cas9, tais como Cpf1).

[001089] Exemplos não limitantes de genes que podem ser silenciados ou inibidos pela edição gênica permanente de TILs através de um método CRISPR incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[001090] Exemplos não limitantes de genes que podem ser reforçados pela edição gênica permanente de TILs através de um método CRISPR incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

[001091] Exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência gênica alvo por um método CRISPR, e que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos nas Patentes U.S. N^{os} 8 697 359; 8 993 233; 8 795 965; 8 771 945; 8 889 356; 8 865 406; 8 999 641; 8 945 839; 8 932 814; 8 871 445; 8 906 616; e 8 895 308, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Recursos para realizar os métodos CRISPR métodos, tais como plasmídeos para a expressão de CRISPR/Cas9 e CRISPR/Cpf1, são disponibilizados comercialmente por empresas tais como a GenScript.

[001092] Em uma modalidade, modificações genéticas de populações de TILs, como aqui descritos, podem ser realizadas pelo sistema CRISPR/Cpf1 como descrito na Patente U.S. Nº US 9790490, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

[001093] Um método para a expansão de TILs em uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (p. ex., processo 2A) ou como descrito em PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição gênica de pelo menos uma parte dos TILs por um método TALE. De acordo com modalidades em particular, o uso de um método TALE durante o processo de expansão de TILs faz com que a expressão de um ou mais genes de *checkpoint* imunológico sejam silenciados ou reduzidos em pelo menos uma parte da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método TALE durante o processo de expansão de TILs faz com que a expressão de um ou mais genes de checkpoint imunológico seja reforçada em pelo menos uma parte da população terapêutica de TILs.

[001094] TALE significa proteínas "*Transcription Activator-Like Effector*" [Efetoras semelhantes a ativadores da transcrição], as quais incluem TALENs ("*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*") [Nucleases efetoras semelhantes a ativadores da transcrição]. Um método de uso de um sistema a TALE para edição de genes pode também ser aqui referido como método TALE. TALEs são proteínas naturais de bactérias patogênicas a plantas, pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, e contêm domínios de ligação ao DNA compostos por uma série de domínios de repetição de 33-35 aminoácidos que reconhece, cada uma, um único par de base. A especificidade de TALE é determinada por dois aminoácidos hipervariáveis que são conhecidos como os di-resíduos variáveis repetidos (RVDs). Repetições TALE Modulares são unidas para reconhecer sequências

contíguas de DNA. UM RVD específico no domínio de ligação ao DNA reconhece uma base no lócus alvo, fornecendo uma característica estrutural para montagem de domínios previsíveis de ligação ao DNA. Os domínios de ligação ao DNA de TALE são fundidos ao domínio catalítico de uma endonuclease do tipo IIS FokI para produzir uma nuclease TALE alcançável. Para induzir mutação sítio-específica, dois braços individuais de TALEN, separados por uma região espaçadora de 14-20 pares de base, levam à dimerização monômeros de FokI em grande proximidade e produção de uma quebra de fita dupla direcionada.

[001095] Diversos estudos sistemáticos grandes, utilizando vários métodos de montagem, indicaram que repetições de TALE podem ser combinadas para o reconhecimento de virtualmente qualquer sequência definida pelo usuário. Arranjos de TALE de desenho personalizado também estão disponíveis comercialmente pela Cellectis Bioresearch (Paris, França), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, EUA) e Life Technologies (Grand Island, NY, EUA). Métodos TALE e TALEN adequados para uso na presente invenção são descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. N^{os} US 2011/0201118 A1; US 2013/0117869 A1; US 2013/0315884 A1; US 2015/0203871 A1 e US 2016/0120906 A1, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[001096] Exemplos não limitantes de genes que podem ser silenciados ou inibidos pela edição gênica permanente de TILs através de um método TALE incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[001097] Exemplos não limitantes de genes que podem ser reforçados pela edição gênica permanente de TILs através de um método TALE incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

[001098] Exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência gênica alvo por um método TALE, e que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos na Patente U.S. No 8 586 526, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

[001099] Uma método para a expansão de TILs em uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (p. ex., processo GEN 3) ou como descrito em PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição gênica de pelo menos uma parte dos TILs por um método *zinc finger* ou com nuclease *zinc finger*. De acordo com modalidades em particular, o uso de um método *zinc finger* durante o processo de expansão de TILs faz com que a expressão de um ou mais genes de *checkpoint* imunológico sejam silenciados ou reduzidos em pelo menos uma parte da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método *zinc finger* durante o processo de expansão de TILs faz com que a expressão de um ou mais genes de *checkpoint* imunológico seja reforçada em pelo menos uma parte da população terapêutica de TILs.

[001100] Um *zinc finger* individual contém aproximadamente 30 aminoácidos em configuração ββα conservada. Diversos aminoácidos na superfície da hélice α tipicamente entram em contacto com 3 bp no sulco maior do DNA, com níveis variáveis de seletivamente. *Zinc fingers* possuem dois domínios proteicos. O primeiro domínio é o domínio de ligação ao DNA, que inclui fatores de transcrição eucarióticos e contém o *zinc finger*. O segundo domínio é o domínio nuclease, que inclui a enzima de restrição FokI e é responsável pela clivagem catalítica de DNA.

[001101] Os domínios de ligação ao DNA de ZFNs individuais contêm

tipicamente entre três e seis repetições individuais *zinc finger* e pode reconhecer, cada um, entre 9 e 18 pares de base. Se os domínios zinc finger forem específicos para os seus sítios alvo pretendidos, então, mesmo um par de 3 ZFNs do *finger* que reconhecem, no total, 18 18 pares de base podem, em teoria, atingir um único lócus no genoma de um mamífero. Um método para gerar novos arranjos *zinc finger* é combinar "módulos" menores de zinc finger de especificidade conhecida. O processo mais comum para montagem modular envolve combinar três *zinc fingers* separados que podem, cada um, reconhecer uma sequência de DNA com 3 pares de base para gerar um arranjo de 3 *fingers* que pode reconhecer um sítio alvo com 9 pares de base. Alternativamente, abordagens baseadas em seleção, tais como *oligomerized pool engineering* (OPEN), podem ser usadas para selecionar novos arranjos de *zinc fingers* a partir de bibliotecas randomizadas que levam em consideração interações dependentes do contexto entre *fingers* vizinhos. *Zinc fingers* modificados estão disponíveis comercialmente; a Sangamo Biosciences (Richmond, CA, EUA) desenvolveu uma plataforma de propriedade exclusiva (CompoZr®) para construção de *zinc fingers* em parceria com a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

[001102] Exemplos não limitantes de genes que podem ser silenciados ou inibidos pela edição gênica permanente de TILs através de um método *zinc finger* incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[001103] Exemplos não limitantes de genes que podem ser reforçados pela edição gênica permanente de TILs através de um método *zinc finger*

incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

[001104] Exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência gênica alvo por um método *zinc finger*, que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos nas Patentes U.S. Nos 6 534 261, 6 607 882, 6 746 838, 6 794 136, 6 824 978, 6 866 997, 6 933 113, 6 979 539, 7 013 219, 7 030 215, 7 220 719, 7 241 573, 7 241 574, 7 585 849, 7 595 376, 6 903 185 e 6 479 626, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[001105] Outros exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência gênica alvo por um método *zinc finger*, que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos em Beane, *et al.*, *Mol. Therapy*, **2015,** 23 1380-1390, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

[001106] Em algumas modalidades, os TILs são opcionalmente modificados geneticamente para incluir funcionalidades adicionais, incluindo, entre outros, um receptor de células T de alta afinidade (TCR), p. ex., um TCR direcionado para um antígeno associado a tumores, tais como MAGE-1, HER2 ou NY-ESO-1, ou um receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a uma molécula na superfície celular associada ao tumor (p. ex., mesotelina) ou uma molécula na superfície celular de linhagem restrita (p. ex., CD19). Em certas modalidades, o método compreende modificar geneticamente uma população de TILs para incluir um receptor de células T de alta afinidade (TCR), p. ex., um TCR direcionado para um antígeno associado a tumores, tais como MAGE-1 HER2, ou NY-ESO-1, ou um receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a uma molécula na superfície celular associada ao tumor (p. ex., mesotelina) ou uma molécula na superfície celular de linhagem restrita (p. ex., CD19). Adequadamente, a população de TILs pode ser uma primeira população, uma segunda população

e/ou uma terceira população como aqui descritas.

XI. Sistemas fechados para produção de TIL

[001107] A presente invenção provê o uso de sistemas fechados durante o processo de cultivo de TIL, por exemplo, em conjunção com os processos Gen 2 ou Gen 3. Tais sistemas fechados permitem prevenir e/ou reduzir a contaminação microbiana, permitem o uso de menos frascos e permitem reduções de custo. Em algumas modalidades, o sistema fechado usa dois recipientes.

[001108] Tais sistemas fechados são bem conhecidos na técnica e podem ser encontrados, por exemplo, em http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm e https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.

[001109] Dispositivos estéreis de conexão (STCDs) produzem soldas estéreis entre dois pedaços de tubos compatíveis. Esse procedimento permite a conexão estéril de uma variedade de recipientes e diâmetros de tubos. Em algumas modalidades, os sistemas fechados incluem trava luer e sistemas termicamente selados como descritos. Em algumas modalidades, o acesso ao sistema fechado é através de seringas sob condições estéreis a fim de manter a esterilidade e a natureza fechada do sistema. Em algumas modalidades, é empregado um sistema fechado como aqui descrito. Em algumas modalidades, os TILs são formulados em um recipiente para formulação do produto final de acordo com o método aqui descrito.

[001110] Em algumas modalidades, o sistema fechado usa um recipiente desde o momento em que os fragmentos do tumor são obtidos até que os TILs estejam prontos para administração ao paciente ou para crioconservação. Em algumas modalidades quando dois recipientes são usados, o primeiro recipiente é um recipiente G fechado e a população de TILs é centrifugada e transferida para uma bolsa de infusão sem abrir o primeiro recipiente G

fechado. Em algumas modalidades, quando dois recipientes são usados, a bolsa de infusão é uma bolsa de infusão contendo HyperThermosol. Um sistema fechado ou sistema fechado para cultura de TILs é caracterizado pelo fato de que, uma vez a amostra do tumor ou fragmentos do tumor tenham sido adicionados, o sistema é hermeticamente fechado do meio externo para formar um ambiente fechado livre da invasão de bactérias, fungos e/ou qualquer outra contaminação microbiana.

[001111] Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 5% e 100%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 5% e 95%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 5% e 90%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 10% e 90%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é entre aproximadamente 15% e 85%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% ou aproximadamente 100%.

[001112] O sistema fechado permite o crescimento de TILs na ausência e/ou com uma redução significativa na contaminação microbiana.

[001113] Além disso, o pH, a pressão parcial de dióxido de carbono e a pressão parcial de oxigênio do ambiente da cultura celular de TILs variam, cada um, à medida que as células são cultivadas. Consequentemente, mesmo que um meio apropriado para cultura celular seja circulado, o ambiente

fechado ainda precisa ser constantemente mantido como um ambiente ótimo para proliferação de TILs. Para isso, é desejável que os fatores físicos de pH, pressão parcial de dióxido de carbono e pressão parcial de oxigênio dentro do líquido de cultura do ambiente fechado seja monitorado por um sensor, cujo sinal seja usado para controlar um trocador de gases instalado na entrada do ambiente de cultura, e que a pressão parcial daquele gás do ambiente fechado seja ajustada em tempo real de acordo com mudanças no líquido de cultura a fim otimizar o ambiente da cultura celular. Em algumas modalidades, a presente invenção provê um sistema fechado de cultura celular que incorpora na entrada para o ambiente fechado um trocador de gases equipado com um dispositivo de monitoramento que mede o pH, a pressão parcial de dióxido de carbono e a pressão parcial de oxigênio do ambiente fechado e otimiza o ambiente da cultura celular ao ajustar automaticamente as concentrações de gases com base em sinais emitidos pelo dispositivo de monitoramento.

[001114] Em algumas modalidades, a pressão dentro do ambiente fechado é controlada de modo contínuo ou intermitente. Ou seja, a pressão no ambiente fechado pode ser variada por meio de um dispositivo para manutenção da pressão, por exemplo, assegurando, assim, que o espaço seja adequado para o crescimento de TILs em um estado de pressão positiva, ou promovendo a exsudação de líquido em um estado de pressão negativa e, assim, promovendo a proliferação celular. Além disso, com a aplicação intermitente de pressão negativa, é possível substituir de modo uniforme e eficiente o líquido circulante no ambiente fechado.

[001115] Em algumas modalidades, componentes da cultura, ótimos para proliferação dos TILs, podem ser substituídos ou adicionados, incluindo fatores tais como IL-2 e/ou OKT3, além de combinações, que podem ser adicionados.

XII. Crioconservação de TILs

[001116] Uma população de TIL a granel (por exemplo, a segunda

população de TILs) ou a população de TILs expandidos (por exemplo, a terceira população de TILs) preparada pelos processos Gen 2 ou Gen 3 pode ser opcionalmente crioconservada. Em algumas modalidades, a crioconservação ocorre na população terapêutica de TILs. Em algumas modalidades, a crioconservação ocorre nos TILs coletados após a segunda expansão. Em algumas modalidades, a crioconservação ocorre nos TILs na Etapa F exemplar da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados na bolsa de infusão. Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados antes de serem colocados na bolsa de infusão. Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados e não colocados em uma bolsa de infusão. Em algumas modalidades, a crioconservação é realizada usando um meio de crioconservação. Em algumas modalidades, o meio de crioconservação contém dimetilsulfóxido (DMSO). Essa é geralmente realizada colocando a população de TILs em uma solução de congelamento, p. ex., soro AB inativado com complemento 85% e dimetilsulfóxido 15% (DMSO). As células em solução são colocadas em tubos criogênicos e armazenadas por 24 horas a -80 ºC, com transferência opcional para *freezers* contendo nitrogênio gasoso para crioconservação. Ver, Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986.

[001117] Quando apropriado, as células são removidas do *freezer* e descongeladas em banho-maria a 37 ºC até que aproximadamente 4/5 da solução tenha descongelado. As células são geralmente suspensas em meio completo e, opcionalmente, lavadas uma ou mais vezes. Em algumas modalidades, os TILs descongelados podem ser contados e avaliados quanto à viabilidade como é conhecido na técnica.

[001118] Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é crioconservada com meio de crioconservação CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é crioconservada usando um meio de crioconservação contendo

dimetilsulfóxido (DMSO). Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é crioconservada usando uma razão 1:1 (v:v) de CS10/meio de cultura celular. Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é crioconservada usando uma razão próxima de 1:1 (v:v) de CS10/meio de cultura celular, compreendendo ainda IL-2 adicional.

[001119] Como discutido acima, e exemplificado nas etapas A a E como disposto na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), a crioconservação pode ocorrer em inúmeros pontos por todo o processo de expansão de TILs. Em algumas modalidades, a população de TILs expandidos depois da segunda expansão (como disposto por exemplo, de acordo com Etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) pode ser crioconservada. A crioconservação pode ser realizada, em geral, colocando a população de TILs em uma solução de congelamento, p. ex., soro AB inativado com complemento 85% e dimetilsulfóxido 15% (DMSO). As células em solução são colocadas em tubos criogênicos e armazenadas por 24 horas a -80 °C, com transferência opcional para *freezers* contendo nitrogênio gasoso para crioconservação. Ver Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986. Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados em DMSO 5%. Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados em meio de cultura celular mais DMSO 5%. Em algumas modalidades, os TILs são crioconservados de acordo com os métodos aqui providos.

[001120] Quando apropriado, as células são removidas do *freezer* e descongeladas em banho-maria a 37 ºC até que aproximadamente 4/5 da solução tenha descongelado. As células são geralmente suspensas em meio completo e, opcionalmente, lavadas uma ou mais vezes. Em algumas modalidades, os TILs descongelados podem ser contados e avaliados quanto à viabilidade como é conhecido na técnica.

[001121] Em alguns casos, a população de TILs da Etapa B pode ser crioconservada imediatamente, usando os protocolos discutidos abaixo.

Alternativamente, a população de TIL a granel pode ser submetida à Etapa C e Etapa D e então crioconservada depois da Etapa D. Do mesmo modo, caso os TILs geneticamente modificados venham a ser usados em terapia, as populações de TILs da Etapa B ou Etapa D podem ser submetidas a modificações genéticas para tratamentos adequados.

XIII. Características fenotípicas de TILs expandidos

[001122] Em algumas modalidades, os TILs são analisados quanto à expressão de inúmeros marcadores fenotípicos após a expansão, incluindo aqueles aqui descritos e nos Exemplos. Em uma modalidade, a expressão de um ou mais marcadores fenotípicos é examinada. Em algumas modalidades, as características fenotípicas dos TILs são analisadas depois da primeira expansão na etapa B. Em algumas modalidades, as características fenotípicas dos TILs são analisadas durante a transição na etapa C. Em algumas modalidades, as características fenotípicas dos TILs são analisadas durante a transição de acordo com a Etapa C e depois crioconservação. Em algumas modalidades, as características fenotípicas dos TILs são analisadas depois da segunda expansão de acordo com a Etapa D. Em algumas modalidades, as características fenotípicas dos TILs são analisadas depois de duas ou mais expansões de acordo com a Etapa D.

[001123] Em algumas modalidades, o marcador é selecionado dentre o grupo que consiste em CD8 e CD28. Em algumas modalidades, a expressão de CD8 é examinada. Em algumas modalidades, a expressão de CD28 é examinada. Em algumas modalidades, a expressão de CD8 e/ou CD28 é maior em TILs produzidos de acordo com o processo da presente invenção, em comparação a outros processos (p. ex., o processo Gen 3 como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), em comparação ao processo 2A processo como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)). Em algumas modalidades, a expressão de CD8 a expressão de CD8 e/ou CD28 é maior em TILs produzidos de acordo

com o processo da presente invenção, em comparação a outros processos (p. ex., o processo Gen 3 como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), em comparação ao processo 2A como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)). Em algumas modalidades, a expressão de CD28 a expressão de CD8 e/ou CD28 é maior em TILs produzidos de acordo com o processo da presente invenção, em comparação a outros processos (p. ex., o processo Gen 3 como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), em comparação ao processo 2A como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85A)). Em uma modalidade, a expressão de um ou mais marcadores regulatórios é medido.

[001124] Em uma modalidade, nenhuma seleção da primeira população de TILs, da segunda população de TILs, da terceira população de TILs ou população de TILs coletados com base na expressão de CD8 e/ou CD28 é realizada durante qualquer uma das etapas do método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) aqui descrito.

[001125] Em algumas modalidades, a percentagem de células de memória central é maior em TILs produzidos de acordo com o processo da presente invenção, em comparação a outros processos (p. ex., o processo Gen 3 como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), em comparação ao processo 2A como disposto, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85A)). Em algumas modalidades, o marcador de memória para células de memória central é selecionado dentre o grupo que consiste em CCR7 e CD62L.

[001126] Em uma modalidade, TILs reestimulados podem também ser avaliados quanto à liberação de citocinas, por meio de ensaios de liberação de citocinas. Em algumas modalidades, TILs podem ser avaliados quanto à secreção de interferon-γ (IFN-γ). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é medida por um ensaio ELISA. Em algumas modalidades, a secreção

de IFN-γ é medida por um ensaio ELISA depois da etapa de segunda expansão rápida, depois da Etapa D como disposto em, por exemplo, a Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a saúde dos TILs é medida pela secreção de IFN-gama (IFN-γ). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é indicativa de TILs ativos. Em algumas modalidades, emprega-se um ensaio de potência para produção de IFN-γ. A produção de IFN-γ é outra medida do potencial citotóxico. A produção de IFN-γ pode ser medida determinando-se os níveis da citocina IFN-γ no meio de TILs estimulados com anticorpos contra CD3, CD28 e CD137/4-1BB. Os níveis de IFN-γ no meio, secretado por esses TILs estimulados, podem ser determinados medindo-se a liberação de IFN-γ. Em algumas modalidades, um aumento na produção de IFN-γ por TILs em, por exemplo, a Etapa D no processo Gen 3 como disposto na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), em comparação a, por exemplo, a Etapa D no processo 2A como disposto na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85A) é indicativo de um aumento no potencial citotóxico dos TILs da Etapa D. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, ou cinco vezes ou more. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada uma vez. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada duas vezes. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada três vezes. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada quatro vezes. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada cinco vezes. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido usando um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido em TILs *ex vivo*. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido em TILs *ex vivo*, incluindo TILs produzidos pelos métodos da presente invenção, incluindo, por exemplo, os métodos da Figura 85B.

[001127] Os diversos receptores de antígenos de linfócitos T e B são produzidos por recombinação somática de um número limitado, mas grande

de segmentos gênicos. Esses segmentos gênicos: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de células T (TCRs). A presente invenção provê um método para gerar TILs que exibem e aumentam a diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T quando comparados a TILs recentemente coletados e/ou TILs preparados usando outros métodos diferentes daqueles aqui providos, por exemplo, métodos que não aqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T quando comparados a TILs recentemente coletados e/ou TILs preparados usando métodos referidos como processo 2A, conforme exemplificado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85A). Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, o aumento é um aumento na diversidade de imunoglobulinas e/ou na diversidade de receptores de células T. Em algumas modalidades, a diversidade é na imunoglobulina e é na cadeia pesada de imunoglobulinas. Em algumas modalidades, a diversidade é na imunoglobulina e é na cadeia leve de imunoglobulinas. Em algumas modalidades, a diversidade é no receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade é em um dos receptores de células T selecionado dentre o grupo que consiste em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de receptor de células T (TCR) beta. Em algumas

modalidades, há um aumento na expressão de TCRab (ou seja, TCRα/β). Em algumas modalidades, o processo aqui descrito (p. ex., o processo Gen 3) mostra maior diversidade clonal, em comparação a outros processos, por exemplo, o processo referido como o Gen 2 tendo por base o número de CDRs de peptídeos únicos dentro da amostra (ver, por exemplo, Figuras 12-14).

[001128] Em algumas modalidades, a caracterização fenotípica é examinada depois da crioconservação.

XIV. Modalidades adicionais do processo

[001129] Em algumas modalidades, a invenção provê um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs compreendendo: (a) obter uma primeira população de TILs de um ou mais fragmentos ou amostras do tumor de um indivíduo; (b) realizar uma primeira expansão de preparação cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2 e OKT-3, em que a primeira expansão de preparação é realizada por aproximadamente 1 a 17 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número maior do que a primeira população de TILs; (c) realizar uma segunda expansão rápida colocando a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura celular compreendendo IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) exógenas para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por aproximadamente 1 a 11 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e (d) coletar a população terapêutica de TILs obtida na etapa (c). Em algumas modalidades, a etapa de segunda expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir um escalonamento vertical da cultura: (1) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da segunda população de TILs em uma cultura em pequena

escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (2) efetuando a transferência da segunda população de TILs da cultura em pequena escala para um segundo recipiente maior do que o primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 500MCS, em que, no segundo recipiente, a segunda população de TILs da cultura em pequena escala é cultivada em uma cultura em escala maior por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal da cultura: (1) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da segunda população de TILs em uma primeira cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (2) efetuando a transferência e repartindo a segunda população de TILs da primeira cultura em pequena escala para e entre pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 segundo recipientes, cujo tamanho é igual ao do primeiro recipiente, em que, em cada segundo recipiente, a parte da segunda população de TILs da primeira cultura em pequena escala transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma segunda cultura em pequena escala por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal e vertical da cultura: (1) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da segunda população de TILs em uma cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (2) efetuando a transferência e repartindo a segunda população de TILs da primeira cultura em pequena escala para e entre pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundo recipientes, cujo tamanho é maior do que o do primeiro recipiente, p. ex., recipientes G-REX 500MCS, em que, em cada

segundo recipiente, a parte da segunda população de TILs transferida da cultura em pequena escala para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura em escala maior por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal e vertical da cultura: (1) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da segunda população de TILs em uma cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 4 dias e, depois (2) efetuando a transferência e repartindo a segunda população de TILs da primeira cultura em pequena escala para e entre 2, 3 ou 4 segundo recipientes, cujo tamanho é maior do que o do primeiro recipiente, p. ex., recipientes G-REX 500MCS, em que, em cada segundo recipiente, a parte da segunda população de TILs transferida da cultura em pequena escala para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura em escala maior por um período de aproximadamente 5 dias.

[001130] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada colocando a primeira população de TILs em contato com um meio de cultura que compreende ainda células apresentadoras de antígeno (APCs) exógenas, em que o número de APCs no meio de cultura na etapa (c) é superior ao número de APCs no meio de cultura na etapa (b).

[001131] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), o meio de cultura é suplementado com APCs exógenas adicionais.

[001132] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APCs adicionadas na segunda

expansão rápida para o número de APCs adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 20:1.

[001133] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 10:1.

[001134] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 9:1.

[001135] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 8:1.

[001136] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 7:1.

[001137] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 6:1.

[001138] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em

qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 5:1.

[001139] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 4:1.

[001140] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 3:1.

[001141] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,9:1.

[001142] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,8:1.

[001143] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,7:1.

[001144] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,6:1.

[001145] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,5:1.

[001146] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,4:1.

[001147] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,3:1.

[001148] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,2:1.

[001149] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre

um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2,1:1.

[001150] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 1,1:1 a igual ou próximo a 2:1.

[001151] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 10:1.

[001152] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 5:1.

[001153] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 4:1.

[001154] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 3:1.

[001155] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão

rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,9:1.

[001156] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,8:1.

[001157] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,7:1.

[001158] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,6:1.

[001159] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,5:1.

[001160] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,4:1.

[001161] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,3:1.

[001162] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,2:1.

[001163] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é selecionada dentre um intervalo de igual ou próximo a 2:1 a igual ou próximo a 2,1:1.

[001164] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é igual ou próxima a 2:1.

[001165] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APC adicionadas na segunda expansão rápida para o número de APC adicionadas na etapa (b) é igual ou próximo a 1,1:1; 1,2:1; 1,3:1; 1,4:1; 1,5:1; 1,6:1; 1,7:1; 1,8:1; 1,9:1; 2:1; 2,1:1; 2,2:1; 2,3:1; 2,4:1; 2,5:1; 2,6:1; 2,7:1; 2,8:1; 2,9:1; 3:1; 3,1:1; 3,2:1; 3,3:1; 3,4:1; 3,5:1; 3,6:1; 3,7:1; 3,8:1; 3,9:1; 4:1; 4,1:1; 4,2:1; 4,3:1; 4,4:1; 4,5:1; 4,6:1; 4,7:1; 4,8:1; 4,9:1 ou 5:1.

[001166] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número de APC adicionadas na primeira expansão primária

é igual ou próximo a 1 x 10^8, 1,1 x 10^8, 1,2 x 10^8, 1,3 x 10^8, 1,4 x 10^8, 1,5 x 10^8, 1,6 x 10^8, 1,7 x 10^8, 1,8 x 10^8, 1,9 x 10^8, 2 x 10^8, 2,1 x 10^8, 2,2 x 10^8, 2,3 x 10^8, 2,4 x 10^8, 2,5 x 10^8, 2,6 x 10^8, 2,7 x 10^8, 2,8 x 10^8, 2,9 x 10^8, 3 x 10^8, 3,1 x 10^8, 3,2 x 10^8, 3,3 x 10^8, 3,4 x 10^8 ou 3,5 x 10^8 APCs, tal que o número de APC adicionadas na segunda expansão rápida é igual ou próximo a 3,5 x 10^8, 3,6 x 10^8, 3,7 x 10^8, 3,8 x 10^8, 3,9 x 10^8, 4 x 10^8, 4,1 x 10^8, 4,2 x 10^8, 4,3 x 10^8, 4,4 x 10^8, 4,5 x 10^8, 4,6 x 10^8, 4,7 x 10^8, 4,8 x 10^8, 4,9 x 10^8, 5 x 10^8, 5,1 x 10^8, 5,2 x 10^8, 5,3 x 10^8, 5,4 x 10^8, 5,5 x 10^8, 5,6 x 10^8, 5,7 x 10^8, 5,8 x 10^8, 5,9 x 10^8, 6 x 10^8, 6,1 x 10^8, 6,2 x 10^8, 6,3 x 10^8, 6,4 x 10^8, 6,5 x 10^8, 6,6 x 10^8, 6,7 x 10^8, 6,8 x 10^8, 6,9 x 10^8, 7 x 10^8, 7,1 x 10^8, 7,2 x 10^8, 7,3 x 10^8, 7,4 x 10^8, 7,5 x 10^8, 7,6 x 10^8, 7,7 x 10^8, 7,8 x 10^8, 7,9 x 10^8, 8 x 10^8, 8,1 x 10^8, 8,2 x 10^8, 8,3 x 10^8, 8,4 x 10^8, 8,5 x 10^8, 8,6 x 10^8, 8,7 x 10^8, 8,8 x 10^8, 8,9 x 10^8, 9 x 10^8, 9,1 x 10^8, 9,2 x 10^8, 9,3 x 10^8, 9,4 x 10^8, 9,5 x 10^8, 9,6 x 10^8, 9,7 x 10^8, 9,8 x 10^8, 9,9 x 10^8 ou 1 x 10^9 APCs.

[001167] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número de APC adicionadas na primeira expansão primária é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 1 x 10^8 APCs a igual ou próximo a 3,5 x 10^8 APCs, e em que o número de APC adicionadas na segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 3,5 x 10^8 APCs a igual ou próximo a 1 x 10^9 APCs.

[001168] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número de APC adicionadas na primeira expansão primária é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 1,5 x 10^8 APCs a igual ou próximo a 3 x 10^8 APCs, e em que o número de APC adicionadas na segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 4 x 10^8 APCs a igual ou próximo a 7,5 x 10^8 APCs.

[001169] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em

qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número de APC adicionadas na primeira expansão primária é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 2 x 10^8 APCs a igual ou próximo a 2,5 x 10^8 APCs, e em que o número de APC adicionadas na segunda expansão rápida é selecionado dentre o intervalo de igual ou próximo a 4,5 x 10^8 APCs a igual ou próximo a 5,5 x 10^8 APCs.

[001170] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que 2,5 x 10^8 APCs, ou próximo, são adicionadas à primeira expansão primária e 5 x 10^8 APCs, ou próximo, são adicionadas à segunda expansão rápida.

[001171] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as células apresentadoras de antígeno são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[001172] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos do tumor sejam distribuídos em uma pluralidade de recipientes separados, em que, cada um desses recipientes separados, a primeira população de TILs é obtida na etapa (a), a segunda população de TILs é obtida na etapa (b) e a terceira população de TILs é obtida na etapa (c), e as populações terapêuticas de TILs da pluralidade of recipientes na etapa (c) são combinadas para produzir a população de TILs coletados da etapa (d).

[001173] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a primeira população de TILs é obtida a partir de múltiplos fragmentos ou amostras do tumor do indivíduo na etapa (a).

[001174] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em

qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos tumores são distribuídos uniformemente na pluralidade de recipientes separados.

[001175] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a pluralidade de recipientes separados compreende pelo menos dois recipientes separados.

[001176] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a vinte recipientes separados.

[001177] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a quinze recipientes separados.

[001178] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a dez recipientes separados.

[001179] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a cinco recipientes separados.

[001180] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a pluralidade de recipientes separados compreende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 recipientes separados.

[001181] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

de tal modo que, para cada recipiente no qual a primeira expansão de preparação é realizada em uma primeira população de TILs na etapa (b), a segunda expansão rápida na etapa (c) é realizada no mesmo recipiente na segunda população de TILs produzidos a partir de tal primeira população de TILs.

[001182] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada um dos recipientes separados compreende uma primeira área de superfície permeável a gases.

[001183] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos do tumor são distribuídos em um único recipiente.

[001184] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o único recipiente compreende uma primeira área de superfície permeável a gases.

[001185] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de uma camada de células e igual ou próxima a três camadas de células.

[001186] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 1,5 camada de células e igual ou próxima à de 2,5 camadas de células.

[001187] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 2 camadas de células.

[001188] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 1; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9 ou 3 camadas de células.

[001189] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 3 camadas de células e igual ou próxima à de 10 camadas de células.

[001190] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 4 camadas de células e igual ou próxima à de 8 camadas de células.

[001191] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[001192] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 4; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 ou 8 camadas de células.

[001193] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão de preparação é realizada em um primeiro recipiente compreendendo uma primeira área de superfície permeável a gases e, na etapa (c), a segunda expansão rápida é realizada in a segundo recipiente compreendendo uma segunda área de superfície permeável a gases.

[001194] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o segundo recipiente é maior do que o primeiro recipiente.

[001195] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão de preparação é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de uma camada de células e igual ou próxima a três

camadas de células.

[001196] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 1,5 camada de células e igual ou próxima à de 2,5 camadas de células.

[001197] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 2 camadas de células.

[001198] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável, modificado de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 1; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8, 2,9 ou 3 camadas de células.

[001199] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 3 camadas de células e igual ou próxima à de 10 camadas de células.

[001200] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 4 camadas de células e igual ou próxima à de 8

camadas de células.

[001201] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[001202] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 4; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 ou 8 camadas de células.

[001203] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão de preparação é realizada em um primeiro recipiente compreendendo uma primeira área de superfície permeável a gases e, na etapa (c), a segunda expansão rápida é realizada no primeiro recipiente.

[001204] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de uma camada de células e igual ou próxima a três camadas de células.

[001205] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 1,5 camada de células e igual ou próxima à de 2,5 camadas de células.

[001206] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 2 camadas de células.

[001207] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 1; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9 ou 3 camadas de células.

[001208] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 3 camadas de células e igual ou próxima à de 10 camadas de células.

[001209] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média entre igual ou próxima à de 4 camadas de células e igual ou próxima à de 8 camadas de células.

[001210] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[001211] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (c), as APCs estão dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gases com uma espessura média igual ou próxima à de 4; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 ou 8 camadas de células.

[001212] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:10.

[001213] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas

em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:9.

[001214] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:8.

[001215] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:7.

[001216] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na

etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:6.

[001217] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:5.

[001218] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:4.

[001219] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de

APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:3.

[001220] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,1 a igual ou próximo a 1:2.

[001221] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,2 a igual ou próximo a 1:8.

[001222] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com

células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,3 a igual ou próximo a 1:7.

[001223] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,4 a igual ou próximo a 1:6.

[001224] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,5 a igual ou próximo a 1:5.

[001225] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada

suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,6 a igual ou próximo a 1:4.

[001226] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,7 a igual ou próximo a 1:3,5.

[001227] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,8 a igual ou próximo a 1:3.

[001228] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:1,9 a igual ou próximo a 1:2,5.

[001229] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1:2.

[001230] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira expansão primária é realizada suplementando o meio de cultura celular da primeira população de TILs com células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, em que o número de APC adicionadas na etapa (c) é superior ao número de APC adicionadas na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs dispostas em camadas na etapa (c) é selecionada dentre igual ou próxima a 1:1,1; 1:1,2; 1:1,3; 1:1,4; 1:1,5; 1:1,6; 1:1,7; 1:1,8; 1:1,9; 1:2; 1:2,1; 1:2,2; 1:2,3; 1:2,4; 1:2,5; 1:2,6; 1:2,7; 1:2,8; 1:2,9; 1:3; 1:3,1; 1:3,2; 1:3,3; 1:3,4; 1:3,5; 1:3,6;

1:3,7; 1:3,8; 1:3,9; 1:4; 1:4,1; 1:4,2; 1:4,3; 1:4,4; 1:4,5; 1:4,6; 1:4,7; 1:4,8; 1:4,9; 1:5; 1:5,1; 1:5,2; 1:5,3; 1:5,4; 1:5,5; 1:5,6; 1:5,7; 1:5,8; 1:5,9; 1:6; 1:6,1; 1:6,2; 1:6,3; 1:6,4; 1:6,5; 1:6,6; 1:6,7; 1:6,8; 1:6,9; 1:7; 1:7,1; 1:7,2; 1:7,3; 1:7,4; 1:7,5; 1:7,6; 1:7,7; 1:7,8; 1:7,9; 1:8; 1:8,1; 1:8,2; 1:8,3; 1:8,4; 1:8,5; 1:8,6; 1:8,7; 1:8,8; 1:8,9; 1:9; 1:9,1; 1:9,2; 1:9,3; 1:9,4; 1:9,5; 1:9,6; 1:9,7; 1:9,8; 1:9,9 ou 1:10.

[001231] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de TILs na segunda população de TILs para o número de TILs na primeira população de TILs é igual ou próxima a 1.5:1 a igual ou próximo a 100:1.

[001232] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de TILs na segunda população de TILs para o número de TILs na primeira população de TILs é igual ou próxima a 50:1.

[001233] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de TILs na segunda população de TILs para o número de TILs na primeira população de TILs é igual ou próxima a 25:1.

[001234] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de TILs na segunda população de TILs para o número de TILs na primeira população de TILs é igual ou próxima a 20:1.

[001235] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de TILs na segunda população de TILs

para o número de TILs na primeira população de TILs é igual ou próxima a 10:1.

[001236] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a segunda população de TILs é pelo menos igual ou próxima a 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs.

[001237] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a segunda população de TILs é pelo menos igual ou próxima a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs.

[001238] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que em ou próximo a 2 dias ou em ou próximo a 3 dias depois do início do segundo período na etapa (c), o meio de cultura celular é suplementado com IL-2 adicional.

[001239] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado para compreender ainda a etapa de crioconservação da população de TILs coletados na etapa (d) utilizando um processo de crioconservação.

[001240] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado para compreender realizar, depois da etapa (d), a etapa adicional de (e) transferir a população de TILs coletados na etapa (d) para uma bolsa de infusão que contém opcionalmente HyperThermosol.

[001241] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

para compreender a etapa de crioconservação da bolsa de infusão compreendendo a população de TILs coletados na etapa (e) utilizando um processo de crioconservação.

[001242] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o processo de crioconservação é realizado usando uma razão 1:1 de população de TILs coletados para meio de crioconservação.

[001243] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as células apresentadoras de antígeno são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[001244] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

[001245] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número total de APC adicionadas à cultura celular na etapa (b) é $2,5 \times 10^8$.

[001246] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número total de APC adicionadas à cultura celular na etapa (c) é 5×10^8.

[001247] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as APCs são PBMCs.

[001248] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

[001249] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em

qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as células apresentadoras de antígeno são células apresentadoras de antígeno artificiais.

[001250] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a coleta na etapa (d) é realizada usando um sistema de processamento de células baseado em membrana.

[001251] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a coleta na etapa (d) é realizada utilizando um sistema LOVO para o processamento das células.

[001252] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 5 e igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001253] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 10 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001254] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 15 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001255] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou

próximo de 20 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001256] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 25 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001257] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 30 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001258] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 35 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001259] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 40 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001260] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 45 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001261] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendem entre igual ou próximo de 50 e entre igual ou próximo de 60 amostras ou fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001262] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as múltiplas amostras ou fragmentos compreendem igual ou próximo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ou 60 amostras ou fragmento(s) por recipiente na etapa (b).

[001263] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada amostra ou fragmento tem um volume igual ou próximo de 1 mm^3.

[001264] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada amostra ou fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo de 10 mm^3.

[001265] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada amostra ou fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo de 9 mm^3.

[001266] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo a 8 mm^3.

[001267] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1

mm^3 e igual ou próximo a 7 mm^3.

[001268] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo a 6 mm^3.

[001269] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo a 5 mm^3.

[001270] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo a 4 mm^3.

[001271] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo a 3 mm^3.

[001272] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume entre igual ou próximo de 1 mm^3 e igual ou próximo a 2 mm^3.

[001273] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tem um volume igual ou próximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mm^3.

[001274] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o meio de cultura celular é fornecido em um recipiente que é um recipiente G ou uma Cellbag Xuri.

[001275] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a concentração de IL-2 no meio de cultura celular é entre aproximadamente 10.000 UI/mL e 5.000 UI/mL.

[001276] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a concentração de IL-2 no meio de cultura celular é aproximadamente 6.000 UI/mL.

[001277] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o meio de crioconservação compreende dimetilsulfóxido (DMSO).

[001278] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o meio de crioconservação compreende DMSO 7% a 10%.

[001279] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o primeiro período na etapa (b) é realizada dentro de um período de igual ou próximo 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, 14 dias, 15 dias, 16 dias ou 17 dias.

[001280] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o segundo período na etapa (c) é realizada dentro um período de igual ou próximo de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias ou 11 dias.

[001281] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa

(c) são realizados, cada um individualmente, dentro de um período de igual ou próximo de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias,11 dias ou 12 dias.

[001282] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) são realizados, cada um individualmente, dentro de um período de igual ou próximo de 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, ou 12 dias.

[001283] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) são realizados, cada um individualmente, dentro de um período de igual ou próximo de 7 dias.

[001284] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 14 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001285] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 15 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001286] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 16 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001287] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 17 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001288] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 18 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001289] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 19 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001290] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 20 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001291] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 21 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001292] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 22 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001293] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 23 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001294] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 24 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001295] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em

qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 25 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001296] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 26 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001297] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, entre 27 dias ou quase e 28 dias ou quase.

[001298] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase14 dias.

[001299] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 15 dias.

[001300] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 16 dias.

[001301] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 17 dias.

[001302] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado

de tal modo que etapas as (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 18 dias.

[001303] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 19 dias.

[001304] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 20 dias.

[001305] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 21 dias.

[001306] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 22 dias.

[001307] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 23 dias.

[001308] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 24 dias.

[001309] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 25

dias.

[001310] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 26 dias.

[001311] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 27 dias.

[001312] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou quase 28 dias.

[001313] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou menos de 16 dias.

[001314] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou menos de 20 dias.

[001315] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou menos de 24 dias.

[001316] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as etapas (a) a (d) são realizadas, no total, em ou menos de 28 dias.

[001317] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a população terapêutica de TILs colhidos na etapa (d) compreende TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001318] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número de TILs suficiente para uma dose terapeuticamente eficaz é entre igual ou próxima de $2,3x10^{10}$ e igual ou próximo de $13,7x10^{10}$.

[001319] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a terceira população de TILs na etapa (c) propicia eficácia aumentada, produção aumentada de interferon-gama e/ou policlonalidade aumentada.

[001320] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a terceira população de TILs na etapa (c) propicia pelo menos de uma a cinco vezes ou mais produção de interferon-gama em comparação a TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[001321] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da terceira população de TILs na etapa (c) exibem expressão aumentada de CD8 e CD28 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células na etapa (b).

[001322] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada recipiente mencionado no método é um recipiente fechado.

[001323] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada recipiente mencionado no método é um recipiente G.

[001324] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada recipiente mencionado no método é um GREX-10.

[001325] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada recipiente mencionado no método é um GREX-100.

[001326] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada recipiente mencionado no método é um GREX-500.

[001327] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica of linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) produzidas pelo método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima.

[001328] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparadas a partir do tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs propicia eficácia aumentada, produção aumentada de interferon-gama e/ou policlonalidade aumentada quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer células apresentadoras de antígeno (APCs) ou OKT3 adicionados.

[001329] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir do tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs propicia eficácia aumentada, produção aumentada de interferon-gama e/ou policlonalidade aumentada quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionadas.

[001330] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir do tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs propicia eficácia aumentada, produção aumentada de interferon-gama e/ou policlonalidade aumentada quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[001331] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir do tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs propicia eficácia aumentada, produção aumentada de interferon-gama e/ou policlonalidade aumentada quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionadas e sem OKT3 adicionado.

[001332] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir do tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs propicia eficácia aumentada, produção aumentada de interferon-gama e/ou policlonalidade aumentada quando comparada a TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[001333] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima que propicia produção aumentada de interferon-gama.

[001334] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima que propicia policlonalidade aumentada.

[001335] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores,

conforme aplicável acima que propicia eficácia aumentada.

[001336] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que a população terapêutica de TILs é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos uma vez maior, quando comparada a TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[001337] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que a população terapêutica de TILs é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos duas vezes maior, quando comparada a TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[001338] Em outra modalidade, a invenção provê for the população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima modificada de tal modo que a população terapêutica de TILs é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos três vezes maior, quando comparada a TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[001339] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos uma vez maior, quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionadas.

[001340] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos uma vez maior, quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é

realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[001341] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de TILs que é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos duas vezes maior, quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas.

[001342] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de TILs que é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos duas vezes maior, quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[001343] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de TILs que é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos três vezes maior, quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas.

[001344] Em outra modalidade, a invenção provê uma população terapêutica de TILs que é capaz de uma produção de interferon-gama pelo menos três vezes maior, quando comparada a TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[001345] Em outra modalidade, a invenção provê um método para expansão de células T compreendendo: (a) realizar uma primeira expansão de preparação de uma primeira população de células T, obtidas de um fragmento ou amostra de tumor obtido de um doador, cultivando a primeira população de células T para efetuar o crescimento e preparar uma ativação da primeira população de células T; (b) depois que a ativação da primeira população de células T preparada na etapa (a) começar a decair, realizar uma segunda expansão rápida da primeira população de células T, cultivando a primeira

população de células T para efetuar o crescimento e reforçar a ativação da primeira população de células T e obter uma segunda população de células T; e (c) coletar a segunda população de T células. Em outra modalidade, a etapa de segunda expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir um escalonamento vertical da cultura: (a) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da primeira população de células T em uma cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência da primeira população de células T da cultura em pequena escala para um segundo recipiente maior do que o primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 500MCS, e cultivar a primeira população de células T da cultura em pequena escala em uma cultura em escala maior no segundo recipiente por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em outra modalidade, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal da cultura: (a) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da primeira população de células T em uma primeira cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência e repartindo a primeira população de células T da primeira cultura em pequena escala para e entre pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 segundo recipientes, cujo tamanho é igual ao do primeiro recipiente, em que, em cada segundo recipiente, a parte da primeira população de células T da primeira cultura em pequena escala transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma segunda cultura em pequena escala por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em outra modalidade, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal e vertical da cultura: (a) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da primeira população de células T em uma

cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 3 a 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência e repartindo a primeira população de células T da cultura em pequena escala para e entre pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 segundo recipientes, cujo tamanho é maior do que o do primeiro recipiente, p. ex., recipientes G-REX 500MCS, em que, em cada segundo recipiente, a parte da primeira população de células T da cultura em pequena escala transferida de tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura em escala maior por um período de aproximadamente 4 a 7 dias. Em outra modalidade, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para conseguir o escalonamento horizontal e vertical da cultura: (a) realizando a segunda expansão rápida pelo cultivo da primeira população de células T em uma cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, p. ex., um recipiente G-REX 100MCS, por um período de aproximadamente 4 dias e, depois (b) efetuando a transferência e repartindo a primeira população de células T da cultura em pequena escala para e entre 2, 3 ou 4 segundo recipientes, cujo tamanho é maior do que o do primeiro recipiente, p. ex., recipientes G-REX 500MCS, em que, em cada segundo recipiente, a parte da primeira população de células T da cultura em pequena escala transferida de tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura em escala maior por um período de aproximadamente 5 dias.

[001346] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a primeira expansão de preparação da etapa (a) é realizada durante um período de até 17 dias.

[001347] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 11 dias.

[001348] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a primeira expansão de preparação na etapa (a) é realizada durante um período de 17 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 9 dias.

[001349] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de células T é cultivada em um primeiro meio de cultura compreendendo OKT-3 e IL-2.

[001350] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o primeiro meio de cultura compreende OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

[001351] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a primeira população de células T é cultivada em um segundo meio de cultura compreendendo OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

[001352] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de células T é cultivada em um primeiro meio de cultura em um recipiente compreendendo uma primeira superfície permeável a gases, em que o primeiro meio de cultura compreende OKT-3, IL-2 e a primeira população de células apresentadoras de antígeno (APCs), em que a primeira população de APCs é exógena para o doador da primeira população de células T e a primeira população de APCs é disposta em camadas sobre a primeira superfície permeável a gases, em que, na etapa (b), a primeira população de células T é cultivada em um segundo meio de cultura no recipiente, em que o segundo meio de cultura compreende

OKT-3, IL-2 e uma segunda população de APCs, em que a segunda população de APCs é exógena para o doador da primeira população de células T e a segunda população de APCs é disposta em camadas sobre a primeira superfície permeável a gases, e em que a segunda população de APCs é superior à primeira população de APCs.

[001353] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número de APCs na segunda população de APCs para o número de APCs na primeira população de APCs é aproximadamente 2:1.

[001354] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o número de APCs na primeira população de APCs é aproximadamente 2,5 x 10^8 e o número de APCs na segunda população de APCs é aproximadamente 5 x 10^8.

[001355] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é disposta em camadas sobre a primeira superfície permeável a gases com uma espessura média de 2 camadas de APCs.

[001356] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a segunda população de APCs é disposta em camadas sobre a primeira superfície permeável a gases com uma espessura média selecionada dentre o intervalo de 4 a 8 camadas de APCs.

[001357] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que a razão do número médio de camadas de APCs dispostas em camadas sobre a primeira superfície permeável a gases na etapa (b) para o

número médio de camadas de APCs dispostas em camadas sobre a primeira superfície permeável a gases na etapa (a) é 2:1.

[001358] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 4,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[001359] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[001360] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 2,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[001361] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade igual ou próxima a 2,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[001362] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o

intervalo de igual ou próximo a 2,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 7,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[001363] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 6,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[001364] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 4,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 5,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[001365] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade igual ou próxima a 4,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[001366] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 4,5 x 10^6 APCs/cm^2 e, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 2,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 7,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[001367] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em

qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 1,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2 e, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 3,5 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 6,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[001368] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 2,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 3,0 x 10^6 APCs/cm^2 e, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade selecionada dentre o intervalo de igual ou próximo a 4,0 x 10^6 APCs/cm^2 a igual ou próximo a 5,5 x 10^6 APCs/cm^2.

[001369] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, na etapa (a), a primeira população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade igual ou próxima a 2,0 x 10^6 APCs/cm^2 e, na etapa (b), a segunda população de APCs é semeada sobre a primeira superfície permeável a gases a uma densidade igual ou próxima a 4,0 x 10^6 APCs/cm^2.

[001370] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[001371] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em

qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as PBMCs são irradiadas e exógenas para o doador da primeira população de T células.

[001372] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as células T are linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), a primeira população de células T é uma primeira população de TILs na etapa (a), a segunda população de células T é uma segunda população de TILs na etapa (b), a segunda população de TILs é uma população terapêutica de TILs e a população terapêutica de TILs é colhida na etapa (c).

[001373] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que as células T são linfócitos infiltrantes da medula (MILs).

[001374] Em outra modalidade, a invenção provê o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o fenótipo das células T é CD3+ e CD45+.

XV. Composições farmacêuticas, doses e esquemas de administração

[001375] Em uma modalidade, TILs expandidos pelos métodos da presente invenção 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 invenção podem ser administrados por qualquer via adequada conhecida na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas em uma infusão intra-arterial ou intravenosa única, que preferivelmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem administração intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[001376] Qualquer dose adequada de TILs pode ser administrada. Em algumas modalidades, entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$ TILs são

administrados, em média, por volta de $7,8x10^{10}$ TILs, especialmente se o câncer é melanoma. Em uma modalidade, entre aproximadamente $1,2x10^{10}$ e $4,3x10^{10}$ de TILs são administrados. Em algumas modalidades, entre aproximadamente $3x10^{10}$ e $12x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, entre aproximadamente $4x10^{10}$ e $10x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, entre aproximadamente $5x10^{10}$ e $8x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, entre aproximadamente $6x10^{10}$ e $8x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, entre aproximadamente $7x10^{10}$ e $8x10^{10}$ TILs são administrados. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é aproximadamente $7,8x10^{10}$ TILs, especialmente se o câncer é melanoma. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $1,2x10^{10}$ e $4,3x10^{10}$ de TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $3x10^{10}$ e $12x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $4x10^{10}$ e $10x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $5x10^{10}$ e $8x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $6x10^{10}$ e $8x10^{10}$ TILs. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $7x10^{10}$ e $8x10^{10}$ TILs.

[001377] Em algumas modalidades, o número dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é aproximadamente $1x10^{6}$, $2x10^{6}$, $3x10^{6}$, $4x10^{6}$, $5x10^{6}$, $6x10^{6}$, $7x10^{6}$, $8x10^{6}$, $9x10^{6}$, $1x10^{7}$, $2x10^{7}$, $3x10^{7}$, $4x10^{7}$, $5x10^{7}$, $6x10^{7}$, $7x10^{7}$, $8x10^{7}$, $9x10^{7}$, $1x10^{8}$, $2x10^{8}$, $3x10^{8}$, $4x10^{8}$, $5x10^{8}$, $6x10^{8}$, $7x10^{8}$, $8x10^{8}$, $9x10^{8}$, $1x10^{9}$, $2x10^{9}$, $3x10^{9}$, $4x10^{9}$, $5x10^{9}$, $6x10^{9}$, $7x10^{9}$, $8x10^{9}$, $9x10^{9}$, $1x10^{10}$, $2x10^{10}$, $3x10^{10}$, $4x10^{10}$, $5x10^{10}$, $6x10^{10}$, $7x10^{10}$, $8x10^{10}$, $9x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, $2x10^{13}$,

$3x10^{13}$, $4x10^{13}$, $5x10^{13}$, $6x10^{13}$, $7x10^{13}$, $8x10^{13}$ e $9x10^{13}$. Em uma modalidade, o número dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está no intervalo de $1x10^{6}$ a $5x10^{6}$, $5x10^{6}$ a $1x10^{7}$, $1x10^{7}$ a $5x10^{7}$, $5x10^{7}$ a $1x10^{8}$, $1x10^{8}$ a $5x10^{8}$, $5x10^{8}$ a $1x10^{9}$, $1x10^{9}$ a $5x10^{9}$, $5x10^{9}$ a $1x10^{10}$, $1x10^{10}$ a $5x10^{10}$, $5x10^{10}$ a $1x10^{11}$, $5x10^{11}$ a $1x10^{12}$, $1x10^{12}$ a $5x10^{12}$ e $5x10^{12}$ a $1x10^{13}$.

[001378] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é inferior a, 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.

[001379] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é superior a 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 125%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% p/p, p/v, ou v/v da composição farmacêutica,

Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está no intervalo entre aproximadamente 0,0001% e 50%, entre aproximadamente 0,001% e 40%, entre aproximadamente 0,01% e 30%, entre aproximadamente 0,02% e 29%, entre aproximadamente 0,03% e 28%, entre aproximadamente 0,04% e 27%, entre aproximadamente 0,05% e 26%, entre aproximadamente 0,06% e 25%, entre aproximadamente 0,07% e 24%, entre aproximadamente 0,08% e 23%, entre aproximadamente 0,09% e 22%, entre aproximadamente 0,1% e 21%, entre aproximadamente 0,2% e 20%, entre aproximadamente 0,3% e 19%, entre aproximadamente 0,4% e 18%, entre aproximadamente 0,5% e 17%, entre aproximadamente 0,6% e 16%, entre aproximadamente 0,7% e 15%, entre aproximadamente 0,8% e 14%, entre aproximadamente 0,9% e 12% ou entre aproximadamente 1% e 10% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001380] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está no intervalo entre aproximadamente 0,001% e 10%, entre aproximadamente 0,01% e 5%, entre aproximadamente 0,02% e 4,5%, entre aproximadamente 0,03% e 4%, entre aproximadamente 0,04% e 3,5%, entre aproximadamente 0,05% e 3%, entre aproximadamente 0,06% e 2,5%, entre aproximadamente 0,07% e 2%, entre aproximadamente 0,08% e 1,5%, entre aproximadamente 0,09% e 1%, entre aproximadamente 0,1% e 0,9% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001381] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é igual ou inferior a 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009

g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g ou 0,0001 g.

[001382] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é superior a 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g, 0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04 g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5, 3 g, 3,5, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g ou 10 g.

[001383] Os TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção são eficazes em uma ampla faixa de dose. A dose exata dependerá da via de administração, a forma na qual o composto é administrado, o sexo e a idade do indivíduo a ser tratado, o peso corporal do indivíduo a ser tratado e a preferência e experiência do médico atendente. As doses clinicamente estabelecidas dos TILs podem também ser usadas, se apropriadas. As quantidades das composições farmacêuticas administradas pelos métodos presentes, tais como as doses de TILs, dependerão do humano ou mamífero em tratamento, da gravidade do transtorno ou condição, da taxa de administração, da disposição dos ingredientes farmacêuticos ativos e ao critério do médico prescritor.

[001384] Em algumas modalidades, TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser por injeção, p. ex., injeção intravenosa. Em algumas modalidades, TILs podem ser administrados em doses múltiplas. A administração pode ser uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais de seis vezes ao ano. A administração pode ser uma vez ao mês, uma vez a cada duas semanas, uma

vez por semana ou uma vez de dois em dois dias. A administração de TILs pode continuar enquanto necessário.

[001385] Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs é aproximadamente $1x10^6$, $2x10^6$, $3x10^6$, $4x10^6$, $5x10^6$, $6x10^6$, $7x10^6$, $8x10^6$, $9x10^6$, $1x10^7$, $2x10^7$, $3x10^7$, $4x10^7$, $5x10^7$, $6x10^7$, $7x10^7$, $8x10^7$, $9x10^7$, $1x10^8$, $2x10^8$, $3x10^8$, $4x10^8$, $5x10^8$, $6x10^8$, $7x10^8$, $8x10^8$, $9x10^8$, $1x10^9$, $2x10^9$, $3x10^9$, $4x10^9$, $5x10^9$, $6x10^9$, $7x10^9$, $8x10^9$, $9x10^9$, $1x10^{10}$, $2x10^{10}$, $3x10^{10}$, $4x10^{10}$, $5x10^{10}$, $6x10^{10}$, $7x10^{10}$, $8x10^{10}$, $9x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, $2x10^{13}$, $3x10^{13}$, $4x10^{13}$, $5x10^{13}$, $6x10^{13}$, $7x10^{13}$, $8x10^{13}$ e $9x10^{13}$. Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs está no intervalo de $1x10^6$ a $5x10^6$, $5x10^6$ a $1x10^7$, $1x10^7$ a $5x10^7$, $5x10^7$ a $1x10^8$, $1x10^8$ a $5x10^8$, $5x10^8$ a $1x10^9$, $1x10^9$ a $5x10^9$, $5x10^9$ a $1x10^{10}$, $1x10^{10}$ a $5x10^{10}$, $5x10^{10}$ a $1x10^{11}$, $5x10^{11}$ a $1x10^{12}$, $1x10^{12}$ a $5x10^{12}$ e $5x10^{12}$ a $1x10^{13}$.

[001386] Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs está no intervalo entre aproximadamente 0,01 mg/kg e 4,3 mg/kg, entre aproximadamente 0,15 mg/kg e 3,6 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 mg/kg e 3,2 mg/kg, entre aproximadamente 0,35 mg/kg e 2,85 mg/kg, entre aproximadamente 0,15 mg/kg e 2,85 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 mg e 2,15 mg/kg, entre aproximadamente 0,45 mg/kg e 1,7 mg/kg, entre aproximadamente 0,15 mg/kg e 1,3 mg/kg, entre aproximadamente 0,3 mg/kg e 1,15 mg/kg, entre aproximadamente 0,45 mg/kg e 1 mg/kg, entre aproximadamente 0,55 mg/kg e 0,85 mg/kg, entre aproximadamente 0,65 mg/kg e 0,8 mg/kg, entre aproximadamente 0,7 mg/kg e 0,75 mg/kg, entre aproximadamente 0,7 mg/kg e 2,15 mg/kg, entre aproximadamente 0,85 mg/kg e 2 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg e 1,85 mg/kg, entre aproximadamente 1,15 mg/kg e 1,7 mg/kg, entre aproximadamente 1,3 mg/kg mg e 1,6 mg/kg, entre aproximadamente 1,35 mg/kg e 1,5 mg/kg, entre aproximadamente 2,15 mg/kg e 3,6 mg/kg, entre aproximadamente 2,3 mg/kg

e 3,4 mg/kg, entre aproximadamente 2,4 mg/kg e 3,3 mg/kg, entre aproximadamente 2,6 mg/kg e 3,15 mg/kg, entre aproximadamente 2,7 mg/kg e 3 mg/kg, entre aproximadamente 2,8 mg/kg e 3 mg/kg ou entre aproximadamente 2,85 mg/kg e 2,95 mg/kg,

Em algumas modalidades, uma dose eficaz de TILs está no intervalo entre aproximadamente 1 mg e 500 mg, entre aproximadamente 10 mg e 300 mg, entre aproximadamente 20 mg e 250 mg, entre aproximadamente 25 mg e 200 mg, entre aproximadamente 1 mg e 50 mg, entre aproximadamente 5 mg e 45 mg, entre aproximadamente 10 mg e 40 mg, entre aproximadamente 15 mg e 35 mg, entre aproximadamente 20 mg e 30 mg, entre aproximadamente 23 mg e 28 mg, entre aproximadamente 50 mg e 150 mg, entre aproximadamente 60 mg e 140 mg, entre aproximadamente 70 mg e 130 mg, entre aproximadamente 80 mg e 120 mg, entre aproximadamente 90 mg e 110 mg, ou entre aproximadamente 95 mg e 105 mg, entre aproximadamente 98 mg e 102 mg, entre aproximadamente 150 mg e 250 mg, entre aproximadamente 160 mg e 240 mg, entre aproximadamente 170 mg e 230 mg, entre aproximadamente 180 mg e 220 mg, entre aproximadamente 190 mg e 210 mg, entre aproximadamente 195 mg e 205 mg ou entre aproximadamente 198 e 207 mg.

[001387] Uma quantidade eficaz dos TILs pode ser administrada em uma dose única ou em múltiplas por qualquer um dos modos aceitos para administração de agentes de utilidades semelhantes, incluindo via intranasal e transdérmica, por injeção intra-arterial, via intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutânea, tópica, por transplante ou por inalação.

[001388] Em outra modalidade, a invenção provê uma bolsa de infusão compreendendo a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima.

[001389] Em outra modalidade, a invenção provê uma composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) que compreende a população terapêutica

de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[001390] Em outra modalidade, a invenção provê uma bolsa de infusão que compreende a composição de TIL descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima.

[001391] Em outra modalidade, a invenção provê um preparado da população terapêutica de TILs crioconservados descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima.

[001392] Em outra modalidade, a invenção provê uma composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) que compreende a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima e um meio de crioconservação.

[001393] Em outra modalidade, a invenção provê a composição de TIL descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o meio de crioconservação contém DMSO.

[001394] Em outra modalidade, a invenção provê a composição de TIL descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o meio de crioconservação contém DMSO 7-10%.

[001395] Em outra modalidade, a invenção provê um preparado da composição de TILs crioconservados descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima.

XVI. Métodos de tratamento de pacientes

[001396] Os métodos de tratamento começam com a coleta inicial de TIL e cultura de TILs. Tais métodos foram ambos descritos na técnica, por exemplo, por Jin *et al., J. Immunotherapy*, **2012**, 35(3):283-292, aqui incorporado, em sua totalidade, por referência. Modalidades de métodos of tratamento são descritas por todas as seções abaixo, incluindo os Exemplos.

[001397] Os TILs expandidos produzidos de acordo com os métodos aqui descrito, incluindo, por exemplo, como descritos nas etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também mostradas, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) encontram utilidade em particular no tratamento de pacientes com câncer (por exemplo, como descrito em Goff, *et al.*, *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34(20):2389-239, bem como no conteúdo suplementar; aqui incorporados, em sua totalidade, por referência. Em algumas modalidades, TIL foram cultivados a partir de depósitos ressecados de melanoma metastático como descrito anteriormente (ver, Dudley, *et al.*, *J Immunother.*, **2003**, 26:332-342; aqui incorporado, em sua totalidade, por referência). Tumor fresco pode ser dissecado sob condições estéreis. Uma amostra representativa pode ser coletada para análise patológica formal. Podem ser usados fragmentos isolados de 2 mm^3 a 3 mm^3. Em algumas modalidades, são obtidas 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 amostras por paciente. Em algumas modalidades, são obtidas 20, 25 ou 30 amostras por paciente. Em algumas modalidades, são obtidas 20, 22, 24, 26, ou 28 amostras por paciente. Em algumas modalidades, são obtidas 24 amostras por paciente. As amostras podem ser colocadas em cavidades individuais de uma placa com 24 cavidades, mantidas em meio de crescimento com dose alta de IL-2 (6.000 UI/mL) e monitoradas para destruição do tumor e/ou proliferação de TIL. Qualquer tumor com células viáveis que restarem após o processamento pode ser digerido enzimaticamente em uma única suspensão celular e crioconservada, como aqui descrito.

[001398] Em algumas modalidades, amostras de TILs cultivados com sucesso podem ser coletadas para análise do fenótipo (CD3, CD4, CD8 e CD56) e testadas contra tumor autólogo quando disponível. TIL podem ser considerados reativos se a cocultura durante a noite produzir níveis de interferon-gama (IFN-γ) > 200 pg/mL e duas vezes o nível de fundo (Goff, *et al.*, *J Immunother.*, **2010**, 33:840-847; aqui incorporada, em sua totalidade,

por referência). Em algumas modalidades, culturas com evidência de reatividade autóloga ou padrões suficientes de crescimento podem ser selecionadas para uma segunda expansão (por exemplo, uma segunda expansão como disposto de acordo com a Etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)), incluindo segundas expansões que são, às vezes, referidas como expansão rápida (REP). Em algumas modalidades, TILs expandidos com alta reatividade autóloga (por exemplo, alta proliferação durante uma segunda expansão) são selecionados para uma segunda expansão adicional. Em algumas modalidades, TILs com reatividade autóloga (por exemplo, alta proliferação durante a segunda expansão como disposto na etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B)) são selecionados para uma segunda expansão adicional de acordo com a Etapa D da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B).

[001399] Em algumas modalidades, o paciente não é encaminhado diretamente para ACT (transferência celular adotiva), por exemplo, em algumas modalidades, depois da coleta no tumor e/ou uma primeira expansão, pois as células não são utilizadas imediatamente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser crioconservados e descongelados 2 dias antes da administração a um paciente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser crioconservados e descongelados 1 dia antes da administração a um paciente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser crioconservados e descongelados imediatamente antes da administração a um paciente.

[001400] O fenótipo celular de amostras conservadas de TILs na bolsa de infusão pode ser analisado por citometria de fluxo (p. ex., FlowJo™) para os marcadores de superfície CD3, CD4, CD8, CCR7 e CD45RA (BD BioSciences), bem como por qualquer um dos métodos aqui descritos. Citocinas séricas foram medidas por técnicas padrão de ensaio imunoenzimático de absorção. Elevação em IFN-g sérica foi definida como >100 pg/mL e maior que 4 3 os níveis basais.

[001401] Em algumas modalidades, os TILs produzidos pelos métodos aqui providos, por exemplo, aqueles exemplificados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), proporcionam uma melhora surpreendente na eficácia clínica dos TILs. Em algumas modalidades, os TILs produzidos pelos métodos aqui providos, por exemplo, aqueles exemplificados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), exibiram eficácia clínica aumentada em comparação aos TILs produzidos por outros métodos que não aqueles aqui descritos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles exemplificados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, os métodos diferentes daqueles aqui descritos incluem métodos referidos como processo 1C e/ou Geração 1 (Gen 1). Em algumas modalidades, a eficácia aumentada é medida pela taxa de controle de doença (TCD), taxa de resposta global (TRG) e/ou outras respostas clínicas. Em algumas modalidades, os TILs produzidos pelos métodos aqui providos, por exemplo, aqueles exemplificados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) exibem tempo para resposta perfil de segurança semelhantes em comparação a TILs produzidos por outros métodos que não aqueles aqui descritos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles exemplificados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), por exemplo, o processo Gen 1.

[001402] Em algumas modalidades, IFN-gama (IFN-γ) é indicativo de eficácia do tratamento e/ou eficácia clínica aumentada. Em algumas modalidades, IFN-γ no sangue de indivíduos tratados com TILs é indicativo de TILs ativos. Em algumas modalidades, um ensaio de potência é empregado para produção de IFN-γ. A produção de IFN-γ é outra medida do potencial citotóxico. A produção de IFN-γ pode ser medida determinando os níveis da citocina IFN-γ no sangue, soro ou em TILs *ex vivo* de um indivíduo tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em

algumas modalidades, um aumento na IFN-γ é indicativo de eficácia do tratamento em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, IFN-γ é aumentado uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes ou mais em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada uma vez em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada duas vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada três vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada quatro vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada cinco vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos

diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, IFN-γ é medido por meio de um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido em TILs *ex vivo* de um indivíduo tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, IFN-γ é medido no sangue de um indivíduo tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, IFN-γ é medido em TILs séricos de um indivíduo tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B).

[001403] Em algumas modalidades, os TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) exibem policlonalidade aumentada em comparação a TILs produzidos por outros métodos, incluindo aqueles não exemplificados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), tais como, por exemplo, métodos referidos como métodos do processo 1C. Em algumas modalidades, policlonalidade significativamente melhorada e/ou policlonalidade aumentada é indicativa de eficácia do tratamento e/ou eficácia clínica aumentada. Em algumas modalidades, policlonalidade refere-se à diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, um aumento na policlonalidade pode ser indicativo de eficácia do tratamento em relação à administração dos TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada uma vez, duas vezes, dez vezes, 100 vezes, 500 vezes ou 1000 vezes em comparação a TILs preparados por métodos diferentes daqueles aqui providos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada uma

vez em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada duas vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada dez vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 100 vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 500 vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 1000-fold em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B).

[001404] As medidas de eficácia podem incluir a taxa de controle de doença (DCR) bem como taxa de resposta global (TRG), como conhecidas na

técnica bem como aqui descritas.

1. Métodos de tratamento de cânceres e outras doenças

[001405] As composições e métodos aqui descritos podem ser usados em um método para tratar doenças. Em uma modalidade, são usados para tratar transtornos hiperproliferativos. Podem também ser usados para tratar outros transtornos como aqui descrito e nos parágrafos seguintes.

[001406] Em algumas modalidades, o transtorno hiperproliferativo é câncer. Em algumas modalidades, o transtorno hiperproliferativo é um câncer de tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer de tumor sólido é selecionado dentre o grupo que consiste em glioblastoma (GBM), câncer gastrointestinal, melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo papilomavírus humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o transtorno hiperproliferativo é uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, o câncer de tumor sólido é selecionado dentre o grupo que consiste em leucemia linfocítica crônica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de grandes células B, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular e linfoma das células do manto.

[001407] Em algumas modalidades, o câncer é um fenótipo hipermutado de câncer. Cânceres hipermutados são extensamente descritos em Campbell, *et al.* (*Cell*, 171:1042-1056 (2017); aqui incorporado, em sua totalidade, por referência para todos os efeitos). Em algumas modalidades, tumores hipermutados compreendem entre 9 e 10 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, tumores pediátricos hipermutados compreendem 9,91 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, tumores hipermutados de adulto compreendem 9 mutações por megabase (Mb). Em

algumas modalidades, tumores hipermutados reforçados compreendem entre 10 e 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, tumores pediátricos hipermutados reforçados compreendem entre 10 e 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, tumores hipermutados reforçados de adulto compreendem entre 10 e 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, um tumor ultra-hipermutado compreende mais de 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, tumores pediátricos ultra-hipermutados compreendem mais de 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, tumores ultra-hipermutados de adulto compreendem mais de 100 mutações por megabase (Mb).

[001408] Em algumas modalidades, os tumores hipermutados exibem mutações em vias de reparo na replicação. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados exibem mutações em DNA polimerases associadas ao reparo na replicação. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados exibem instabilidade de microssatélites. Em algumas modalidades, os tumores ultra-hipermutados exibem mutações em DNA polimerases associadas ao reparo na replicação e instabilidade de microssatélites. Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor está correlacionada com a resposta a inibidores de *checkpoint* imunológico. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados são resistentes ao tratamento com inibidores de *checkpoint* imunológico. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados podem ser tratados com os TILs da presente invenção. Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor é causada por fatores ambientais (exposições extrínsecas). Por exemplo, luz UV pode ser a causa primária dos números elevados de mutações no melanoma maligno (ver, por exemplo, Pfeifer, G.P., You, Y.H., e Besaratinia, A. **(2005)**. *Mutat. Res.* 571, 19-31.; Sage, E. **(1993)**. *Photochem. Photobiol.* 57, 163-174.). Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor pode ser causada por mais de 60 carcinógenos na fumaça de tabaco de tumores do pulmão e laringe, bem como outros tumores,

devido à exposição direta a mutágenos (ver, por exemplo, Pleasance, E.D., Etapahens, P.J., O'Meara, S., McBride, D.J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M.L., Beare, D., Lau, K.W., Greenman, C., *et al.* **(2010)**. *Nature* 463, 184-190). Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor é causada por desregulação na enzima de edição do mRNA da apolipoproteína B, família de membros semelhantes a polipeptídeos catalíticos (APOBEC), que demonstrou resultar em níveis aumentados de transições de C para T em uma grande variedade de cânceres (ver, por exemplo, Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., *et al.* **(2013)**. *Nat. Genet.* 45, 970-976). Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor é causada por defeitos no reparo durante a replicação do DNA por mutações que comprometem o *proofreading* (revisão do DNA), que é realizada pelas principais enzimas replicativas Pol3 e Pold1. Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor é causada por defeitos no reparo de erros de pareamento do DNA, os quais estão associados com hipermutação no câncer colorretal, do endométrio e de outros (ver, por exemplo, Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A.D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A.G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C.C., *et al.*; **(2013)**. *Nature* 497, 67-73.; Muzny, D.M., Bainbridge, M.N., Chang, K., Dinh, H.H., Drummond, J.A., Fowler, G., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Morgan, M.B., Newsham, I.F., *et al.*; **(2012)**. *Nature* 487, 330–337). Em algumas modalidades, mutações no reparo durante a replicação do DNA são também encontradas em síndromes de predisposição ao câncer, tais como deficiência no reparo constitucional ou bialélico de erro de pareamento (CMMRD), síndrome de Lynch e polipose associada a *proofreading* por polimerases (PPAP).

[001409] Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratamento de um câncer com uma população de TILs, em que o câncer é um câncer hipermutado. Em uma modalidade, a invenção inclui um método de

tratamento de um câncer com uma população de TILs, em que o câncer é um câncer hipermutado reforçado. Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratamento de um câncer com uma população de TILs, em que o câncer é um câncer ultra-hipermutado.

[001410] Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratamento de 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 invenção. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d por 2 dias (27 e 26 dias antes da infusão de TILs) e fludarabina 25 mg/m^2/d por 5 dias (27 a 23 dias antes da infusão de TILs). Em uma modalidade, depois da quimioterapia não mieloablativa e infusão de TILs (no dia 0) de acordo com a presente invenção, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 via intravenosa a 720.000 UI/kg a cada 8 horas de acordo com a tolerância fisiológica.

[001411] A eficácia dos compostos e combinações de compostos aqui descritos em tratar, prevenir e/ou controlar as doenças indicadas ou transtornos pode ser testada usando vários modelos conhecidos na técnica, os quais fornecem orientação para o tratamento de doenças humanas. Por exemplo, modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer de ovário são descritos, p. ex., em Mullany, *et al.*, *Endocrinology* **2012,** *153,* 1585-92; e Fong, *et al.*, *J. Ovariano Res.* **2009,** *2,* 12. Modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer de pâncreas são descritos em Herreros-Villanueva, *et al.*, *World J. Gastroenterol.* **2012,** *18,* 1286-1294. Modelos para determinar eficácia de tratamentos para câncer de mama são descritas, p. ex., em Fantozzi, *Breast Cancer Res.* **2006,** *8,* 212. Modelos para determinar a eficácia de tratamentos para melanoma são descritos, p. ex., em Damsky, *et al.*, *Pigment Cell & Melanoma Res.* **2010,** *23,* 853-859. Modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer de pulmão são descritos,

p. ex., em Meuwissen, *et al.*, *Genes & Development*, **2005,** *19,* 643-664. Modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer de pulmão são descritos, p. ex., em Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2009,** *2,* 55-60; e Sano, *Head Neck Oncol.* **2009,** *1,* 32.

[001412] Em algumas modalidades, IFN-gama (IFN-γ) é indicativo de eficácia do tratamento para transtorno hiperproliferativo. Em algumas modalidades, IFN-γ no sangue de indivíduos tratados com TILs é indicativo de TILs ativos. Em algumas modalidades, um ensaio de potência é empregado para produção de IFN-γ. A produção de IFN-γ é outra medida do potencial citotóxico. A produção de IFN-γ pode ser medida determinando os níveis da citocina IFN-γ no sangue de um indivíduo tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos, por exemplo, na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método aumentam IFN-γ no sangue de indivíduos tratados com os TILs do presente método quando comparados a indivíduos tratados com TILs preparados por métodos referidos como o processo Gen 3, como exemplificado na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B) e por todo este pedido de patente. Em algumas modalidades, um aumento na IFN-γ é indicativo de eficácia do tratamento em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, IFN-γ é aumentado uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes ou mais em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada uma vez em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em

particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada duas vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada três vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada quatro vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada cinco vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, IFN-γ é medida por meio de um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN-γ é medida por meio de um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN-γ é medida em TILs *ex vivo* de um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido no sangue em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido no soro em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção.

[001413] Em algumas modalidades, os TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos, por exemplo, na Figura 85

(em particular, p. ex., Figura 85B) exibem policlonalidade aumentada em comparação a TILs produzidos por outros métodos, incluindo aqueles não exemplificados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), tais como, por exemplo, métodos referidos como métodos do processo 1C. Em algumas modalidades, policlonalidade significativamente melhorada e/ou policlonalidade aumentada é indicativa de eficácia do tratamento e/ou eficácia clínica aumentada para o tratamento de câncer. Em algumas modalidades, policlonalidade refere-se à diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, um aumento na policlonalidade pode ser indicativo de eficácia do tratamento em relação à administração dos TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada uma vez, duas vezes, dez vezes, 100 vezes, 500 vezes ou 1000 vezes em comparação a TILs preparados por métodos diferentes daqueles aqui providos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada uma vez em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada duas vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada dez vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 100 vezes em

comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 500 vezes em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 1000-fold em comparação a um paciente não tratado e/ou quando comparado a um paciente tratado com TILs preparados por outros métodos diferentes daqueles aqui descritos, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B).

2. Métodos de coadministração

[001414] Em algumas modalidades, os TILs produzidos como aqui descrito, incluindo, por exemplo, TILs derivados de um método descrito nas etapas A a F da Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B), podem ser administrados em combinação com uma ou mais reguladores de *checkpoint* imunológico, tais como os anticorpos descritos abaixo. Por exemplo, anticorpos direcionados a PD-1 e que podem ser coadministrados com os TILs da presente invenção incluem, p. ex., entre outros, nivolumabe (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumabe (lambrolizumabe, MK03475 ou MK-3475, Merck; Keytruda®), o anticorpo humanizado anti-PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), o anticorpo monoclonal anti-PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), Pidilizumabe (mAb anti-PD-1 CT-011, Medivation), o anticorpo monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) e/ou o anticorpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), o anticorpo monoclonal humano REGN2810 (Regeneron), o anticorpo monoclonal humano MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) e/ou o anticorpo IgG4 humanizado anti-PD-1

PDR001 (Novartis). Em algumas modalidades, o anticorpo contra PD-1 é proveniente de um clone: RMP1-14 (IgG de rato) - BioXcell cat. nº BP0146. Outros anticorpos adequados para uso nos métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F, aqui descritas, são os anticorpos anti-PD-1 descritos na Patente U.S. Nº 8 008 449, aqui incorporada por referência. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo liga-se especificamente a PD-L1 e inibe sua interação com PD-1, aumentando, assim, a atividade imune. Quaisquer anticorpos conhecidos na técnica que se liguem a PD-L1 e afetem a interação entre PD-1 e PD-L1, além de estimular uma resposta imune antitumoral, são adequados para uso nos métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F aqui descritas. Por exemplo, anticorpos direcionados para PD-L1 e que estão em estudos clínicos, incluem BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) e MPDL3280A (Genentech). Outras anticorpos adequados direcionados para PD-L1 são descritos na Patente U.S. Nº 7 943 743, aqui incorporada por referência. Será entendido por qualquer técnico no assunto que qualquer anticorpo que se ligue a PD-1 ou PD-L1, afete a interação PD-1/PD-L1 e estimule uma resposta imune antitumoral são adequados para uso nos métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F aqui descritas. Em algumas modalidades, o indivíduo que recebeu a combinação de TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F recebe concomitantemente um anticorpo anti-PD-1 quando o paciente é portador de um tipo de câncer que é refratário à administração do anticorpo anti-PD-1 sozinho. Em algumas modalidades, o paciente recebe TILs em combinação com um anticorpo anti-PD-1 quando o paciente é portador de melanoma refratário. Em algumas modalidades, o paciente recebe TILs em combinação com um anticorpo anti-PD-1 quando o paciente é portador de carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC).

3. Pré-condicionamento opcional com linfodepleção de pacientes

[001415] Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratamento de 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 invenção. Em uma modalidade, a invenção inclui uma população de TILs para uso no tratamento de câncer em um paciente que foi pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa. Em uma modalidade, a população de TILs é para administração por infusão. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d por 2 dias (27 e 26 dias antes da infusão de TILs) e fludarabina 25 mg/m^2/d por 5 dias (27 a 23 dias antes da infusão de TILs). Em uma modalidade, depois da quimioterapia não mieloablativa e infusão de TILs (no dia 0) de acordo com a presente invenção, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 (aldesleucina, disponível comercialmente como PROLEUKIN) via intravenosa a 720.000 UI/kg a cada 8 horas de acordo com a tolerância fisiológica. Em certas modalidades, a população de TILs é para uso no tratamento de câncer em combinação com IL-2, em que a IL-2 é administrada depois da população de TILs.

[001416] Achados experimentais indicam que a linfodepleção antes da transferência adotiva de linfócitos T tumor-específicos desempenha um papel fundamental para aumentar a eficácia do tratamento ao eliminar células T reguladoras e elementos concorrentes do sistema imune (“dissipadores de citocinas”). Deste modo, algumas modalidades da invenção utilizam uma etapa de linfodepleção (às vezes também referida como “condicionamento imunossupressor”) no paciente antes da introdução dos rTILs da invenção.

[001417] Em geral, a linfodepleção é conseguida pela administração de fludarabina ou ciclofosfamida (a forma ativa referida 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, todos os quais aqui incorporados, em sua totalidade, por referência.

[001418] Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada a uma concentração de fludarabina 0,5 μg/mL-10 μg/mL. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada a uma concentração de fludarabina 1 μg/mL. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada a uma dose 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 por 2-7 a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 4-5 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 4-5 dias a 25 mg/kg/dia.

[001419] Em algumas modalidades, a mafosfamida, a forma ativa de ciclofosfamida, é obtida a uma concentração de 0,5 μg/mL-10 μg/mL pela administração de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, mafosfamida, a forma ativa de ciclofosfamida, é obtida a uma concentração de 1 μg/mL pela administração de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada a uma dose de 100 mg/m^2/dia, 150 mg/m^2/dia, 175 mg/m^2/dia¸ 200 mg/m^2/dia, 225 mg/m^2/dia, 250 mg/m^2/dia, 275 mg/m^2/dia ou 300 mg/m^2/dia. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada via intravenosa *(*ou seja, i.v.) Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 2-7 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 4-5 dias a 250 mg/m^2/dia i.v. Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 4 dias a 250 mg/m^2/dia i.v.

[001420] Em algumas modalidades, a linfodepleção é realizada pela administração de fludarabina e ciclofosfamida juntas a um paciente. Em algumas modalidades, fludarabina é administrada a 25 mg/m^2/dia i.v. e ciclofosfamida é administrado a 250 mg/m^2/dia i.v. durante 4 dias.

[001421] Em uma modalidade, a linfodepleção é realizada pela administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

4. Esquemas de IL-2

[001422] Em uma modalidade, o esquema de IL-2 compreende um esquema com dose alta de IL-2, em que o esquema com dose alta de IL-2 compreende aldesleucina, ou um biossimilar ou variante da mesma, administra via intravenosa iniciando no dia seguinte à administração de uma parte terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs, em que a aldesleucina ou um biossimilar ou variante da mesma é administrado a uma dose de 0,037 mg/kg ou 0,044 mg/kg UI/kg (massa corporal do paciente) por infusões intravenosas em bolus de 15 minutos a cada oito horas de acordo com a tolerância, para, no máximo, 14 doses. Após 9 dias de repouso, esse esquema pode ser repetido para outras 14 doses, totalizando, no máximo, 28 doses.

[001423] Em uma modalidade, o esquema de IL-2 compreende um esquema decrescente de IL-2. Esquemas decrescentes de IL-2 foram descritos em O'Day, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **1999,** *17,* 2752-61 e Eton, *et al.*, *Cancer* **2000,** *88,* 1703-9, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Em uma modalidade, um esquema decrescente de IL-2 compreende 18 x 10^6 UI/m^2 administrados via intravenosa durante 6 horas, seguidos por 18 x 10^6 UI/m^2 administrados via intravenosa durante 12 horas, seguidos por 18 x 10^6 UI/m^2 administrados via intravenosa durante 24 horas, seguidos por 4,5 x 10^6 UI/m^2 administrados via intravenosa durante 72 horas. Esse ciclo de tratamento pode

ser repetido a cada 28 dias para, no máximo, 4 ciclos. Em uma modalidade, um esquema decrescente de IL-2 compreende 18.000.000 UI/m^2 no dia 1, 9.000.000 UI/m^2 no dia 2 e 4.500.000 UI/m^2 nos dias 3 e 4.

[001424] Em uma modalidade, o esquema de IL-2 compreende a administração de IL-2 peguilada a cada 1, 2, 4, 6, 7, 14 ou 21 dias a uma dose entre 0,10 mg/dia e 50 mg/dia.

5. Transferência celular adotiva

[001425] Transferência celular adotiva (ACT) é uma forma eficaz de imunoterapia e envolve a transferência de células imunes com atividade antitumoral a pacientes com câncer. ACT é uma abordagem terapêutica que envolve a identificação, *in vitro*, de linfócitos com atividade antitumoral, a expansão *in vitro* dessas células para números grandes e a sua infusão no hospedeiro portador do câncer. Os linfócitos usados para a transferência adotiva podem ser derivados do estroma de tumores ressecados (linfócitos infiltrantes de tumor ou TILs). TILs para ACT podem ser preparados como aqui descrito. Em algumas modalidades, os TILs são preparados, por exemplo, de acordo com um método descrito na Figura 85 (em particular, p. ex., Figura 85B). Podem também ser derivados do sangue se forem geneticamente modificados para expressar receptores de células T antitumorais (TCRs) ou receptores quiméricos de antígenos (CARs), enriquecidos com culturas células tumorais-linfócitos mistas (MLTCs), ou clonados usando células apresentadoras de antígeno autólogas e peptídeos derivados do tumor. A ACT na qual os linfócitos originam do hospedeiro portador do câncer a serem infundidos é denominada ACT autóloga. A Publicação U.S. Nº 2011/0052530 refere-se a um método para terapia celular adotiva visando promover a regressão do câncer, primariamente para o tratamento de pacientes que sofrem de melanoma metastática, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência no que diz respeito a esses métodos. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados como

aqui descrito. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser por injeção, p. ex., injeção intravenosa. Em algumas modalidades, os TILs e/ou linfócitos citotóxicos podem ser administrados em doses múltiplas. A administração pode ser uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais de seis vezes ao ano. A administração pode ser uma vez ao mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana ou uma vez de dois em dois dias. A administração de TILs e/ou linfócitos citotóxicos pode continuar enquanto necessário.

6. Métodos adicionais de tratamento

[001426] Em outra modalidade, a invenção provê um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar ao indivíduo uma dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima.

[001427] Em outra modalidade, a invenção provê um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar ao indivíduo uma dose terapeuticamente eficaz da composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima

[001428] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, antes de administrar a dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs e da composição de TILs descritas em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, respectivamente, um esquema de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao indivíduo.

[001429] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que

o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[001430] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado para compreender ainda a etapa de tratar o indivíduo com um esquema de dose alta de IL-2, iniciando no dia seguinte à administração das células TIL ao indivíduo.

[001431] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima modificado, de tal modo que o esquema de dose alta de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 UI/kg, administrados por infusão intravenosa em bolus durante 15 minutos a cada oito horas enquanto tolerado.

[001432] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é a tumor sólido.

[001433] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo papilomavírus humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal ou carcinoma de células renais.

[001434] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, o câncer é melanoma, CCECP, câncer cervical, CPNPC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[001435] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é melanoma.

[001436] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima modificado de tal modo que o câncer é CCECP.

[001437] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é câncer cervical.

[001438] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é CPNPC.

[001439] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

[001440] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima modificado de tal modo que, o câncer é câncer gastrointestinal.

[001441] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é um câncer hipermutado.

[001442] Em outra modalidade, a invenção provê o método para o tratamento de um indivíduo com câncer, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima modificado de tal modo que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

[001443] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, para uso em um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar ao indivíduo uma dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs.

[001444] Em outra modalidade, a invenção provê a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, para uso em um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar ao indivíduo uma dose terapeuticamente eficaz da composição de TILs.

[001445] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, ou a composição de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que, antes de administrar ao indivíduo, a dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos, anteriores, conforme aplicável acima, ou da composição de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, um esquema de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao indivíduo.

[001446] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos

parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que, o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[001447] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada para compreender ainda a etapa de tratar paciente com um esquema de dose alta de IL-2, iniciando no dia seguinte à administração das células TIL ao paciente.

[001448] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima modificada de tal modo que o esquema de dose alta de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 UI/kg, administrado por infusão intravenosa em bolus durante 15 minutos a cada oito horas enquanto tolerado.

[001449] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é a tumor sólido.

[001450] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo papilomavírus humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal, ou carcinoma de células renais.

[001451] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é melanoma, CCECP, câncer cervical, CPNPC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[001452] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é melanoma.

[001453] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é CCECP.

[001454] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é câncer cervical.

[001455] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é CPNPC.

[001456] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

[001457] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é câncer gastrointestinal.

[001458] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é um câncer hipermutado.

[001459] Em outra modalidade, a invenção provê a população terapêutica de TILs ou a composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificada de tal modo que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

[001460] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, em um método de tratamento de câncer em um indivíduo, o qual compreende administrar ao indivíduo uma dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs.

[001461] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, em um método de tratamento de câncer em um indivíduo, o qual compreende administrar ao indivíduo uma dose terapeuticamente eficaz da composição de TILs.

[001462] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, em um método de tratamento de câncer em um indivíduo, o qual compreende administrar ao indivíduo um esquema de linfodepleção não mieloablativa e, a seguir, administrar ao indivíduo uma dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, ou a dose terapeuticamente eficaz da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima.

[001463] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[001464] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, ou o uso da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado para compreender ainda a etapa de tratar paciente com um esquema de dose alta de IL-2, iniciando no dia seguinte à administração das células TIL ao paciente.

[001465] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o esquema de dose alta de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 UI/kg, administrado por infusão intravenosa em bolus durante 15 minutos a cada oito horas enquanto tolerado.

[001466] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é a tumor sólido.

[001467] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer

de mama, câncer causado pelo papilomavírus humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal ou carcinoma de células renais.

[001468] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é melanoma, CCECP, câncer cervical, CPNPC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[001469] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é melanoma.

[001470] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é CCECP.

[001471] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é câncer cervical.

[001472] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é CPNPC.

[001473] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

[001474] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é câncer gastrointestinal.

[001475] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é um câncer hipermutado.

[001476] Em outra modalidade, a invenção provê o uso da população terapêutica de TILs ou da composição de TILs descritos em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de tal modo que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

7. Modalidades exemplares de tratamento

[001477] Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método de tratamento de um câncer com uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), o qual compreende as etapas de (a) obter uma primeira população de TILs de um fragmento ou amostra do tumor de um paciente; (b) realizar uma expansão inicial da primeira população de TILs in um primeiro meio de cultura celular a fim de obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número pelo menos 5 vezes maior do que a primeira população de TILs, e em que o primeiro meio de cultura celular compreende IL-2; (c) realizar uma expansão rápida da segunda população de TILs usando uma população de células apresentadoras de antígeno artificiais da linhagem mieloide (aAPCs mieloides) em um segundo meio de cultura celular a fim de obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 50 vezes maior do que a segunda população de TILs depois de 7 dias do início da expansão rápida; e em que o segundo meio de cultura celular compreende IL-2 e OKT-3; (d) administrar uma parte terapeuticamente eficaz da terceira

população de TILs a um paciente com o câncer. Em algumas modalidades, a IL-2 está presente a uma concentração inicial de aproximadamente 3000 UI/mL e o anticorpo OKT-3 está presente a uma concentração inicial de aproximadamente 30 ng/mL no segundo meio de cultura celular. Em algumas modalidades, a primeira expansão é realizada ao longo de um período não superior a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão é realizada usando um recipiente permeável a gases. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando um recipiente permeável a gases. Em algumas modalidades, a razão da segunda população de TILs para a população de aAPCs na expansão rápida é entre 1 para 80 e 1 para 400. Em algumas modalidades, a razão da segunda população de TILs para a população de aAPCs na expansão rápida é aproximadamente 1 para 300. Em algumas modalidades, o câncer para tratamento é selecionado dentre o grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo papilomavírus humano, câncer da cabeça e pescoço, câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o câncer para tratamento é selecionado dentre o grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário e câncer cervical. Em algumas modalidades, o câncer para tratamento é melanoma. Em algumas modalidades, o câncer para tratamento é câncer de ovário. Em algumas modalidades, o câncer para tratamento é câncer cervical. Em algumas modalidades, o método de tratamento de câncer compreende ainda a etapa de tratar o paciente com um esquema de linfodepleção não mieloablativa antes de administrar a terceira população de TILs ao paciente. Em algumas modalidades, o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias. Em algumas modalidades, o esquema de dose alta

de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 UI/kg de aldesleucina, ou um biossimilar ou variante da mesma, administrados por infusão intravenosa em bolus durante 15 minutos a cada oito horas enquanto tolerado.

[001478] Em algumas modalidades, a presente invenção provê um método de tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos compreendendo: (i) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia obtida de um tumor em um paciente; (ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs entre aproximadamente 10 dias e 19 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia; (iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada entre aproximadamente 11 dias e 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e (iv) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs ao paciente. Em algumas modalidades, a IL-2 está presente a uma concentração inicial de aproximadamente 3000 UI/mL e anticorpo OKT-3 está presente a uma concentração inicial de aproximadamente 30 ng/mL no segundo meio de cultura celular. Em algumas modalidades, a primeira expansão é realizada usando um recipiente permeável

a gases. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando um recipiente permeável a gases. Em algumas modalidades, a razão da segunda população de TILs para a população de APCs na expansão rápida é entre 1 para 80 e 1 para 400. Em algumas modalidades, a razão da segunda população de TILs para a população de APCs na expansão rápida é aproximadamente 1 para 300. Em algumas modalidades, as APCs são PMBCs. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano. Em algumas modalidades, o câncer a ser tratado é selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano. Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma. Em algumas modalidades, o câncer a ser tratado é selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma. Em algumas modalidades, o método de tratamento de câncer compreende ainda a etapa de tratar o paciente com um esquema de linfodepleção não mieloablativa antes de administrar a terceira população de TILs ao paciente. Em algumas modalidades, o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias. Em algumas modalidades, o esquema de dose alta de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 UI/kg de aldesleucina, ou um biossimilar ou variante da mesma, administrados por infusão intravenosa em bolus durante 15 minutos a cada oito horas enquanto tolerado.

XVII. Modalidades exemplares

[001479] 1. Um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs compreendendo:

(i) obter uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia de um tumor em um paciente;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs entre aproximadamente 10 dias e 19 dias quando a primeira população de TILs for uma biópsia por agulha grossa; e

(iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada entre aproximadamente 11 dias e 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

[001480] 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o método compreende ainda:

(iv) realizar uma segunda expansão adicional suplementando o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 adicional e APCs adicionais, em que a segunda expansão adicional é realizada por pelo menos 14 dias a fim de obter uma população terapêutica maior de TILs do que a obtida na etapa (iii), em que a população terapêutica maior de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à terceira população de TILs.

[001481] 3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que depois da etapa (iii), as células são removidas da cultura celular e crioconservadas em um meio de armazenamento antes de realizar a etapa (iv).

[001482] 4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que as células são descongeladas antes de realizar a etapa (iv).

[001483] 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a etapa (iv) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001484] 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 33 dias.

[001485] 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 30 dias.

[001486] 8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 28 dias.

[001487] 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de aproximadamente 28 dias.

[001488] 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as células das etapas (iii) ou (iv) expressam CD4, CD8 e TCR α β em níveis semelhantes aos de células recentemente coletadas.

[001489] 11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[001490] 12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 19 na etapa (ii) e/ou qualquer um dos dias 11 ao 14 na etapa (iii).

[001491] 13. Método de acordo com a reivindicações 2 a 12, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs na etapa (iv) exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[001492] 14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[001493] 15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[001494] 16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[001495] 17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a primeira expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001496] 18. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001497] 19. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a segunda expansão adicional na etapa (iv) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001498] 20. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o FNA

na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[001499] 21. Método de acordo com a reivindicação 1, em que the biópsia por agulha grossa é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[001500] 22. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[001501] 23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o paciente se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[001502] 24. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[001503] 25. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[001504] 26. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma biópsia por agulha grossa.

[001505] 27. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a biópsia por agulha grossa é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[001506] 28. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001507] 29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[001508] 30. Um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs compreendendo:

(i) realizar uma primeira expansão cultivando uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma biópsia por agulha grossa de um tumor em um paciente em um meio de cultura celular compreendendo IL-2 a fim de obter uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs entre aproximadamente 10 dias e 19 dias quando a primeira população de TILs for de uma biópsia por agulha grossa; e

(ii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais a fim de obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada entre aproximadamente 11 dias e 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

[001509] 31. O método da reivindicação 30, em que o método compreende ainda:

(iii) realizar uma segunda expansão adicional da terceira população de TILs suplementando o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 adicional e APCs adicionais, em que a segunda expansão adicional é realizada for pelo menos 14 dias para obter uma população terapêutica de TILs maior do que a obtida na etapa (ii), em que a população terapêutica maior de TILs exibe uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à terceira população de TILs.

[001510] 32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que as

células do meio de cultura celular na etapa (ii) são removidas e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da etapa (iii).

[001511] 33. Método de acordo com a reivindicação 32, em que as células são descongeladas antes da etapa (iii).

[001512] 34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 33, em que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[001513] 35. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 34, em que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[001514] 36. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a primeira expansão na etapa (i) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001515] 37. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a segunda expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001516] 38. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a segunda expansão adicional na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001517] 39. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[001518] 40. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a biópsia por agulha grossa é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[001519] 41. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático,

glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[001520] 42. Método de acordo com a reivindicação 41, em que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o paciente se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[001521] 43. Método de acordo com a reivindicação 30, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[001522] 44. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[001523] 45. Método de acordo com a reivindicação 30, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma biópsia por agulha grossa.

[001524] 46. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a biópsia por agulha grossa é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[001525] 47. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a etapa (ii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001526] 48. Método de acordo com a reivindicação 47, e que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[001527] 49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 48, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[001528] 50. Método de acordo com a reivindicação 49, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da

expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[001529] 51. Um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos compreendendo:

(i) obter uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma biópsia por agulha grossa obtida de um tumor em um paciente;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs entre aproximadamente 10 dias e 19 dias quando a primeira população de TILs for de uma biópsia por agulha grossa;

(iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada entre aproximadamente 11 dias e 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(iv) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs ao paciente.

[001530] 52. O método da reivindicação 51, em que o método compreende ainda, antes da etapa (iv), a etapa em que uma segunda expansão adicional é realizada suplementando o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 adicional e APCs adicionais,

em que a segunda expansão adicional é realizada for pelo menos 14 dias para obter uma população terapêutica de TILs maior do que a obtida na etapa (iii), em que a população terapêutica maior de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à terceira população de TILs.

[001531] 53. Método de acordo com a reivindicação 51, em que depois da etapa (ii) as células são removidas do meio de cultura celular e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da segunda expansão adicional da reivindicação 52.

[001532] 54. Método de acordo com a reivindicação 51, em que as células são descongeladas antes da segunda expansão adicional da reivindicação 52.

[001533] 55. Método de acordo com a reivindicação 51, em que a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001534] 56. Método de acordo com a reivindicações 51 a 55, em que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[001535] 57. Método de acordo com a reivindicação 51, em que a primeira expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001536] 58. Método de acordo com a reivindicação 51, em que a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001537] 59. Método de acordo com a reivindicação 52, em que a segunda expansão adicional é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-15, anticorpo agonista

de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001538] 60. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[001539] 61. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[001540] 62. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[001541] 63. Método de acordo com a reivindicação 51, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[001542] 64. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[001543] 65. Método de acordo com a reivindicação 51, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma biópsia por agulha grossa.

[001544] 66. Método de acordo com a reivindicação 51, em que a biópsia por agulha grossa é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[001545] 67. Método de acordo com a reivindicação 51, em que a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001546] 68. Método de acordo com a reivindicação 67, em que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[001547] 69. A método de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 68, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste

em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[001548] 70. Método de acordo com a reivindicação 69, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[001549] 71. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 70, em que o câncer é selecionado dentre o grupo que consiste em melanoma, câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de não pequenas células.

[001550] 72. Um método para o tratamento de um indivíduo com câncer, o qual compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos compreendendo:

(i) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma biópsia por agulha grossa de um tumor em um paciente em um meio de cultura celular compreendendo IL-2 a fim de obter uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs entre aproximadamente 10 dias e 19 dias quando primeira população de TILs for de uma biópsia por agulha grossa;

(ii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais para obter uma terceira

população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada entre aproximadamente 11 dias e 14 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(iii) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs ao paciente.

[001551] 73. O método da reivindicação 72, em que o método compreende ainda, antes da etapa (iii), uma etapa em que uma segunda expansão adicional é realizada suplementando o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 adicional e APCs adicionais, em que a segunda expansão adicional é realizada por pelo menos 14 dias para obter uma população terapêutica de TILs maior do que a obtida na etapa (ii), em que a população terapêutica maior de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à terceira população de TILs.

[001552] 74. Método de acordo com a reivindicação 72, em que as células do meio de cultura celular na etapa (ii) são removidas e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da segunda expansão adicional na reivindicação 73.

[001553] 75. Método de acordo com a reivindicação 74, em que as células são descongeladas antes da segunda expansão adicional na reivindicação 73.

[001554] 76. Método de acordo com a reivindicação 74, em que as células são descongeladas antes da etapa (iii).

[001555] 77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 76, em que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[001556] 78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

72 a 77, em que as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[001557] 79. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 78, em que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[001558] 80. Método de acordo com a reivindicação 72, em que the primeira expansão na etapa (i) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001559] 81. Método de acordo com a reivindicação 72, em que a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001560] 82. Método de acordo com a reivindicação 81, em que a segunda expansão adicional é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001561] 83. Método de acordo com a reivindicação 72, em que o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[001562] 84. Método de acordo com a reivindicação 72, em que a biópsia por agulha grossa é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[001563] 85. Método de acordo com a reivindicação 72, em que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[001564] 86. Método de acordo com a reivindicação 85, em que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[001565] 87. Método de acordo com a reivindicação 72, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[001566] 88. Método de acordo com a reivindicação 72, em que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[001567] 89. Método de acordo com a reivindicação 72, em que os TILs na etapa (i) são obtidos a partir de uma biópsia por agulha grossa.

[001568] 90. Método de acordo com a reivindicação 72, em que a biópsia por agulha grossa é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[001569] 91. Método de acordo com a reivindicação 72, em que a etapa (ii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001570] 92. Método de acordo com a reivindicação 91, em que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[001571] 93. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 72 a 92, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

[001572] 94. Método de acordo com a reivindicação 93, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

[001573] 95. Um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma biópsia por agulha grossa obtida de

um tumor em um paciente;

(b) adicionar a primeira população a um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs entre aproximadamente 10 dias e 19 dias quando a primeira população de TILs for de uma biópsia por agulha grossa, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma primeira área de superfície permeável a gases, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3-14 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a primeira população de TILs, e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem a abertura do sistema;

(d) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada entre aproximadamente 11 dias e 14 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma segunda área de superfície permeável a gases, e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem a abertura do sistema;

(e) coletar a população terapêutica de TILs obtidos na etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem a abertura do

sistema; e

(f) transferir a população de TILs coletados na etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem a abertura do sistema.

[001574] 96. Método de acordo com a reivindicação 95, compreendendo ainda a etapa de crioconservação da bolsa de infusão compreendendo a população de TILs coletados na etapa (f) utilizando um processo de crioconservação.

[001575] 97. Método de acordo com a reivindicação 96, em que o processo de crioconservação é realizada usando uma razão 1:1 de população de TILs coletados/meio CS10.

[001576] 98. Método de acordo com a reivindicação 96, em que as células apresentadoras de antígeno são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[001577] 99. Método de acordo com a reivindicação 98, em que as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

[001578] 100. Método de acordo com a reivindicação 98, em que as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 19 na etapa (c) e/ou qualquer um dos dias 11 ao 14 na etapa (d).

[001579] 101. Método de acordo com a reivindicação 95, em que as células apresentadoras de antígeno são células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[001580] 102. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 101, em que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[001581] 103. Método de acordo com a reivindicação 95, em que a primeira expansão na etapa (c) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001582] 104. Método de acordo com a reivindicação 95, em que a segunda expansão na etapa (d) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001583] 105. Método de acordo com a reivindicação 95, em que o FNA na etapa (a) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[001584] 106. Método de acordo com a reivindicação 95, em que a biópsia por agulha grossa é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[001585] 107. Método de acordo com a reivindicação 95, em que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[001586] 108. Método de acordo com a reivindicação 107, em que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[001587] 109. Método de acordo com a reivindicação 95, em que os TILs na etapa (a) são obtidos de um FNA.

[001588] 110. Método de acordo com a reivindicação 95, em que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[001589] 111. Método de acordo com a reivindicação 95, em que os TILs na etapa (a) são obtidos de uma biópsia por agulha grossa.

[001590] 112. Método de acordo com a reivindicação 95, em que a biópsia por agulha grossa é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[001591] 113. Método de acordo com a reivindicação 95, em que a coleta na etapa (e) é realizada utilizando um sistema LOVO para o processamento das células.

[001592] 114. Método de acordo com a reivindicação 95, em que o meio

de cultura celular é fornecido em um recipiente selecionado dentre o grupo que consiste em um recipiente-G e uma bolsa Xuri Cellbag.

[001593] 115. Método de acordo com a reivindicação 95, em que a bolsa de infusão na etapa (f) é uma bolsa de infusão HyperThermosol.

[001594] 116. Método de acordo com a reivindicação 95, em que as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 33 dias.

[001595] 117. Método de acordo com a reivindicação 95, em que as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 30 dias.

[001596] 118. Método de acordo com a reivindicação 95, em que as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período entre aproximadamente 21 dias e 28 dias.

[001597] 119. Método de acordo com a reivindicação 95, em que as etapas (a) a (f) são realizadas em 22 dias ou menos.

[001598] 120. Método de acordo com a reivindicação 96, em que as etapas (a) a (f) e a crioconservação são realizadas em 22 dias ou menos.

[001599] 121. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 120, em que a população terapêutica de TILs colhidos na etapa (e) compreende TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001600] 122. Método de acordo com a reivindicação 121, em que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[001601] 123. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 122, em que a etapas (b) a (e) são realizadas em um único recipiente, em que realizar as etapas (b) a (e) em um único recipiente resulta em um aumento no rendimento de TILs por tumor ressecado, em comparação a realizar as etapas (b) a (e) em mais de um recipiente.

[001602] 124. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 123, em que as células apresentadoras de antígeno são adicionadas aos TILs durante o segundo período na etapa (d) sem a reabertura do sistema.

[001603] 125. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 124, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27+, expressão de CD28+, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras, e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[001604] 126. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 125, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da terceira população de TILs exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[001605] 127. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 126, em que o risco de contaminação microbiana é reduzido em comparação a um sistema aberto.

[001606] 128. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 95 a 128, em que os TILs da etapa (g) são infundidos em um paciente.

[001607] 129. Uma método para o tratamento de um indivíduo com câncer, em que o método compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma biópsia por agulha grossa de um tumor ressecado de um indivíduo;

(b) adicionar a primeira população a um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para

produzir uma segunda população de TILs, , em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 no dia 3, em que a primeira expansão é realizada entre aproximadamente 3 dias e 19 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5 x 10^7 TILs entre aproximadamente 10 dias e 19 dias quando a primeira população de TILs for de uma biópsia por agulha grossa, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma primeira área de superfície permeável a gases, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3-14 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a primeira população de TILs, e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem a abertura do sistema;

(d) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 7-14 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma segunda área de superfície permeável a gases, e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem a abertura do sistema;

(e) coletar a população terapêutica de TILs obtida na etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem a abertura do sistema; e

(f) transferir a população de TILs coletados na etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem a abertura do sistema;

(g) opcionalmente, crioconservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TILs coletados na etapa (f) utilizando um processo de crioconservação; e

(h) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs a partir da bolsa de infusão na etapa (g) ao paciente.

[001608] 130. Método de acordo com a reivindicação 129, em que a população terapêutica de TILs coletados na etapa (e) compreende TILs suficientes para administração de uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs na etapa (h).

[001609] 131. Método de acordo com a reivindicação 129 ou 130, em que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

[001610] 132. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 131, em que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[001611] 133. Método de acordo com a reivindicação 129, em que a primeira expansão na etapa (c) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001612] 134. Método de acordo com a reivindicação 129, em que a segunda expansão na etapa (d) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

[001613] 135. Método de acordo com a reivindicação 129, em que o FNA na etapa (a) compreende pelo menos 400.000 TILs.

[001614] 136. Método de acordo com a reivindicação 129, em que a biópsia por agulha grossa é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

[001615] 137. Método de acordo com a reivindicação 129, em que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em

pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

[001616] 138. Método de acordo com a reivindicação 137, em que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNP) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

[001617] 139. Método de acordo com a reivindicação 129, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

[001618] 140. Método de acordo com a reivindicação 139, em que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

[001619] 141. Método de acordo com a reivindicação 129, em que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma biópsia por agulha grossa.

[001620] 142. Método de acordo com a reivindicação 141, em que a biópsia por agulha grossa é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

[001621] 143. Método de acordo com a reivindicação 129, em que o número de TILs suficientes para administrar uma dose terapeuticamente eficaz na etapa (h) é entre aproximadamente $2,3x10^{10}$ e $13,7x10^{10}$.

[001622] 144. Método de acordo com a reivindicação 129, em que as células apresentadoras de antígeno (APCs) são PBMCs.

[001623] 145. Método de acordo com a reivindicação 144, em que as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 19 na etapa (c) e/ou qualquer um dos dias 9 ao 14 na etapa (d).

[001624] 146. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 145, em que antes de ser administrada uma dose terapeuticamente eficaz de células TIL na etapa (h), um esquema de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao paciente.

[001625] 147. Método de acordo com a reivindicação 146, em que o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias,

seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[001626] 148. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 147, compreendendo ainda a etapa de tratar o paciente com um esquema de dose alta de IL-2, iniciando no dia seguinte à administração das células TIL ao paciente na etapa (h).

[001627] 149. Método de acordo com a reivindicação 148, em que o esquema de dose alta de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 UI/kg, administrados por infusão intravenosa em bolus durante 15 minutos a cada oito horas enquanto tolerado.

[001628] 150. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 149, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27+, expressão de CD28+, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras, e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[001629] 151. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 150, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

[001630] 152. Um método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA), a pequena biópsia, ou uma biópsia por agulha grossa de um tumor em um paciente;

(b) realizar uma primeira expansão de preparação, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo

IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de preparação é realizada por um primeiro período de aproximadamente 1 a 7 dias em um recipiente compreendendo uma primeira área de superfície permeável a gases para obter uma segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número maior do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de aproximadamente 1 a 11 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(d) coletar a população terapêutica de TILs da etapa (c).

Exemplos

[001631] As modalidades aqui abrangidas são agora descritas tendo como referência os exemplos a seguir. Esses exemplos são fornecidos para fins de ilustração somente, e a descrição ali abrangida não deve ser interpretada de maneira alguma como uma limitação para esses exemplos, mas sim, ser interpretada no sentido de abranger todas e quaisquer variações que se tornem evidentes como resultados dos ensinamentos ora fornecidos.

Exemplo 1: Preparação de meios para os processos pré-REP e REP

[001632] Esse exemplo descreve o procedimento para preparar os meios de cultura de tecido para uso em protocolos envolvendo a cultura de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) derivados de vários tipos de tumor incluindo, entre outros, melanoma metastático, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP), carcinoma de ovário, carcinoma de mama triplo negativo e adenocarcinoma pulmonar. Esses meios podem ser usados para preparação de qualquer um dos TILs descritos no presente pedido de patente e nos Exemplos.

Preparação de CM1

[001633] Removido os reagentes a seguir do armazenamento frio e aquecidos em banho-maria a 37 ºC: (RPMI1640, soro AB humano, L-glutamina 200mM L-). Preparado meio CM1 de acordo com a Tabela 32 abaixo, adicionando cada um dos ingredientes à seção superior de um filtro unitário de 0,2 µm apropriado ao volume a ser filtrado. Armazenar a 4 ºC.

Tabela 32: Preparação de CM1

Ingrediente	Concentração final	Volume final 500 ml	Volume final IL
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
Soro AB humano, inativado com calor 10%	50 mL	100 mL	
L-glutamina 200 mM	2 mM	5 mL	10 mL
BME 55 mM	55 µM	0,5 mL	1 mL
Sulfato de gentamicina 50 mg/mL	50 µg/mL	0,5 mL	1 mL

[001634] No dia de uso, quantidade requerida de CM1 pré-aquecida em banho-maria a 37 ºC e adicionada IL-2 6000 UI/mL.

[001635] Suplementação adicional – quando necessário de acordo com a Tabela 33.

Tabela 33: Suplementação adicional de CM1, se necessário

Suplemento	Concentração do estoque	Diluição	Concentração final
GlutaMAX™	200mM	1:100	2mM
Penicilina/estreptomicina	Penicilina 10.000 U/mL Estreptomicina 10.000 µg/mL	1:100	Penicilina 100 U/mL Estreptomicina 100 µg/mL
Anfotericina B	250 µg/mL	1:100	2,5 µg/mL

Preparação de CM2

[001636] Removido CM1 preparado da geladeira ou preparar CM1 fresco de acordo com a Seção 7.3 acima. Removido AIM-V® da geladeira e preparada a quantidade de CM2 necessária, misturando CM1 preparado com um volume igual de AIM-V® em um frasco de meio estéril. Adicionada IL-2 3000 UI/mL ao meio CM2 no dia de utilização. Preparada quantidade suficiente de CM2 com IL-2 3000 UI/mL no dia de utilização. Feita a identificação do frasco do meio CM2 com seu nome, as iniciais do preparador, a data em que foi filtrado/preparado, a data de vencimento de duas semanas e armazenar a 4 ºC até que necessário para cultura de tecido.

Preparação de CM3

[001637] Preparado CM3 no dia em que requerido para uso. CM3 era igual ao meio AIM-V®, suplementado com IL-2 3000 UI/mL no dia de utilização. Preparada uma quantidade de CM3 suficiente para as necessidades experimentais, adicionando solução estoque de IL-2 diretamente ao frasco ou bolsa de AIM-V. Misturado bem por agitação gentil. Identificação do frasco com "IL-2 3000 UI/mL" imediatamente depois de adicionar ao AIM-V. Em caso de excesso, CM3 foi armazenado em frascos a 4 ºC identificados com o nome do meio, as iniciais do preparador, a data em que o meio foi preparado e sua data de vencimento (7 dias após a preparação). Meio suplementado com IL-2 descartado depois de 7 dias armazenamento a 4 ºC.

Preparação de CM4

[001638] CM4 era igual a CM3, com o suplemento adicional de GlutaMAX 2 mM™ (concentração final). Para cada 1 L de CM3, adicionados 10 mL de GlutaMAX™ 200 mM. Preparada uma quantidade de CM4 suficiente para as necessidades experimentais, adicionando solução estoque de IL-2 e solução estoque de GlutaMAX™ diretamente ao frasco ou bolsa de AIM-V. Misturados bem por agitação leve. Feita identificação fraco com "3000 IL/ml IL-2 e GlutaMAX" imediatamente após de adicionar ao AIM-V. Em caso de excesso, CM4 foi armazenado em frascos a 4 ºC, identificados com o nome do meio, "GlutaMAX", e sua data de vencimento (7 dias após a preparação). Meio suplementado com IL-2 descartado depois de 7 dias armazenamento a 4 ºC.

Exemplo 2: Uso do coquetel de citocinas IL-2, IL-15 e IL-21

[001639] Esse exemplo descreve o uso das citocinas IL-2, IL-15 e IL-21, que servem como fatores de crescimento de células T adicionais, em combinação com o processo de TILs dos Exemplos.

[001640] Com o uso dos processos aqui descritos, TILs de tumores colorretal, melanoma, cervical, de mama triplo negativo, pulmão e renal

foram cultivados na presença de IL-2, em um braço do experimento e, no lugar de IL-2, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 em outro braço no início da cultura. Na conclusão do pré-REP, as culturas foram avaliadas quanto à expansão, fenótipo, função (CD107a+ e IFNγ) e repertório de TCR Vβ. IL-15 e IL-21 são descritas em outro lugar no presente e em Gruijl, *et al*., IL-21 promove a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor CD27+CD28+ com alto potencial citotóxico e baixa expansão colateral de células T reguladoras T, *Santegoets, S. J.,* J Transl Med., **2013,** *11:*37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

[001641] Os resultados mostraram que a expansão reforçada de TILs (>20%), em células $CD4^+$ e $CD8^+$ nas condições de tratadas com IL-2, IL-15 e IL-21, foi observada em múltiplas histologias em relação às condições com IL-2 somente. Houve um enviesamento em direção a uma população predominantemente $CD8^+$ com repertório enviesado para TCR Vβ nos TILs obtidos das culturas tratadas com IL-2, IL-15 e IL-21 em relação às culturas com IL-2 somente. IFNγ e CD107a foram elevados nos TILs tratados com IL-2, IL-15 e IL-21, em comparação aos TILs tratados somente com IL-2.

Exemplo 3: Qualificação de lotes individuais de células mononucleares do sangue periférico submetidas à radiação gama

[001642] Esse exemplo descreve um procedimento abreviado inovador para qualificar lotes individuais de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, também conhecidas como MNC) submetidas à irradiação gama para uso como células alimentadoras alogênicas nos métodos exemplares aqui descritos.

[001643] Cada lote de MNC alimentadora irradiada foi preparado a partir de um doador individual. Cada lote ou doador teve analisada a capacidade para expansão de TIL no REP na presença de anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) purificado e interleucina-2 (IL-2). Além disso, cada lote de células alimentadoras foi testado sem a adição de TIL para verificar se a dose

recebida de irradiação gama era suficiente para torná-las incompetentes para replicação.

Fundamentos

[001644] Células alimentadoras MNC gama-irradiadas, com crescimento sustado, eram requeridas para REP de TIL. Receptores de membrana nas MNCs alimentadoras ligam-se ao anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e reticulam com TIL no frasco REP, estimulando o TIL para expandir. Lotes de alimentadoras foram preparados a partir de leucoférese de sangue total coletado de doadores individuais. O produto da leucoférese foi submetido à centrifugação com Ficoll-Hypaque, lavado, irradiado e crioconservado sob condições BPF.

[001645] É importante que os pacientes que receberam a terapia com TIL não sejam infundidos com células alimentadoras viáveis, pois isso pode resultar na doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD). O crescimento das células alimentadoras é, portanto, sustado submetendo as células à irradiação gama, resultando em quebras de fita dupla do DNA e a perda de viabilidade celular das células MNC quando da recultura.

Critérios de avaliação e configuração experimental

[001646] Lotes de alimentadoras foram avaliados com base em dois critérios: 1) a capacidade para expandir TIL em cocultura >100 vezes e 2) a incompetência para replicação.

[001647] Os lotes de alimentadoras foram testados no formato mini-REP utilizando duas linhagens de TILs primários pré-REP cultivadas em frascos de cultura de tecido T25 em posição ereta. Os lotes de alimentadoras foram testados contra duas linhagens distintas de TIL, uma vez que cada linhagem de TIL é única em sua capacidade para proliferar em resposta à ativação em um REP. Como controle, um lote de MNC células alimentadoras MNC irradiadas que, historicamente, demonstraram atender aos critérios acima, testadas lado a lado com os lotes em teste.

[001648] Para assegurar que todos os lotes testados em um único experimento recebessem testagem equivalente, estoques suficientes das mesmas linhagens de TIL pré-REP estavam disponíveis para testar todas as condições e todos os lotes de alimentadoras.

[001649] Para cada lote de células alimentadoras testadas, houve, no total, seis frascos T25: Linhagem nº 1 de TIL Pré-REP (2 frascos); Linhagem nº 2 de TIL Pré-REP (2 frascos); e Alimentadora controle (2 frascos). Frascos contendo as linhagens nº 1 e no 2 de TIL avaliaram a capacidade do lote de alimentadoras expandir TIL. Os frascos de alimentadora controle avaliaram a incompetência para replicação do lote de alimentadoras.

Protocolo experimental

Dia -2/3, Descongelamento das linhagens de TIL

[001650] Meio CM2 preparado. CM2 aquecido em banho-maria a 37 ºC. Preparados 40 mL de CM2 suplementado com IL-2 3000 UI/mL. Mantido aquecido até o uso. Colocados 20 mL de CM2 pré-aquecido sem IL-2 em cada um de dois tubos cônicos de 50 mL, identificados com os nomes das linhagens de TILs usadas. Removidas as duas linhagens designadas de TIL pré-REP do armazenamento com LN_2 e transferidos os frascos para a sala de cultura de tecido. Frascos descongelados colocando-os dentro de uma bolsa de armazenamento fechada com zíper em banho-maria a 37 ºC até que permanecesse uma quantidade pequena de gelo.

[001651] Usando uma pipeta estéril de transferência, transferido imediatamente o conteúdo do frasco nos 20 mL de CM2 no tubo cônico preparado, marcado de 50 mL. QS para 40 mL com CM2 sem IL-2 para lavar as células. Centrifugado a 400 x CF por 5 minutos. Aspirado o sobrenadante e ressuspensos em 5 mL de CM2 morno, suplementado com IL-2 3000 UI/mL.

[001652] Removida uma pequena alíquota (20 µL) em duplicada para contagem de células, usando um contador automático de células. Registrar as contagens. Durante a contagem, colocado o tubo cônico de 50 mL com

células TIL em uma incubadora umidificada a 37 ºC, CO_2 5%, com a tampa folgada para permitir a troca de gases. Determinada a concentração das células e TIL diluído para 1 x 10^6 células/mL em CM2 suplementado com IL-2 a 3000 UI/mL.

[001653] Cultivado em 2 mL/cavidade de uma placa de cultura de tecido com 24 cavidades em tantas cavidades quanto necessário em uma incubadora umidificada a 37 ºC até o Dia 0 do mini-REP. As diferentes linhagens de TILs cultivadas em placas de cultura de tecido com 24 cavidades, separadas para evitar confusão e contaminação cruzada potencial.

Dia 0, início de Mini-REP

[001654] Preparado meio CM2 suficiente para o número de lotes de alimentadoras a sem testadas (p. ex., para testar 4 lotes de alimentadoras ao mesmo tempo, preparados 800 mL de meio CM2). Obtida uma alíquota do CM2 preparado acima e suplementado com IL-2 3000 UI/mL para a cultura das células. (p. ex., para testar 4 lotes de alimentadoras ao mesmo tempo, preparar 500 mL de meio CM2 com IL-2 3000 UI/mL).

[001655] Trabalho de cada linhagem de TIL separadamente para prevenir contaminação cruzada, removida a placa de 24 cavidades com cultura de TIL da incubadora e transferida para o BSC.

[001656] Com uma pipeta de transferência estéril ou Pipettor 100-1000 µL e ponta, removido aproximadamente 1 mL de meio de cada cavidade de TIL a ser usado e colocado em uma cavidade não usada da placa de cultura de tecido com 24 cavidades.

[001657] Com uma pipeta de transferência estéril fresca ou Pipettor 100-1000 µL e ponta, misturado o meio restante com TIL nas cavidades para ressuspender as células e, então, transferida a suspensão celular para um tubo cônico de 50 mL, identificado com o nome do TIL e registrado o volume.

[001658] Lavadas as cavidades com o meio reservado e transferido aquele volume para o mesmo tubo cônico de 50 mL. Centrifugadas as células

a 400 x CF para coletar o *pellet* celular. Aspirado o sobrenadante do meio e ressuspenso o *pellet* celular em 2-5 mL de meio CM2 contendo IL-2 3000 UI/mL, volume a ser usado baseado no número de cavidades coletadas e o tamanho do *pellet* – o volume deve ser suficiente para assegurar uma concentração >1,3 x 10^6 células/mL.

[001659] Com uma pipeta sorológica, misturada a suspensão celular bastante e registrado o volume. Removidos 200 µL para uma contagem de células, usando um contador de células automático. Durante a contagem, colocado o tubo cônico de 50 mL com as células TIL em uma incubadora umidificada a 37 ºC, CO_2 5%, com a tampa folgada para permitir a troca de gases. Registradas as contagens.

[001660] Removido o tubo cônico de 50 mL contendo as células TIL da incubadora e ressuspensas as células a uma concentração de 1,3 x 10^6 células/mL em CM2 morno suplementado com IL-2 3000 UI/mL. Devolvido o tubo cônico de 50 mL para a incubadora com uma tampa folgada.

[001661] Repetidas as etapas acima para a segunda linhagem de TIL.

[001662] Um pouco antes do plaqueamento dos TIL nos frascos T25 para o experimento, os TIL foram diluídos 1:10 para uma concentração final de 1,3 x 10^5 células/mL conforme abaixo.

Preparação da solução de trabalho MACS GMP CD3 pura (OKT3)

[001663] Retirada a solução estoque de OKT3 (1 mg/mL) da geladeira a 4 ºC e colocada em BSC. A concentração final de 30 ng/mL OKT3 foi usada no meio do mini-REP.

[001664] 600 ng de OKT3 foram necessários para 20 mL em cada frasco T25 do experimento; isso era o equivalente a 60 µL de uma solução a 10 µg/mL para cada 20 mL, ou 360 µL para todos os 6 frascos testados para cada lote de alimentadoras.

[001665] Para cada lote de alimentadoras testado, preparados 400 µL de uma diluição 1:100 de OKT-3 para uma concentração de trabalho de 10

µg/mL (p. ex., para testar 4 lotes de alimentadoras ao mesmo tempo, preparar 1600 µL de uma diluição 1:100 de OKK-3 1 mg/mL: 16 µL de OKT31 mg/mL + 1,584 mL de meio CM2 com IL-2 3000 UI/mL).

Preparar frascos T25

[001666] Identificado cada frasco e preenchido cada frasco com o meio CM2 antes de preparar as células alimentadoras. Colocados os frascos em incubadora umidificada a 37 ºC, CO_2 5% para manter o meio aquecido enquanto aguarda para adição dos demais componentes. Umas vez as células alimentadoras foram preparadas, os componentes serão adicionados ao CM2 em cada frasco.

Tabela 34: Soluções

Componente	Volume em frascos de cocultura	Volume em frascos controle (alimentadoras somente)
CM2 + IL-2 3000 UI/mL	18 mL	19 mL
MNC:1,3 x 10^7/mL em CM2 + IL-2 3000 UI (concentração final 1,3 x 10^7/frasco)	1 mL	1 mL
OKT3: 10 µg/mL em CM2 + IL-2 3000 UI	60 µL	60 µL
TIL:1,3 x 10^5/mL em CM2 + IL-2 3000 UI (concentração final 1,3 x 10^5/frasco)	1 mL	0

Preparar células alimentadoras

[001667] No mínimo, 78 x 10^6 células alimentadoras eram necessárias por lote testado para esse protocolo. Cada frasco de 1 mL congelado por SDBB tinha 100 x 10^6 células viáveis quando do congelamento. Supondo 50% de recuperação quando do descongelamento, recomendou-se descongelar pelo menos dois frascos de 1 mL de células alimentadoras por lote, fornecendo uma estimativa de 100 x 10^6 células viáveis para cada REP. Alternativamente, se fornecidas em frascos de 1,8 mL, apenas um frasco fornecia células alimentadoras suficientes.

[001668] Antes de descongelar as células alimentadoras, pré-aquecidos aproximadamente 50 mL de CM2 sem IL-2 para cada lote de alimentadoras a ser testado. Removido os frascos designados de lotes de alimentadoras do armazenamento com LN_2, colocados em bolsa de armazenamento com zíper e colocados no gelo. Descongelados os frascos dentro da bolsa de

armazenamento com zíper por imersão em banho-maria a 37 ºC. Removidos os frascos da bolsa com zíper, pulverizados ou limpos com EtOH 70% e transferidos os frascos para BSC.

[001669] Com uma pipeta de transferência, transferido imediatamente o conteúdo dos frascos de alimentadoras em 30 mL de CM2 morno em um tubo cônico de 50 mL. Lavado o frasco com pequeno volume de CM2 para remover quaisquer células residuais no frasco. Centrifugado a 400 x CF por 5 minutos. Aspirado o sobrenadante e ressuspenso em 4 mL de CM2 morno mais IL-2 3000 UI/mL. Removidos 200 µL para contagem das células usando o Contador de Células Automático. Registradas as contagens.

[001670] Ressuspensas as células a 1,3 x 10^7 células/mL em CM2 morno mais IL-2 3000 UI/mL. Diluídas células TIL de 1,3 x 10^6 células/mL para 1,3 x 10^5 células/mL.

Preparação de cocultura

[001671] Diluídas células TIL de 1,3 x 10^6 células/mL para 1,3 x 10^5 células/mL. Adicionados 4,5 mL de meio CM2 a um tubo cônico de 15 mL. Removidas as células TIL da incubadora e ressuspensas bem com uma pipeta sorológica de 10 mL. Removido 0,5 mL de células das 1,3 x 10^6 células/mL Suspensão de TIL e adicionada aos 4,5 mL de meio no tubo cônico de 15 mL. Devolvido o frasco de estoque de TIL para a incubadora. Misturado bem. Repetido para a segunda linhagem de TIL. Transferidos frascos com meio pré-aquecido para um único lote de alimentadoras da incubadora para o BSC. Misturadas células alimentadoras, mexendo a ponta de uma pipeta de 1 mL para cima e para baixo diversas vezes e transferido 1 mL (1,3 x 10^7 células) para cada frasco daquele lote de alimentadoras. Adicionados 60 µL de estoque de trabalho de OKT3 (10 µg/mL) a cada frasco. Devolvidos os dois frascos controle para a incubadora.

[001672] Transferido 1 mL (1,3 x 10^5) de cada lote de TIL para o frasco T25 correspondentemente identificado. Devolvidos os frascos para a

incubadora e incubados em posição ereta. Não perturbados até o Dia 5.

[001673] Repetido para todos os lotes de alimentadoras testados.

Dia 5, Troca de meio

[001674] Preparado CM2 com IL-2 3000 UI/mL. 10 mL são necessários para cada frasco. Com uma pipeta de 10 mL, transferidos 10 mL de CM2 morno com IL-2 3000 UI/mL para cada frasco. Devolvidos os frascos para a incubadora e incubados em posição ereta até o Dia 7. Repetido para todos os lotes de alimentadoras testados.

Dia 7, Coleta

[001675] Removidos os frascos da incubadora e transferência para o BSC, tomando cuidado para não perturbar a camada de células no fundo do frasco. Sem perturbar as células crescendo no fundo dos frascos, removidos 10 mL de meio de cada frasco em teste e 15 mL de meio de cada um dos frascos controle.

[001676] Com uma pipeta sorológica de 10 mL, ressuspensas as células no meio restante e misturar bem para quebrar quaisquer agregados de células. Depois de misturar bastante a suspensão celular com a pipeta, removidos 200 µL para contagem de células. Contados os TILs usando o procedimento operacional padrão adequado em conjunto com o equipamento contador automático de células. Registradas as contagens no Dia 7.

[001677] Repetido para todos os lotes de alimentadoras testados.

[001678] Frascos controle de alimentadoras foram avaliados quanto à incompetência para replicação e frascos contendo TIL foram avaliados quanto às vezes de expansão desde o Dia 0 de acordo com a Tabela TT abaixo.

Dia 7, Continuação de frascos controle de alimentadoras até o Dia 14

[001679] Depois de concluídas as contagens do Dia 7 dos frascos controle de alimentadoras, adicionados 15 mL de meio CM2 fresco contendo IL-2 3000 UI/mL a cada um dos frascos controle. Devolvidos os frascos controle para a incubadora e incubados em posição ereta até o Dia 14.

Dia 14, Não proliferação estendida de frascos controle de alimentadoras

[001680] Removidos frascos da incubadora e transferência para o BSC, tomando cuidado para não perturbar a camada de células no fundo do frasco. Sem perturbar as células crescendo no fundo dos frascos, removidos aproximadamente 17 mL de meio de cada um dos frascos controle. Com uma pipeta sorológica de 5 mL, ressuspensas as células no meio restante e misturadas bem para quebrar quaisquer agregados de células. Registrados os volumes para cada frasco.

[001681] Após misturar bastante a suspensão celular com a pipeta, removidos 200 µl para contagem de células. Contados os TILs usando o procedimento operacional padrão adequado em conjunto com o equipamento contador automático de células. Registradas.

[001682] Repetido para todos os lotes de alimentadoras testados.

Resultados e critérios de aceitação

Resultados

[001683] A dose de irradiação gama foi suficiente para tornar as células alimentadoras incompetentes para replicação. Todos os lotes, esperava-se, atenderiam aos critérios de avaliação e também demonstraram uma redução no número total de células alimentadoras viáveis que restavam no dia 7 da cultura REP em comparação ao Dia 0.

[001684] Todos os lotes de alimentadoras, esperava-se, atenderiam aos critérios de 100 vezes de expansão do crescimento de TIL no Dia 7 da cultura REP.

[001685] Esperava-se que as contagens do dia 14 de frascos de alimentadoras de controle continuariam a tendência não proliferativa vista no dia 7.

Critérios de aceitação

[001686] Os critérios de aceitação a seguir foram atendidos por cada réplica de linhagem de TIL testada para cada lote de células alimentadoras.

[001687] A aceitação foi duas vezes, como segue (apresentado na Tabela 35 abaixo).

Tabela 35: Critérios de aceitação

Teste	Critérios de aceitação
Irradiação de MNC / Incompetência para replicação	Nenhum crescimento observado em 7 e 14 dias
Expansão de TIL	Pelo menos 100 vezes de expansão de cada TIL (mínimo de 1,3 x 10^7 células viáveis)

[001688] Avaliado se a dose de radiação foi suficiente para tornar as células alimentadoras MNC incompetentes para replicação quando cultivadas na presença de anticorpo OKT3 30 ng/mL e IL-2 3000 UI/mL. A incompetência para replicação foi avaliada pela contagem de células viáveis totais (TVC) como determinada pela contagem automática das células no dia 7 e no dia 14 do REP.

[001689] O critérios de aceitação foi "Nenhum crescimento", significando que o número de células viáveis totais não aumentou no dia 7 e no dia 14 do número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 do REP.

[001690] Avaliada a capacidade das células alimentadoras para apoiar a expansão de TIL. O crescimento de TIL foi medido em termos de vezes de expansão de células viáveis desde o início da cultura no Dia 0 do REP até o Dia 7 do REP. No dia 7, as culturas de TIL conseguiram uma expansão, de no mínimo, 100 vezes, (ou seja, número 100 vezes maior de TIL viáveis totais colocadas em cultura no REP Dia 0), conforme avaliado por contagem automática de células.

Teste de contingência de lotes de alimentadoras MNC que não atendem aos critérios de aceitação

[001691] Caso um de lote de alimentadoras MNC não tivesse atendido a qualquer um dos critérios de aceitação apresentados acima, as etapas seguintes voltariam a ser testadas no lote para descartar erro simples do avaliador como sua causa.

[001692] Caso houvesse dois ou mais frascos satélites restantes para

testes, então, o lote era retestado. Se houvesse um ou nenhum frasco satélite restante para testes, então, o lote era reprovado de acordo com os critérios de aceitação listados acima.

[001693] Para ser qualificado, o lote em questão e o lote controle tinham de atingir os critérios de aceitação acima. Ao satisfazer esses critérios, o lote era então liberado para uso.

Exemplo 4: Qualificação de lotes individuais de células mononucleares do sangue periférico submetidas à radiação gama

[001694] Esse exemplo descreve um procedimento abreviado inovador para qualificar lotes individuais células mononucleares do sangue periférico (PBMC) gama-irradiadas para uso como células alimentadoras alogênicas nos métodos exemplares aqui descritos. Esse exemplo fornece um protocolo para avaliação de lotes de células PBMC irradiadas para uso na produção de lotes clínicos de TIL. Cada lote de PBMC irradiadas foi preparado a partir de um doador individual. No transcorrer de mais de 100 protocolos de qualificação, foi demonstrado que, em todos os casos, os lotes de PBMC irradiados do SDBB (San Diego Blood Bank) expandem TIL >100 vezes no dia 7 de um REP. Esse protocolo modificado de qualificação destinava-se a ser aplicado a lotes de PBMC irradiados do doador do SDBB que foram então testados mais para verificar se a dose recebida de radiação gama fora suficiente para torná-las incompetentes para replicação. Uma vez demonstrado que elas se mantinham incompetentes para replicação durante o ciclo de 14 dias, os lotes de PBMC do doador eram considerados “qualificados” para uso na produção de lotes clínicos de TIL.

Fundamentos

[001695] PBMC gama-irradiadas, com crescimento sustado, eram requeridas para REP padrão atual de TIL. Receptores de membrana nas PBMCs ligam-se ao anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e reticulam com TIL em cultura, estimulando o TIL para expandir. Lotes de PBMC foram

preparados a partir de leucoférese de sangue total coletado de doadores individuais. O produto da leucoférese foi submetido à centrifugação com Ficoll-Hypaque, lavado, irradiado e crioconservado sob condições BPF. É importante que os pacientes que receberam a terapia com TIL não sejam infundidos com PBMCs viáveis, pois isso poderia resultar na doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD). O crescimento de PBMCs dos doadores é, portanto, sustado submetendo as células à irradiação gama, resultando em quebras de fita dupla do DNA e a perda de viabilidade celular das PBMCs quando da recultura.

Critérios de avaliação

[001696] 7.2.1. O critério de avaliação para lotes de PBMC irradiadas era a sua incompetência para replicação.

Configuração experimental

[001697] Lotes de alimentadoras foram testadas no formato de mini-REP como se fossem ser cocultivadas com TIL, usando frascos de cultura de tecido T25 na posição ereta. Lote controle: Um lote de PBMCs irradiadas, que haviam demonstrado historicamente atender ao critério de 7.2,1, foi testado lado a lado com os lotes experimentais como controle. Para cada lote testado de PBMC irradiadas do doador, frascos em duplicata foram testados.

Protocolo experimental

Dia 0

[001698] Preparados ~90 mL de meio CM2 para cada lote de PBMC do doador a ser testado. Mantido CM2 morno em banho-maria a 37 ºC. Descongelada uma alíquota de IL-2 6 x 10^6 UI/mL. Devolvido o meio CM2 para o BSC, limpando com EtOH 70% antes de colocar na capela. Para cada lote de PBMC testado, removidos cerca de 60 mL de CM2 para um frasco estéril separado. Adicionada IL-2 da solução estoque descongelada 6 x 10^6 UI/mL a esse meio para uma concentração final de 3000 UI/mL. Feita a identificação desse frasco como “CM2/IL2” (ou similar) para distingui-lo do

CM2 não suplementado.

Preparação de OKT3

[001699] Retirada a solução estoque de anti-CD3 (OKT3) da geladeira a 4 ºC e colocada no BSC. Usou-se um concentração final de OKT3 30 ng/mL no meio do mini-REP. Preparada uma solução de trabalho 10 µg/mL de anti-CD3 (OKT3) a partir da solução estoque 1 mg/mL. Colocada na geladeira até que necessária.

[001700] Para cada lote de PBMC testado, prepare 150 µL de uma diluição 1:100 do estoque de anti-CD3 (OKT3). Por exemplo, para testar 4 lotes de PBMC ao mesmo tempo, prepare 600 µL de anti-CD3 10 µg/mL (OKT3) adicionando 6 µL da solução estoque 1 mg/mL a 594 µL de CM2 suplementado com IL-2 3000 UI/mL.

Preparação de Frascos

[001701] Adicionados 19 mL por frasco de CM2/IL-2 aos frascos T25 identificados e colocados os frascos incubadora umidificada a 37 ºC em CO_2 5% durante a preparação de células.

Preparação de PBMC irradiadas

[001702] Recuperados frascos de lotes de PBMC a serem testados do armazenamento com LN_2. Esses foram colocados a -80 ºC ou mantidos em gelo seco antes do descongelamento. Colocados 30 mL de CM2 (sem suplemento de IL-2) em tubos cônicos de 50 mL para cada lote a ser descongelado. Feita identificação de cada tubo com os diferentes números de lote das PBMC a serem descongeladas. Fechados os tubos hermeticamente e colocar em banho-maria a 37 ºC antes do uso. Se necessário, devolver os tubos cônicos de 50 mL para o BSC, limpando com EtOH 70% antes de colocar na capela.

[001703] Removido um frasco de PBMC do armazenamento frio e colocado em um *rack* oscilante de tubos em banho-maria a 37 ºC para descongelar. Deixado o descongelamento prosseguir até que permaneça uma

quantidade pequena de gelo no frasco. Com uma pipeta estéril de transferência, transferido imediatamente o conteúdo do frasco para os 30 mL de CM2 no tubo cônico de 50 mL. Removido aproximadamente 1 mL de meio do tubo para enxaguar o frasco; Devolvido o enxaguado ao tubo cônico de 50 mL. Fechado hermeticamente e rodado gentilmente para lavar as células.

[001704] Centrifugado a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Aspirado o sobrenadante e ressuspensos o *pellet* celular em 1 mL de CM2/IL-2 morno usando uma ponta de pipeta de 1000 µL. Alternativamente, antes de adicionar o meio, ressuspenso o pellet celular arrastando o tubo fechado ao longo de *rack* sem tubos. Após ressuspensão do *pellet* celular, completado o volume até 4 mL com meio CM2/IL-2. Registrado o volume.

[001705] Removida uma pequena alíquota (p. ex., 100 µL) para contagem de células usando um contador automático de células. Realizadas contagens em duplicata de acordo com o POP específico para o contador automático de células. Mais provavelmente, era necessário fazer uma diluição das PBMC antes de realizar as contagens de células. Uma diluição inicial recomendada era 1:10, mas essa variava dependendo do tipo de contador de célula usado. Registradas as contagens.

[001706] Ajustada a concentração de PBMC para 1,3 x 10^7 células/mL com meio CM2/IL-2. Misturado bem, rodando gentilmente ou aspirando gentilmente para cima e para baixo com uma pipeta sorológica.

Preparação dos frascos de cultura

[001707] Devolvidos dois frascos T25 identificados para o BSC desde a incubadora de cultura de tecido. Devolvido o frasco de anti-CD3/OKT3 10 µg/mL para o BSC. Adicionado 1 mL da suspensão celular com 1,3 x 10^7 PBMC a cada frasco. Adicionados 60 µL do anti-CD3/OKT3 10 µg/mL a cada frasco. Devolvidos os frascos tampados para incubadoras de cultura de tecido por 14 dias de crescimento sem perturbação. Colocado o frasco com

anti-CD3/OKT3 de volta na geladeira, até necessário para o lote seguinte. Repetido para cada lote de PBMC a ser avaliado.

Dia 14, Medição de não proliferação de PBMC

[001708] Devolvidos os frascos T25 em duplicata para o BSC. Para cada frasco, com uma pipeta sorológica fresca de 10 mL, removidos ~17 mL de cada um dos frascos, puxando, então, cuidadosamente o resto do meio para medir o volume restante nos frascos. Registrado o volume.

[001709] Misturada bem a amostra mexendo com a mesma pipeta sorológica para cima e para baixo.

[001710] Removida uma amostra de 200 µL de cada frasco para contagem. Contadas as células usando um contador automático de células. Repetidas as etapas para cada lote de PBMC em avaliação.

Resultados e critério de aceitação

Resultados

[001711] A dose de radiação gama, esperava-se, era suficiente para tornar as render as células alimentadoras incompetentes para replicação. Todos os lotes, esperava-se, atenderiam ao critério de avaliação, demonstrando uma redução no número de células alimentadoras viáveis totais restantes no Dia 14 da cultura do REP em comparação ao Dia 0.

Critério de avaliação

[001712] O critério de aceitação a seguir foi atendido por cada lote de PBMC irradiado do doador testado: “Nenhum crescimento” – significando que o número total de células viáveis no Dia 14 era inferior ao número total de células viáveis iniciais colocadas em cultura no dia 0 do REP.

Testes de contingência de lotes de PBMC que não atendem ao critério de aceitação

[001713] Caso um de lote de PBMC irradiada do doador não atendesse o critério de aceitação acima, as etapas seguintes voltariam a ser testadas no lote para descartar erro simples do avaliador como a causa de sua falha. Caso

houvesse dois ou mais frascos satélites restantes para testes, então, o lote era testado. Se houvesse um ou nenhum frasco satélite restante para testes, então, o lote era reprovado de acordo com o critério de aceitação listado acima.

[001714] Para ser qualificado, o lote de PBMC submetido aos testes de contingência tinha, tanto o lote controle como ambas as réplicas do lote em questão, que atingir o critério de aceitação. Ao satisfazer esse critério, o lote era então liberado para uso.

Exemplo 5: Preparação da solução estoque de IL-2 (CELLGENIX)

[001715] Esse exemplo descreve o processo de dissolução de interleucina-2 humana recombinante purificada, liofilizada em amostras de estoque adequadas para uso em protocolos futuros de cultura de tecido, incluindo todos aqueles descritos no presente pedido de patente e nos Exemplos, incluindo aqueles que envolvem o uso de rhIL-2.

Procedimento

[001716] Preparada solução de ácido acético 0,2% (HAc). Transferidos 29 mL de água estéril para um tubo cônico de 50 mL. Adicionado 1 mL de ácido acético 1 N ao tubo cônico de 50 mL. Misturado bem invertendo o tubo 2-3 vezes. Esterilizada a solução de HAc por filtração usando um filtro Steriflip6

[001717] Preparar HSA 1% em PBS. Adicionados 4 mL de solução estoque de HSA 25% a 96 mL de PBS em uma unidade filtrante estéril de 150. Filtrada a solução. Armazenada a 4 ºC. Para cada frasco preparado de rhIL-2, preencher formulários.

[001718] Preparada solução estoque de rhIL-2 (concentração final: 6 x 10^6 UI/mL). Cada lote de rhIL-2 era diferente e requeria informações encontradas no Certificado de Análise (COA) do fabricante, tais como: 1) Massa de rhIL-2 por frasco (mg), 2) Atividade específica de rhIL-2 (UI/mg) e 3) Volume recomendado para reconstituição de HAc 0,2% (mL).

[001719] Calculado o volume de HSA 1%, necessário para o lote de

rhIL-2, usando a equação abaixo:

$$\left(\frac{\textit{Massa do frasco (mg) x Atividade biológica } (\frac{IU}{mg})}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc\ vol\ (mL) = 1\%\ HSA\ vol\ (mL)$$

[001720] Por exemplo, de acordo com o COA do lote10200121 de rhIL-2 da CellGenix, a atividade específica para o frasco-ampola de 1 mg é 25 x 10^6 UI/mg. Recomenda reconstituir a rhIL-2 em 2 mL de HAc 0,2%.

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[001721] Limpada a rolha de borracha de IL-2 com lenço de álcool. Com uma agulha 16G acoplada a uma seringa de 3 mL, injetado o volume recomendado de HAc 0,2% no frasco. Tomado cuidado para não desalojar a rolha quando a agulha é retirada. Invertido o frasco 3 vezes e rodado até que todo o pó esteja dissolvido. Removida a tampa cuidadosamente e colocada de lado sobre um lenço de álcool. Adicionado o volume calculado de HSA 1% ao frasco.

[001722] Armazenamento da solução de rhIL-2. Para armazenamento de curta duração (<72 h), armazenado o frasco a 4 ºC. Para armazenamento prolongado (>72 h), Volume do frasco repartido em alíquotas menores e armazenado em criotubos a -20 ºC até que prontos para uso. Evitados ciclos de congelamento/descongelamento. Vencido 6 meses após a data de preparação. Etiquetas de Rh-IL-2 incluíam fornecedor e número de catálogo, número de lote, iniciais do operador, concentração e volume de alíquota.

Exemplo 6: Processo de crioconservação

[001723] Esse exemplo descreve o método do processo de crioconservação para TILs preparados com o procedimento abreviado, fechado descrito no Exemplo G usando o CryoMed Controlled Rate Freezer,

Modelo 7454 (Thermo Scientific).

[001724] O equipamento usado foi o seguinte: *rack* com suporte para cassetes de alumínio (compatível com bolsas de *freezer* CS750), cassetes de crioarmazenamento para bolsas de 750 mL, tanque de nitrogênio líquido de baixa pressão (22 psi), geladeira, sensor termopar (tipo fitilho para bolsas) e bolsas CryoStore CS750 Freezing (oriGen Scientific).

[001725] O processo de congelamento permite uma taxa de 0,5 ºC desde a nucleação até -20 ºC e taxa de resfriamento de 1 ºC por minuto até temperatura final de -80 ºC. Os parâmetros do programa são como segue: Etapa 1 – tempo de espera a 4 ºC; Etapa 2: 1,0 ºC/min. (temperatura da amostra) até -4 ºC; Etapa 3: 20,0 ºC/min. (temperatura da câmara) até -45 ºC; Etapa 4: 10,0 ºC/min (temperatura da câmara) até -10,0 ºC; Etapa 5: 0,5 ºC/min. (temperatura da câmara) até -20 °C; e Etapa 6: 1,0 ºC/min (temperatura da amostra) até -80 ºC.

Exemplo 7: Uso do coquetel de citocinas com IL-2, IL-15 e IL-21

[001726] Esse exemplo descreve o uso das citocinas IL-2, IL-15 e IL-21, que servem como fatores de crescimento de células T adicionais, em combinação com o processo de TILs dos Exemplos 1 a 6.

[001727] Com o uso dos processos dos Exemplos 1 a 9, TILs de tumores colorretal, melanoma, cervical, de mama triplo negativo, pulmão e renal foram cultivados na presença de IL-2, em um braço do experimento e, no lugar de IL-2, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 em outro braço no início da cultura. Na conclusão do pré-REP, as culturas foram avaliadas quanto à expansão, fenótipo, função (CD107a+ e IFNγ) e repertório de TCR Vβ. IL-15 e IL-21 são descritas em outro lugar no presente e em Gruijl, *et al*., IL-21 promove a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor CD27+CD28+ com alto potencial citotóxico e baixa expansão colateral de células T reguladoras T, *Santegoets, S. J.,* J Transl Med., **2013,** *11:*37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

[001728] Os resultados mostraram que a expansão reforçada de TILs (>20%), em células $CD4^+$ e $CD8^+$ nas condições de tratadas com IL-2, IL-15 e IL-21, foi observada em múltiplas histologias em relação às condições com IL-2 somente. Houve um enviesamento em direção a uma população predominantemente $CD8^+$ com repertório enviesado para TCR Vβ nos TILs obtidos das culturas tratadas com IL-2, IL-15 e IL-21 em relação às culturas com IL-2 somente.

Exemplo 8: Expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) a partir de aspirados por agulha fina (FNAs) e biópsias por agulha grossa

I. Fundamentos

[001729] Esse exemplo fornece dados relacionados à expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) a partir de amostras do tumor obtidas por aspirações com agulha fina ou biópsias por agulha grossa.

[001730] O objetivo do estudo era desenvolver um método para expansão de TILs a partir de amostras de biópsia por agulha grossa ou aspirados por agulha fina. Em alguns casos, 3 a 5 amostras do tumor foram obtidas de pacientes com câncer, tais como câncer de pulmão (n=3), melanoma (n=1), câncer da cabeça e pescoço (n=1), câncer cervical (n=1), câncer de ovário (n=3), câncer de pâncreas (n=2), glioblastoma (GBM) e câncer colorretal (n=1).

II. TILs expandidos a partir de biópsias por agulha grossa de um paciente com câncer de pâncreas (P7015).

[001731] Amostras de biópsia de pâncreas foram recebidas para o estudo. Um fragmento foi colocado em uma cavidade de um placa de 24 cavidades, totalizando 5 cavidades. Quando dois fragmentos foram colocados em duas cavidades, pouco a nenhum crescimento foi observado nessas cavidades. Três cavidades foram tratadas com meio de cultura suplementado com IL-2 e duas cavidades foram tratadas com meio de cultura suplementado com um coquetel de citocinas contendo IL-2, IL-15 e IL-21.Células viáveis

foram observadas nas cavidades tratadas com IL-2 apenas (Figura 8A) e nas cavidades tratadas com o coquetel de citocinas (Figura 8B). Aproximadamente 1,3 x 10^6 células viáveis/cavidade (1,2 x 10^6 células viáveis/cavidade em média) foram obtidas no tratamento com IL-2. Aproximadamente 2,3 x 10^6 células viáveis/cavidade (2,0 x 10^6 células viáveis/cavidade em média) foram obtidas no tratamento com o coquetel de citocinas.

[001732] As Figuras 17A, 17B e 17C mostram a fenotipagem e *status* funcional de TILs derivados de uma biópsia por agulha grossa de tumores pancreáticos. Os TILs foram expandidos de tumores pancreáticos e cultura no meio contendo IL-2 ou meio suplementado com aditivos de cultura celular. TILs foram expandidos de tumores pancreáticos em meio de cultura suplementado com IL-2 e em meio de cultura contendo aditivos de cultura celular (Figura 17D). A Figura 17A mostra a percentagem de células que eram CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD3+/CD56+ ou CD3-/CD56+. A Figura 17B mostra a percentagem de células CD107a na subpopulação de CD4+ após estimulação com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) em comparação a uma condição de não estimulada. A Figura 17C mostra análise funcional dos TILs expandidos da biópsia por agulha grossa do pâncreas. O gráfico mostra a percentagem de células CD107a na subpopulação de CD8+ após estimulação com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) em comparação a uma condição de não estimulada.

[001733] A maioria das células expandidas a partir de amostras de biópsia de pâncreas é de células T (células CD4+ e células CD8+). A estimulação com PMA demonstrou a capacidade da CD8+ para desgranular, como indicado pela expressão de CD107a+, sugerindo, com isso, que essas células são funcionais. A % de CD8+ expressando CD107a+ foi maior nas cavidades tratadas com os aditivos de cultura, quando comparado a IL-2 apenas (Figura 17C).

III. TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com carcinoma cervical (C2005)

[001734] Um tumor cervical foi recebido para o estudo. Cinco aspirados por agulha fina foram isolados do tumor utilizando uma agulha calibre 22 e seringa. Cada amostra do FNA foi colocada em pelo menos três cavidades de uma placa de 24 cavidades. Duas cavidades de cada amostra foram tratadas com IL-2 e uma cavidade de cada amostra foi tratada com o coquetel de citocinas (IL-2, IL-15 e IL-21).

[001735] A Figura 10A mostra que células T CD4+ e CD8+ estavam presentes nos FNAs tratados com IL-2. Em média, 3,45 x 10^5 células viáveis/cavidade estavam presentes nas cavidades tratadas com IL-2. A Figura 10B mostra que células T CD4+ e CD8+ T estavam presentes em FNAs tratados com o coquetel de citocinas. Em média, 8,69 x 10^5 células viáveis/cavidade estavam presentes nessas cavidades. Os aspirados tratados com IL-2. IL-15 e IL-21 demonstraram mais células/cavidade quando comparados aos aspirados tratados com IL-2. A percentagem de células CD8+ foi maior nas cavidades tratadas com o coquetel (20,1%) quando comparadas às cavidades tratadas com IL-2 (8,58%).

IV. TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com carcinoma de pulmão (L4032)

[001736] Três tumores de pulmão foram recebidos para o estudo. Aspirados por agulha fina foram isolados dos tumores usando uma agulha calibre 22 e seringa. Uma amostra de FNA incluiu 1,6 x 10^6 células com 28% células viáveis. Duas cavidades (cada condição) foram tratadas com meio de cultura suplementado com (1) IL-2 apenas ou (2) o coquetel de citocinas. Além disso, fragmentos de tumor pulmonar foram cultivados em uma placa de 24 cavidades (duas cavidades cada) como controle. Células foram coletadas no dia 13 e avaliadas por análise de FACS.

[001737] A Figura 11A mostra que células T expandiram a partir de

uma amostra de FNA tratadas com IL-2. Havia, em média, aproximadamente 4,64 x 10^5 células viáveis/cavidade. A Figura 11B mostra que células T cells expandiram a partir de uma amostra de FNA tratada com o coquetel contendo IL-2, IL-15 e IL-21. Havia, em média, aproximadamente 7,75 x 10^5 células viáveis/cavidade. A Figura 11C mostra que células T expandiram a partir de um fragmento de tumor pulmonar tratado com IL-2. Havia, em média, aproximadamente 4.28 x 10^5 células viáveis/cavidade.

[001738] Em seguida, os TILs cultivados a partir das amostras de FNA foram expandidas com um Protocolo de Expansão Rápida (p. ex., protocolo com segunda expansão ou etapa D). As células foram coletadas no dia 14 e avaliadas por análise de FACS. A Figura 12A mostra a contagem de células totais dos TILs expandidos a partir das amostras de FNA tratadas com (i) IL-2, (ii) IL-2, IL-15 e IL-21 e (iii) IL-2, IL-15 e IL-21 em IL-2. A Figura 12A mostra que, depois da segunda expansão, os TILs incluíam células T CD4+ e CD8+ (84,1% e 10,3%, respectivamente).

V. TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com carcinoma de pulmão (L4033)

[001739] Um aspirado por agulha fina foi isolado a partir de um tumor pulmonar usando uma agulha calibre 22 e seringa. A amostra de FNA incluía 5,5 x 10^6 células com 76% de células viáveis. Um frasco G-Rex 10 (cada condição) foi tratado com meio de cultura contendo (1) IL-2 apenas ou (2) o coquetel de citocinas. Além disso, quatro fragmentos de tumor pulmonar foram cultivados em um frasco G-Rex 10 como controle. Células foram coletadas no dia 12 e avaliadas por análise de FACS. A Figura 13A mostra que foram obtidas células T CD4+ (4,25%) e células T CD8+ (55,1%) da amostra de FNA tratada com IL-2. A Figura 13B que foram obtidas células T CD4+ (7,76%) e células T CD8+ (54,5%) dos fragmentos de tumor tratados com IL-2.

[001740] Next, os TILs cultivados a partir das amostras de FNA foram

expandidos usando um Protocolo de Expansão Rápida (p. ex., protocolo com segunda expansão ou etapa D). Os aspirados foram incubados durante os primeiros 6 dias em um tubo cônico. As células foram coletadas no dia 14 e avaliadas por análise de FACS. A Figura 14 mostra a contagem de células totais dos TILs expandidos a partir das amostras de FNA e os fragmentos de tumor tratados com IL-2. O gráfico mostra que TILs a partir das amostras de FNA expandiram do mesmo modo que os TILs dos fragmentos de tumor.

[001741] Em um experimento semelhante, amostras de FNA foram isolados e três amostras de tumor pulmonar de um paciente com carcinoma de pulmão (L4034). Aproximadamente 1,0 x 10^6 células de uma amostra de FNA foram cultivadas em um frasco G-Rex 10 por 15 dias em meio de cultura suplementado com IL-2 apenas. Como controle, quatro fragmentos tumorais foram cultivados em um frasco G-Rex 10 em meio de cultura suplementado com IL-2 apenas. Poucas ou nenhum célula detectável foi coletada na cultura de a partir de FNA.

VI. TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de pacientes com carcinoma de ovário (OV8011, OV8012, e OV8013)

[001742] Três tumores ovarianos (OV8011, OV8012, e OV8013) foram recebidos para o estudo. Aspirados por agulha fina foram isolados dos tumores usando uma agulha calibre 22 e seringa.

[001743] A amostra de FNA de OV8011 incluía 3,19 x 10^5 células com 28% de células viáveis. Essa amostra de FNA foi dividida em quatro cavidades; duas cavidades foram cultivadas em meio de cultura contendo IL-2 e duas cavidades foram cultivadas em meio de cultura contendo IL-2, IL-15 e IL-21. A amostra de FNA de OV8012 incluía 8,3 x 10^5 células com 11% de células viáveis. Essa amostra de FNA amostra foi dividida em duas cavidades; uma cavidade foi cultivada em meio de cultura contendo IL-2 e a outra cavidade foi cultivada em meio de cultura contendo IL-2, IL-15 e IL-21. A amostra de FNA de OV8013 incluía 1,5 x 10^5 células com 7% de células

viáveis. Essa amostra de FNA foi dividida em duas cavidades; uma cavidade foi cultivada in meio de cultura contendo IL-2 e a outra cavidade foi cultivada em meio de cultura contendo IL-2, IL-15 e IL-21. Não foi observada a partir das amostras de FNA.

[001744] Como controle, quatro fragmentos tumorais de cada tumor foram cultivados em um frasco G-Rex 10. Alguns frascos receberam meio de cultura contendo IL-2 apenas e outros frascos receberam meio de cultura contendo IL-2, IL-15 e IL-21. A Figura 15 mostra as contagens de células totais das células derivadas dos fragmentos tumorais ovarianos cultivados em meio de cultura contendo (1) IL-2 apenas ou (2) o coquetel de citocinas. Os resultados mostram que os tumores ovarianos expandiram pouco na primeira expansão.

VII. TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com melanoma (M1101)

[001745] Um tumor melanoma (M1101) foi recebido para o estudo. Uma amostra de FNA foi obtida do tumor. A amostra incluía 1,96 x 10^6 células com 65% de células viáveis. A amostra foi colocada em um frasco G-Rex 10 e tratada com meio de cultura suplementado com IL-2. Como controle, quatro fragmentos tumorais do melanoma foram colocados em um frasco G-Rex 10 e tratados com meio de cultura suplementado com IL-2. As células foram coletadas no Dia 12. A Figura 16A mostra que células T CD4+ (21,4%) e células T CD8+ (52,8%) expandiram a partir da amostra de FNA tratada com IL-2. A Figura 16B mostra que células T CD4+ (18,0%) e células T CD8+ (71,5%) expandiram a partir dos fragmentos de tumor tratados com IL-2.

[001746] As Figuras 18A e 18B fornecem um resumo dos resultados obtidos das biópsias por agulha grossa e aspirados por agulha fina.

VIII. TILs expandidos a partir de aspirados por agulha fina de um paciente com melanoma (M1101)

[001747] No Dia 11 do pré-REP, realizaram-se contagens de células nos frascos contendo o aspirado e fragmentos (n=2). As culturas pré-REP contendo os fragmentos foram coletadas no Dia 11 (Gen2). A cultura pré-REP contendo o aspirado foi continuada devido à contagem baixa de células no Dia 11. O aspirado foi recontado no Dia 18 e então, novamente, no Dia 21 (Figura 19A). No Dia 21, a cultura havia atingido quase 60 x 10^6 células, as células foram coletadas nesse momento e avaliadas por citometria de fluxo. O fenótipo (Figura 19B) e a função (expressão de CD107a, Figura 19C) dos TILs pré-REP dos fragmentos e aspiradora demonstraram ser comparáveis.

[001748] As Figuras 19A, 19B e 19C mostram a expansão de TILs a partir de uma amostra de FNA de outro paciente com melanoma (M1107). A Figura 19A mostra a contagem de células totais em momento diferente durante a expansão. A Figura 19B mostra o fenótipo dos TILs expandidos. A Figura 19C mostra a análise funcional dos TILs expandidos a partir dos fragmentos e aspirados. O gráfico mostra a percentagem de células CD107a nas subpopulações de CD4+ e CD8+ após a estimulação com PMA em comparação a uma condição de não estimulada.

Exemplo 9: Expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) a partir de aspirados por agulha fina (FNAs) e biópsias por agulha grossa

I. Amostras de biópsia de pâncreas: Dados mostrados nas Figuras 20-29

[001749] Quinze tumores (Pancreático, Pulmonar, Cervical, Mesotelioma, Colorretal) foram relatados. Até o momento, 37 amostras do tumor de histologia diferente, incluindo câncer pancreático, cervical, pulmonar, oral e esofágico, sarcoma, foram recebidas.

[001750] Ao chegarem, os tumores foram fragmentados e colocados em frascos/placa com IL-2 para um protocolo de pré-Expansão Rápida (REP). TILs pré-REP foram ainda propagados em um protocolo REP na presença de PBMCs irradiados, anticorpo anti-CD3 (30 ng/mL) e IL-2 (3000 UI/mL). TILs pré-REP de pulmão e sarcoma foram expandidos a partir de 4

fragmentos tumorais em formato de placa com 24 cavidades por até 22 dias. Outros cânceres foram expandidos a partir de 4 fragmentos tumorais em G-REX TIL por até 22 dias.

II. TILs podem ser expandidos a partir de biópsias por agulha grossa de câncer de pâncreas: dados mostrados nas Figuras 30-37

Conclusões gerais

[001751] A cinética de crescimento demonstrou muito poucas células no Dia 11-12 em ambos, P7028 e P7031, no entanto, expansão significativa foi demonstrada entre o Dia 21-28.

[001752] A maioria das células expandidas a partir das amostras de biópsia de pâncreas é de células T e com fenótipo de CD4+. TILs isolados de tumores pancreáticos são tipicamente CD4+.

[001753] A estimulação com PMA demonstrou a capacidade da CD4+ para desgranular, como indicado pela expressão de CD107a+, sugerindo, com isso, que essas células são funcionais, como mostrado nos estudos anteriores com P7015. A expressão de CD107a foi semelhante em TIL derivados de fragmentos.

[001754] Os TIL derivados de fragmentos por agulha grossa secretaram níveis significativos de IFNγ em um ensaio de reestimulação com anti-CD3 ligado à placa, de modo semelhante aos TIL derivados de fragmentos.

[001755] A fenotipagem extensiva demonstrou expressão semelhante da maioria dos marcadores avaliados em TIL derivados de fragmentos tumorais, sugerindo que o resultado de cultivar TILs a partir de fragmentos de agulha grossa é semelhante ao de fragmentos.

[001756] O painel de exaustão/ativação demonstrou diferenças significativas em PD-1, Tim3 e KLRG1 nas células CD4+ e LAG3, Tim3 e KLRG1 nas células CD8+. Estudos adicionais com fragmentos pancreáticos de biópsias por agulha grossa são necessários para validar esses achados.

Proposições gerais:

[001757] Esses resultados sugerem que o processo para cultivar TIL com êxito a partir de amostras de biópsia de pâncreas (e de outras histologias) provavelmente requererá tempo adicional em cultura (para além dos requisitos para pré-REP de Gen2), a menos utilizadas "estratégias de afinação" adicionais para reforçar o crescimento (ver abaixo).

[001758] Com base nos dados preliminares de crescimento em amostras de biópsia de pâncreas, recomenda-se que processo pré-REP processo ocorra entre Dia 21-28, com o objetivo de obter células suficientes.

[001759] Para esse processo, o pré-REP deve ser iniciado em frascos G-Rex 10 ou G-Rex 10M com meio CM1 e IL-2/IL-15/IL-21.

[001760] O REP deve ser iniciado em um G-Rex 100M ou G-Rex 500M, dependendo da contagem de células pré-REP.

[001761] G-Rex 500M: se a contagem de células for 5×10^7.

[001762] G-Rex 100M: se a contagem de células for entre $1\text{-}5 \times 10^7$.

[001763] Experimentos futuros serão usados para determinar o número mínimo requerido de células para o crescimento de células suficientes em cada vaso.

[001764] Experimentos futuros compararão o crescimento, fenótipo e função de amostras de biópsia de pâncreas expandidas em IL-2/IL-15/IL-21 sozinhos ou com IL-2/IL-15/IL-21 com OKT3 e alimentadoras.

Exemplo 10: Expansão de TIL com biópsias por agulha grossa

Justificativa:

[001765] A remoção/ressecção do tumor não é apropriada nem viável para todos os pacientes. Nessa coorte de pacientes, biópsias por agulha grossa podem ser uma fonte de TIL para ACT (terapia celular adotiva). Tais biópsias por agulha grossa permitem coletar amostras de múltiplas lesões e obter potencialmente um repertório mais amplo de TIL.

Estratégia:

[001766] O presente exemplo fornece um método para expandir TIL a

partir de biópsias por agulha grossa, de múltiplas histologias, e desenvolver um processo definido que seja viável para produção de TIL a partir de biópsias por agulha grossa. Ver, por exemplo, a Figura 38 que fornece um diagrama de dois processos exemplares.

Dados

[001767] A capacidade para expandir TIL a partir de biópsias foi demonstrada para amostras de biópsia por agulha grossa de pâncreas usando Gen2, o qual também mostrou que TIL obtidos de biópsias são fenotípica e funcionalmente comparáveis aos TIL obtidos de fragmentos.

[001768] Sete conjuntos de amostras por agulha grossa de pâncreas (entre 7-10 amostras) foram tratados com IL-2/IL-15/IL-21 e submetidos ao pré-REP e avaliados quanto à expansão. Três conseguiram expandir, no entanto, o crescimento foi extremamente variável. Culturas Pré-REP exigiram pelo menos 21-28 dias para adquirir números suficientes de células (p. ex., 21-28 dias para as Etapas A a E da Figura 7). A fenotipagem extensiva demonstrou expressão semelhante da maioria dos marcadores avaliados em TIL derivados de fragmento de tumor pancreático. A expressão de CD107a e IFNγ foi semelhante em TIL derivados de fragmentos

Protocolo atual:

[001769] A adição de OKT3 e alimentadoras no Dia 3 de cultura reforçou a produção de TILs. Cultivados menos amostras por agulha grossa/frasco e avaliado o crescimento (por exemplo, 1-2 amostras cultivadas).

[001770] 1-2 biópsias por agulha grossa (3 de pâncreas, 4 de melanoma, 1 de mama e 1 ovariano) foram submetidos a um processo modificado em escala de pesquisa que incluiu a adição de OKT3 + alimentadoras no Dia 3 (Ver, Figuras 39-40).

[001771] • TIL foram submetidos a um segundo REP (p. ex., uma segunda expansão).

[001772] • Amostras de biópsia de pâncreas foram expandidas +/- IL15 e 21 (o coquetel triplo; REP1 e REP2; p. ex., uma primeira expansão e uma segunda expansão)

[001773] • Amostras de biópsia de ovário foram tratadas +/- OX40 (BMS) (n=1, dados preliminares).

[001774] • Todos os TIL foram submetidos a um segundo REP.

Pancreático

[001775] TIL de amostras de biópsia de pâncreas foram expandidos com êxito na presença de OKT3 + alimentadoras. $>50^6$ células foram adquiridas entre o Dia 11-17 da primeira expansão.

[001776] Duas amostras por agulha grossa foram em geral necessárias par adquirir os números adequados de células.

[001777] A adição do coquetel triplo (TC: IL-2, IL-15/IL-21) ao 2º REP (quer cultivado antes com IL-2 ou com o TC) não alterou significativamente a expansão de TIL em comparação a IL-2 isoladamente.

[001778] A adição de OKT3 + alimentadoras no Dia 3 a biópsias por agulha grossa não altera significativamente o fenótipo (memória, CD27/CD28, exaustão, ativação) de TIL em comparação a amostras por agulha grossa usando condições semelhantes às de Gen2. O fenótipo (memória, CD27/CD28, exaustão, ativação) de TIL expandidos através de 2 REPs não diferiu significativamente daquele de TIL cultivados usando condições do Gen2.

[001779] A expressão de CD107a não variou significativamente com a adição do OKT3 e alimentadoras. TIL expandidos através de 2 REPs mantiveram a capacidade para responder a estímulo não específico, conforme avaliado pela indução de CD107a.

[001780] TILs expandidos através de 2 REPs mantiveram a capacidade para responder a estímulo não específico, conforme avaliado pela indução de CD107a.

[001781] A secreção de IFNγ foi avaliada. TIL produzem IFNγ quando da estimulação com OKT3.

[001782] TILs pancreáticos podem ser expandidos a partir de biópsias por agulha grossa de câncer de pâncreas.

Resumo e resultados experimentais pré-REP de P7028 e P7031

[001783] Biópsias por agulha grossa foram colocadas em um G-Rex 10 com o coquetel triplo (IL-2/IL-15/IL-21)

[001784] TILS P7028 foram avaliados no Dia 12 e mantidos em cultura até o Dia 19

[001785] Contagens de células: Dia 12= 1,61 x 10^6 células viáveis; Dia 213,49 x 10^7 células viáveis

[001786] P7030 TIL foram avaliados no Dia 12 e mantidos em cultura até o Dia 27

[001787] Contagens de células: Dia 12= 1,52 x 10^5 células viáveis; Dia 27: 1,14 x 10^7 células viáveis

Melanoma

[001788] TIL derivados de amostras de biópsia de melanoma foram expandidos com êxito na presença de OKT3 + alimentadoras (n=4). >50 x 10^6 células foram adquiridas no Dia 12 da primeira expansão.

[001789] Um a dois fragmentos por agulha grosa foram em geral requeridos para adquirir os números adequados de células. A adição de OKT3 + alimentadoras no Dia 3 a biópsias por agulha grossa, não altera significativamente o fenótipo (memória, CD27/CD28, exaustão, ativação) de TIL em comparação a fragmentos usando condições semelhantes ao Gen2.

[001790] TILs expandidos através de 2 REPs responderam a estímulos não específicos, conforme avaliado pela mobilização de CD107a e secreção de IFNγ.

Pulmonar

[001791] TILs de 1 fragmento por agulha grossa do pulmão foram

expandidos com êxito na presença de IL-2+ OKT3 + alimentadoras no dia 0.>50 x 10^6 células foram adquiridas no Dia 11.

[001792] O fenótipo (memória, CD27/CD28, exaustão, ativação) de TIL expandidos através de 2-REPs variou ligeiramente de TIL expandidos a partir de amostras por agulha grossa tratadas com OKT3 + alimentadoras no Dia 3 do início da cultura. Houve um aumento na razão de CD8+/CD4+ nas amostras por agulha grossa tratadas no Dia 3.

[001793] Houve leves diferenças na expressão de CD28, CD69, CD39, CD49a, Tim3 e CD101 que foram observadas entre o Dia 0 e Dia 3 de condições em cultura.

[001794] Os TILs produziram IFNγ quando da estimulação com anti-CD3. As amostras de pulmão do Dia 0 tratadas com OKT3 + alimentadoras tiveram níveis maiores de IFNγ em comparação às amostras de pulmão do Dia 3 tratadas com OKT3 + alimentadoras.

[001795] Os TILs expandidos através de 2 REPs mantiveram a capacidade para responder a estímulo não específico, conforme avaliada por indução de CD107a.

[001796] Os TILs CD8+ das amostras de pulmão por agulha grossa do Dia 3 tratadas com OKT3 + alimentadoras eram oligoclonais quando comparados aos TILs de amostras do pulmão do Dia 0, tratados com OKT3 + alimentadoras, indicando um repertório diferente de TCR dependendo do momento da adição de OKT3 + alimentadoras.

Conclusões

[001797] A adição de OKT3 + alimentadoras a amostras por agulha grossa no Dia 3 de cultura melhorou significativamente a produção de TIL. >50 x 10^6 células (limite para início de REP2) foram adquiridas no período de 11-15 dias da primeira expansão em todas as histologias avaliadas (pancreática, melanoma, mamária e ovariana). Duas amostras (nas histologias avaliadas) foram suficientes para adquirir o número requerido de células.

[001798] TILs de pelo menos 2 amostras de mama foram expandidos com êxito na presença de IL-2+ OKT3 + alimentadoras, mas não com IL-2 isoladamente. >50 x 10^6 células foram adquiridas no Dia 11. Uma a duas amostras são suficientes para adquirir o número requerido de células.

[001799] Os dados sugerem que o fenótipo e a função de TIL expandidos a partir de amostras por agulha grossa (com OKT3+ alimentadoras precocemente) são semelhantes aos de amostras/fragmentos expandidos sob condições de Gen2 (IL-2 apenas). A adição de OX40 a amostras de biópsia de ovário melhorou a expansão de TILs em comparação a IL-2 isoladamente.

[001800] 1-2 amostras de biópsia de pâncreas não conseguiram expandir em IL-2 apenas.

[001801] Experimentos lado a lado serão realizados com fragmentos +/- OKT3+ alimentadoras no Dia 3. TILs produziram IFNγ quando da estimulação com OKT3 e experimentos adicionais estão em andamento. Diferenças em KLRG1, CD25 e PD1 foram observadas em amostras de biópsia de ovário tratadas +/-OX40 (população terapêutica de TILs).

[001802] O fenótipo, a função (potência) e repertório de TCR foram e continuam a ser avaliados (atualmente em curso). A adição de OKT3 + alimentadoras no Dia 3 a biópsias por agulha grossa não alterou significativamente o fenótipo (memória, CD27/CD28, exaustão, ativação) de TIL em comparação a fragmentos usando condições semelhantes ao Gen2. TILs expandidos através de 2 REPs responderam a estímulos não específicos, conforme avaliado pela mobilização de CD107a e secreção de IFNγ. O fenótipo (memória, CD27/CD28, exaustão, ativação) de TILs expandidos através de 2-REPs não diferiu significativamente daquele de TILs expandidos usando o processo 1-REP (ou seja, sem OKT3+alimentadoras durante a 1ª expansão) em amostras de biópsia de mama.

[001803] Foram observadas diferenças discretas na expressão de

KLRG1 e PD1.

[001804] TILs expandidos através de 2 REPs mantiveram a capacidade para responder a estímulo não específico, conforme avaliada por indução de CD107a.

[001805] A avaliação futura incluirá +/- a remoção de amostras por agulha grossa no Dia 3, bem como será realizada avaliação adicional do efeito de anti-OX40 sobre TILs expandidos.

Exemplo 11: Expansão de TIL a partir de biópsia por agulha grossa de mama e ovário usando OKT3+ Alimentadoras: Resumo dos Exemplos 9-10

[001806] TIL provenientes de pelo menos 2 amostras de mama foram expandidos com êxito na presença de IL-2+ OKT3 + alimentadoras, mas não na de IL-2 apenas. >50 x 10^6 células foram adquiridas no Dia 11.

[001807] A adição de OX40 a amostras de biópsia de ovário melhorou a expansão de TIL em comparação a IL-2 isoladamente.

[001808] O fenótipo (memória, CD27/CD28, exaustão, ativação) de TIL expandidos através de 2-REPs não diferiu significativamente daquele de TIL expandidos usando 1 processo REP processo (ou seja, sem OKT3+alimentadoras durante a 1ª expansão) em amostras de biópsia de mama.

[001809] Foram observadas diferenças discretas na expressão de KLRG1 e PD1.

[001810] Diferenças em KLRG1, CD25 e PD1 foram observadas em amostras de biópsia de ovário tratadas +/-OX40 (produto final).

[001811] TIL produzem IFNγ quando da estimulação com OKT3.

[001812] TILs expandidos através de 2 REPs mantiveram a capacidade para responder a estímulo não específico, conforme avaliado por indução de CD107a.

[001813] A adição de OKT3 + alimentadoras a amostras por agulha grossa no Dia 3 melhorou significativamente a produção de TIL. >50 x 10^6

células (limite para início de REP sob condições do Gen2) foram adquiridas no período de 11-15 dias em todas as histologias avaliadas (pancreática, melanoma, mamária e ovariana). Duas amostras (nas histologias avaliadas) são suficientes para adquirir o número requerido de células. Dados preliminares sugerem que o fenótipo e a função de TIL expandidos a partir de amostras por agulha grossa (com OKT3+ alimentadoras precocemente) são semelhantes aos de amostras/fragmentos expandidos sob condições controle.

Exemplo 12: Expansão de TIL a partir de aspirados por agulha

Estratégia:

[001814] Expandir TIL a partir de aspirados por agulha de múltiplas histologias e desenvolver um processo definido que seja viável para produção de TIL. Estudos preliminares demonstraram que TIL poderiam ser expandidos a partir de "alguns" aspirados realizados sob condições ótimas (ou seja, retirados diretamente de biópsias tumorais).

[001815] 22 aspirados foram isolados de biópsias de tumores de várias histologias usando as condições Gen Iovance (ou seja, sem OKT3 e alimentadoras no Dia 3). Foi observado crescimento em 6 tumores (1 cervical, 2 de pulmão e 3 melanomas). O número de células isoladas durante o pré-REP foi bem abaixo do limite de 50 x 10^6 células.

[001816] Além disso, 10 aspirados por agulha foram recebidos, incluindo três de melanoma (n-3) e sete de mama (n-7). Os aspirados foram tratados com OKT3 e alimentadoras.

[001817] Devido aos pequenos números iniciais de células, a maioria dos experimentos foram iniciados em uma placa de 96 cavidades. <50 x 10^6 células foram obtidas no Dia 11 em todos os aspirados. Diversas subculturas seriam requeridas para adquirir o número necessário de células.

Exemplo 13: Expansão de TIL a partir de biópsias por agulha grossa de tumores

Introdução

[001818] A terapia adotiva de células T (ACT) com linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) autólogos demonstrou eficácia clínica em pacientes com melanoma metastático e carcinoma cervical. TIL são expandidos atualmente a partir de tumor fragmentado que é removido cirurgicamente. Infelizmente, pacientes com tumores irressecáveis não se qualificam atualmente para terapia com TIL. Se a expansão de TIL fosse viável a partir do tipo de pequenas amostras do tumor usadas pelos médicos para fins diagnósticos e de estadiamento, estudos correlativos e análises de biomarcadores, a terapia com TIL se tornaria disponível para um número maior de pacientes com câncer.

[001819] Uma biópsia por agulha grossa é um exemplo de tais amostras pequenas do tumor. Esse procedimento é pouco dispendioso, seguro, simples e menos invasivo do que a ressecção cirúrgica. Uma biópsia por agulha grossa remove um pequeno cilindro de tecido tumoral usando uma incisão pequena e agulha. Tipicamente, uma agulha pode ser inserida na incisão até 5 vezes para excisar uma quantidade adequada de tecido. Biópsias por agulha grossa são amostragens pequenas do microambiente tumoral intacto e, portanto, contêm células tumorais, estromas e células imunes, incluindo TIL. Até o momento, há um estudo clínico, em melanoma, que usou tecido derivado de biópsias por agulha grossa para expandir TIL (Ullenhag, G.J., *et al.*, *Cancer Immunol Immunother*, 61(5):725-732 (2014)). Os números absolutos de células e as vezes de expansão foram semelhantes entre TIL derivados de ressecção cirúrgica *versus* TIL derivados de biópsias por agulha grossa. Curiosamente, a maioria das respostas objetivas (4/5) nesse estudo foi tratada com células derivadas de biópsias por agulha grossa. Nenhum estudo mais corroborou esses achados.

[001820] Em algumas modalidades, um processo 2-REP é empregado para expandir TIL derivados de biópsias por agulha grossa, como descrito acima e no presente exemplo.

Objetivo

[001821] O presente exemplo fornece um protocolo para expandir TIL até números clinicamente adequados a partir de amostras tumorais pequenas para ACT (transferência celular adotiva). Esse protocolo foi desenvolvido usando biópsias por agulha grossa de tumores pancreáticos, melanoma, mamários e ovarianos. Os TIL expandidos foram avaliados em relação a crescimento, viabilidade, fenótipo, função (secreção de IFNγ, mobilização de CD107a) e repertório de TCR Vβ (sequenciamento de RNA).

Materiais

[001822] Tecido de amostra tumoral por agulha grossa. Amostras por agulha grossa do pâncreas, melanoma, mama e ovário são recebidas do UPMC, Biotheme e MT Group.

Procedimento

Processamento das amostras e início da cultura

[001823] Biópsias por agulha grossa de tumores recentemente ressecados são recebidas de alianças de pesquisa (UPMC) e fornecedores terceirizados de tecidos (Biotheme e MTG Group). As biópsias por agulha grossa do tumor são enviadas durante a noite em HyperThermosol (Biolife Solutions, Washington, Cat. nº 101104) (com antibiótico) ou RPMI 1640 (Fisher Scientific, Pennsylvania, Cat. nº 11875-085) + soro AB masculino humano (Access Biologicals, Califórnia, A13012).

[001824] Usando um filtro de 0,22 μM na parte superior de um tubo cônico de 50 mL, despejar cuidadosa e lentamente o conteúdo do recipiente de embarque compreendendo as biópsias por agulha grossa do tumor através do filtro. As amostras são retidas no filtro. Lavar as amostras adicionando gentilmente 10-20 mL de HBSS sobre as amostras.

[001825] Remover gentilmente cada amostra da membrana filtrante, enquanto tentando manter a amostra intacta. Com fórceps estéreis de plástico ou uma pipeta gentilmente (pipeta de 1 mL contendo aproximadamente 200

µL de HBSS), transferir a amostra para um G-Rex 10 com 40 mL de CM2 e 6000 UI/mL de IL-2.

Início de REP1 (p. ex., primeira expansão de preparação)

[001826] No Dia 3 pós-cultura, OKT3 (30 ng/mL) (Miltenyi Biotec, Germany, Cat. nº 170-076-116) e Alimentadoras (1:100) são adicionados ao G-Rex 10 sem perturbar a cultura quando da adição.

[001827] Avaliar o crescimento na cultura diariamente, por microscopia. O REP1 é conduzido por 8 dias após a adição de OKT3 + Alimentadoras e finaliza no Dia 11. As células permanecem intocadas por todo o período da cultura.

[001828] Para contar, remover cerca de 30 mL de meio e ressuspender as células nos 10 mL restantes de meio, com uma pipeta para cima e para baixo. Colocar as células em um tubo cônico de 50 mL e centrifugar a 1500 rpm e temperatura ambiente por 5 minutos em uma centrífuga Sorvell Legend XFR e rotor móvel do tipo caçamba (ThermoScientific, CA, Cat. nº 75003180).

[001829] Determinar contagens das células e a viabilidade, usando o Nexcelom Cellometer K2 (Nexcelom, MA).

[001830] Se após a centrifugação não houver *pellet*, ou se o *pellet* for < 200 µL, ressuspender o *pellet* em 2 mL de meio para contagem. Se o pellet for > 200 µL, ressuspender em 5 mL de meio CM2 para contagem.

[001831] Experimentos são coletados no Dia 11 pós-início da cultura (8 dias após a adição de OKT3 + Alimentadoras). O produto de REP1 é avaliado quanto à contagem de células, viabilidade, fenótipo (TIL1, TIL2 e TIL3 (painel de TIL2 e TIL3 para Coloração de Antígeno de Superfície de TIL), TIL3) e função (CD107a (Avaliação da função de TIL por mobilização de CD107a), IFNγ (WRK LAB-059)). As células restantes são congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Início de REP2 (p. ex., segunda expansão rápida)

[001832] Para início de mini-REP2, 1 x 10^5 células são colocadas em um G-Rex 10 com 40 mL de meio CM2 e 3000 UI/mL de IL-2. Anti-CD3 (clone: OKT3, 30 ng/mL) e Alimentadoras (razão 1:100, TIL:Alimentadoras) são adicionados no início da cultura. Todos os frascos são tratados com OKT3 + Alimentadoras no REP2, mesmo se OKT3 + alimentadoras não foram adicionados durante o REP1.

[001833] Uma mudança do meio é realizada no Dia 5-7 de REP2 (Dia 16-18 do processo). O meio no frasco G-Rex 10 tem o volume reduzido para cerca de 10 mL e suplementado até 40 mL com CM2 ou AimV + IL-2 3000 UI/mL.

[001834] No Dia 11 de REP2, o volume é reduzido como indicado acima e as células são centrifugadas a 1500 rpm e temperatura ambiente por 5 minutos.

[001835] O produto final é avaliado quanto à contagem de células, viabilidade, fenótipo (TIL1, TIL2 e TIL3 (painel de TIL2 e TIL3 para Coloração de Antígeno de Superfície de TIL, v1 e v2), TIL3 e função (CD107a (Avaliação da função de TIL por mobilização de CD107a, IFNγ). Células adicionais (1 x 10^6 - 5 x 10^6 células) são peletizadas e congeladas para sequenciamento do RNA e análise. As células restantes são congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Resultados e critérios de aceitação

[001836] O rendimento previsto para REP1 é > 50 x 10^6 em D11 em frascos que foram tratados com OKT3 + Alimentadoras. Prevê-se que as vezes de expansão durante REP2 não sejam afetadas pela adição de OKT3 e alimentadoras durante REP1 e que sejam coerentes com os números de vezes de expansão do REP de Gen2. Prevê-se que o fenótipo de TIL derivados de biópsias por agulha grossa e expostos precocemente a OKT3 + Alimentadoras seja semelhante àquele de TIL derivados de ressecções cirúrgicas (ou pequenas biópsias) e expandidos de acordo com o processo Gen 2.

Exemplo 14: Processo GEN 3 exemplar

[001837] O exemplo fornece uma comparação entre os processos Gen 2 e Gen 3. Esse exemplo descreve o desenvolvimento de uma plataforma robusta para expansão de TIL. As modificações ao processo Gen 2 reduzem o risco e agiliza o processo de fabricação ao reduzir o número de intervenções pelo operador, reduz o tempo global de fabricação, otimizar o uso de reagentes e facilitar um processo flexível, semifechado e semiautomático de produção de células, propício à fabricação de alto rendimento em escala de comercial.

[001838] TILs do processo Gen 2 e Gen 3 são compostos por TILs autólogos derivados de um paciente individual através de ressecção cirúrgica de um tumor e então expandidos *ex vivo*. A etapa de Primeira Expansão de Preparação do processo Gen 3o foi uma cultura celular na presença de interleucina-2 (IL-2) e o anticorpo monoclonal OKT3, direcionado ao co-receptor de células T CD3 em um arcabouço de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) irradiadas.

[001839] A manufatura de produtos TIL de Gen 2 consistia em duas fases: 1) pré-Expansão Rápida (Pré-REP) e 2) Protocolo de Expansão Rápida (REP). Durante o Pré-REP, tumores ressecados foram cortados em ≤ 50 fragmentos de 2-3 mm em cada dimensão que foram cultivados com meio de cultura contendo soro (meio RPMI 1640 contendo HuSAB 10% suplementado) e 6.000 UI/mL de Interleucina-2 (IL-2) por um período de 11 dias. No dia 11, os TIL foram coletados e introduzidos na expansão REP secundária em larga escala. O REP consiste em ativação de $\leq 200 \times 10^6$ das células viáveis provenientes do pré-REP em uma cocultura de 5×10^9 células alimentadoras PBMCs alogênicas irradiadas alimentadoras, carregadas com 150 µg de anticorpo monoclonal anti-CD3 (OKT3) em um volume de 5L CM2 suplementado com 3000 UI/mL de rhIL-2 por 5 dias. No dia 16, a cultura tem o volume reduzido para 90% e a fração celular é dividida em

múltiplos frascos G-REX-500 a ≥ 1 x 10^9 linfócitos viáveis/frasco e QS para 5L com CM4. Os TIL são incubados por 6 dias adicionais. O REP é coletado no dia 22, lavado, formulado e crioconservado antes do embarque a -150 ºC para o centro clínico para infusão.

[001840] A manufatura de produtos TIL do Gen 3 consistia em três fases: 1) Protocolo da Primeira Expansão de Preparação 2) Protocolo da Segunda Expansão Rápida (também referido como fase de expansão rápida ou REP) e 3) Divisão em Subculturas. Para efetuar a propagação de TILs na Primeira Expansão de Preparação, o tumor ressecado foi cortado em ≤ 120 fragmentos de 2-3 mm em cada dimensão. No dia 0 da Primeira Expansão de Preparação, uma camada de alimentadoras de aproximadamente 2,5 x 10^8 células alimentadoras PBMCs alogênicas irradiadas alimentadoras, carregadas com OKT-3, foi estabelecida sobre uma área de superfície de aproximadamente 100 cm^2 em cada um de 3 recipientes 100 MCS. Os fragmentos tumorais foram distribuídos nos 3 recipientes 100 MCS, cada um com 500 mL de meio de cultura CM1 contendo soro e 6.000 UI/mL de Interleucina-2 (IL-2) e 15 µg de OKT-3 por um período de 7 dias. No dia 7, REP foi iniciado, incorporando uma camada de células alimentadoras adicionais com aproximadamente 5 x 10^8 células alimentadoras PBMCs alogênicas irradiadas alimentadoras, carregadas com OKT-3 na fase de cultura do tumor fragmentado em cada um dos 3 recipientes 100 MCS e cultivados com 500 mL de meio de cultura CM2 e IL-2 6.000 UI/mL e 30 µg de OKT-3. O início de REP foi reforçado ativando a cultura inteira da Primeira Expansão de Preparação no mesmo recipiente, usando um sistema fechado para transferência de líquidos das células alimentadoras carregadas com OKT3 para o recipiente 100MCS. Para o Gen 3, o escalonamento vertical de TIL ou divisão envolveu etapas do processo em que a cultura celular inteira foi escalonada para um recipiente maior através da transferência de líquido em sistema fechado, e foi transferida (de um frasco de

100 M para um de 500 M) e 4L adicionais de meio CM4 foram acrescentados. As células REP foram coletadas no dia 16, lavadas, formuladas e crioconservadas antes do embarque a -150 ºC para o centro clínico para infusão.

[001841] No geral, o processo Gen 3 é uma plataforma mais curta, com escalonamento mais flexível e facilmente modificável para expansão que se acomodará com ajuste para fabricação robusta e comparabilidade entre processos.

Tabela 36: Comparação entre os processos de fabricação Gen 2 exemplar e Gen 3 exemplar

Etapa	Processo (Gen 2)	Processo (Gen 3)
Pré-REP Dia 0	Até 50 fragmentos/ 1-G-Rex 100MCS - 11 dias Em 1 L de meio CM1 + IL-2 (6000 UI/mL)	Tumor inteiro até 120 fragmentos divididos uniformemente entre até 3 frascos. 1 frasco: 1-60 fragmentos 2 frascos: 61-89 fragmentos 3 frascos 90-120 fragmentos 7 dias em 500 mL de meio CM1 + IL-2 (6000 UI/mL) 2,5 x 10^8 células alimentadoras/frasco 15 µg OKT-3/frasco
Início de REP	Direto para REP- Dia 11- <200 x 10^6 TIL (1) G-Rex 500MCS em 5L de meio CM2 IL-2 (3000 UI/mL) 5 x 10^9 células alimentadoras 150 µg OKT-3	Direto para REP- Dia 7- todas as células TIL- mesmo G-Rex 100MCS Adicionar 500 de meio M2 IL-2 (6000 UI/mL) 5 x 10^8 células alimentadoras/frasco 30 µg OKT-3/frasco
Propagação de TIL ou Escalonamento vertical	Reduzir volume, dividir a fração celular para até 5 G-REX 500MCS 4,5 L de meio CM4 + IL-2 (3000 UI/mL) ≥ 1 x 10^9 TVC / frasco Divisão no dia 16	Cada G-REX 100MCS (1L) transferido para 1 G-REX 500MCS Adicionar 4 L de meio CM4 +IL-2 (3000 UI/mL) Escalonamento vertical no dia 9 ao 11
Coleta	Coleta dia 22, Lavadora automática de células LOVO	Coleta dia 16 Lavadora automática de células LOVO
Formulação final	Produto crioconservado IL2 300 UI/mL - CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto crioconservado IL-2 300 UI/mL-CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas
Duração do processo	**22 dias**	**16 dias**

[001842] No dia 0, para ambos os processos, o tumor foi lavado 3 vezes e os fragmentos foram randomizados e divididos em dois *pools*; um pool por

processo. Para o Processo Gen 2, os fragmentos foram transferidos para um frasco GREX 100MCS com 1 L de meio CM1 contendo rhIL-2 6.000UI/mL. Para o Processo Gen 3, os fragmentos foram transferidos para um frasco GRE x 100MCS com 500 mL de CM1 contendo rhIL-2 6.000UI/mL, 15 µg de OKT-3 e 2,5 x 10^8 células alimentadoras. A semeadura de TIL para o início de Rep ocorreu em dias diferentes de acordo com cada processo. Para o Processo Gen 2, no qual o frasco G-REX 100MCS teve o volume reduzido para 90%, a suspensão celular coletada foi transferida para um novo G-REX 500MCS para começar o REP no dia 11 em meio CM2 contendo IL-2 (3000 UI/mL) mais 5 x 10^9 células alimentadoras e OKT-3 (30 ng/mL). As células foram expandidas e divididas no dia 16 para múltiplos frascos GREX 500 MCS com meio CM4 e IL-2 (3000 UI/mL) segundo o protocolo. A cultura foi então coletada e crioconservada no dia 22 segundo o protocolo. Para o processo Gen 3, o início de REP ocorreu no dia 7, em que o mesmo G-REX 100MCS foi usado para o início de REP. Resumidamente, 500 mL de meio CM2 contendo IL-2 (6000 UI/mL) e 5 x 10^8 células alimentadoras com 30 µg de OKT-3 foram adicionados a cada frasco. No dia 9-11, foi feito o escalonamento vertical da cultura. Todo o volume do G-Rex 100M (1L) foi transferido para um G-REX 500MCS e 4L de CM4 contendo IL-2 (3000 UI/mL) foram adicionados. Os frascos foram incubados 5 dias. As culturas foram coletadas e crioconservadas no Dia 16.

[001843] Três tumores diferentes foram incluídos na comparação, dois tumores de pulmão (L4054 e L4055) e um tumor melanoma (M1085T).

[001844] Os meios CM1 (meio de cultura 1), CM2 (meio de cultura 2) e CM4 (meio de cultura 4) foram preparados antes e mantidos a 4 ºC para L4054 e L4055. Os meios CM1 e CM2 foram preparados sem filtração para comparar o crescimento celular com e sem filtração do meio.

[001845] O meio foi aquecido a 37 ºC com até 24 horas de antecedência para o tumor L4055 no início de REP e escalonamento vertical.

Resumo dos resultados

[001846] Gen 3 ficou 30% abaixo de Gen 2 em relação às células viáveis totais conseguidas. O produto final de Gen 3 exibiu produção maior de INF-γ após a reestimulação. O produto final de Gen 3 exibiu diversidade clonal aumentada, conforme medida pelas sequências únicas totais de CDR3 presentes. O produto final de Gen 3 exibiu comprimento médio mais longo dos telômeros.

Resultados alcançados

Contagem de células e % de viabilidade:

[001847] Pré-REP e expansão REP nos processos Gen 2 e Gen 3 seguiram os detalhes descritos acima.

[001848] Tabela 37: Contagens de células Pré-REP. Para cada tumor, os dois *pools* continham número igual de fragmentos. Devido ao pequeno tamanho dos tumores, o número máximo de fragmentos por frasco não foi alcançado. As células pré-REP totais (TVC) foram coletadas e contadas no dia 11, para o processo Gen 2, e no dia 7 para o processo Gen 3. Para comparar os dois braços pré-REP, a contagem de células foi dividida pelo número de fragmentos fornecidos na cultura a fim de calcular uma média de células viáveis por fragmento. Como indicado na tabela abaixo, o processo Gen 2 cultivou consistentemente mais células por fragmento quando comparado ao processo Gen 3. Um cálculo extrapolado do número de TVC previsto para o processo Gen 3 no dia 11 foi usado, o qual foi calculado dividindo TVC pré-REP por 7 e então multiplicando por 11.

Tabela 37: Contagens de células pré-REP

ID do tumor	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Processo	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
TVC pré-REP	1,42E+08	4,32E+07	2,68E+07	1,38E+07	1,23E+07	3,50E+06
Número de fragmentos	21	21	24	24	16	16
TVC média por fragmento em pré-REP	6,65E+06	2,06E+06	1,12E+06	5,75E+05	7,66E+05	2,18E+05

Valor extrapolado para Gen 3 no dia 11 pré-REP	N/A	6,79E+07	N/A	2,17E+07	N/A	5,49E+06

* L4055, meio não filtrado.

[001849] Tabela 38: Contagem de células viáveis totais e vezes de expansão no produto final TIL: Para os processos Gen 2 e Gen 3, TVC foi contada por condição do processo, e o percentual de células viáveis foi gerado para cada dia do processo. Na coleta, dia 22 (Gen 2) e dia 16 (Gen 3), as células foram coletadas e a contagem de TVC foi estabelecida. TVC foi então dividido pelo número de fragmentos fornecidos no dia 0, para calcular uma média de células viáveis por fragmento. As vezes de expansão foram calculadas dividindo as TVC coletadas pela TVC no início de REP. Como exibido na tabela, comparando Gen 2 e Gen 3, o número de vezes de expansões foram semelhantes para L4054; no caso de L4055, o número de vezes de expansão foi maior para o processo Gen 2. Especificamente, nesse caso, o meio foi aquecido com até 24 de antecedência ao dia de início de REP. Um número maior de vezes de expansão foi também observado no Gen 3 para M1085T. Um cálculo extrapolado do número de TVC previsto para o processo Gen 3 no dia 22 foi usado, o qual foi calculado dividindo TVC pré-REP por 16 e então multiplicando por 22.

Tabela 38: Contagem de células viáveis totais e vezes de expansão no produto final TIL

ID do tumor	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Processo	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Nº de Fragmentos	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**
TVC /fragmento (na coleta)	3,18E+09	8,77E+08	2,30E+09	3,65E+08	7,09E+08	4,80E+08
Início de REP	1,42E+08	4,32E+07	2,68E+07	1,38E+07	1,23E+07	3,50E+06
Escalonamento vertical	3,36E+09	9,35E+08	3,49E+09	8,44E+08	1,99E+09	3,25E+08
Coleta	6,67E+10	1,84E+10	5,52E+10	8,76E+09	1,13E+10	7,68E+09
Vezes de expansão Coleta/ início de REP	**468,4**	**425,9**	**2056,8**	**634,6**	**925,0**	**2197,2**

Valor extrapolado para Gen 3 no dia 22 da coleta REP	**N/A**	**2,53E+10**	**N/A**	**1,20E+10**	**N/A**	**1,06E+10**

* L4055, meio não filtrado.

[001850] Tabela 39: % de viabilidade do produto final TIL: Na coleta, os produtos finais TIL de REP foram comparados contra critérios de liberação para % de viabilidade. Todas as condições para os processos Gen 2 e Gen 3 processos ultrapassaram o critério para viabilidade de 70% e foram comparáveis entre processos e tumores.

Tabela 39: % de viabilidade de REP

ID do tumor	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Processo	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Início de REP	98,23%	97,97%	97,43%	92,03%	81,85%	68,27%
Escalonamento vertical	94,00%	93,57%	90,50%	95,93%	78,55%	71,15%
Coleta	87,95%	89,85%	87,50%	86,70%	86,10%	87,45%

[001851] Tabela 40: Estimativa de contagem celular por frasco adicional para o processo Gen 3. Devido ao número de fragmentos por frasco ser abaixo do número máximo requerido, uma estimativa para contagem de células no dia da coleta foi calculada para cada tumor. A estimativa teve como base a expectativa de que os tumores clínicos fossem suficientemente grandes para semear 2 ou 3 frascos no dia 0.

Tabela 40: Estimativa extrapolada para cálculo de contagem de células para escala completa de 2 e 3 frascos no Processo Gen 3

ID do tumor	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Processo Gen 3	**2 frascos**	**3 Frascos**	**2 frascos**	**3 Frascos**	**2 frascos**	**3 Frascos**
Estimativa da coleta	3,68E+10	5,52E+10	1,75E+10	2,63E+10	1,54E+10	2,30E+10

Imunofenotipagem:

Comparação de marcadores fenotípicos no produto final TIL:

[001852] Três tumores L4054, L4055 e M1085T passaram por expansão de TIL em ambos os processos, Gen 2 e Gen 3. Quando da coleta, os produtos finais TIL REP TIL foram submetidos à análise por citometria de fluxo para testar pureza, marcadores de diferenciação e memória. Para todas as condições, a percentagem de células TCR a/b+ foi acima de 90%.

[001853] TIL coletados do processo Gen 3 mostraram uma expressão maior de CD8 e CD28 quando comparados aos TIL coletados do processo Gen 2. O processo Gen 2 mostrou uma percentagem maior de CD4+. Ver **Figura 3 (A, B, C)**.

Comparação de marcadores de memória marcadores no produto final TIL:

[001854] TIL coletados do processo Gen 3 mostraram maior expressão em compartimentos de memória central memória quando comparados aos TIL coletados do processo Gen 2. Ver **Figura 4 (A, B, C)**.

Comparação de marcadores de ativação e de exaustão no produto final TIL:

[001855] Marcadores de ativação e exaustão foram analisados em TIL de dois tumores L4054 e L4055 para comparar o produto final TIL pelos processos de expansão de TILs, Gen 2 e Gen 3. Os marcadores de ativação e de exaustão foram comparáveis entre os processos Gen 2 e Gen 3**.** Ver **Figura 5 (A, B); Figura 6 (A, B).**

Secreção de interferon gama quando da reestimulação:

[001856] No dia da coleta, dia 22 para Gen 2 e dia 16 para Gen 3, TIL foram submetidos à reestimulação durante a noite com placas revestidas com anti-CD3 para L4054 e L4055. A reestimulação no M1085T foi realizada usando *beads* de anti-CD3, CD28 e CD137. O sobrenadante foi coletado depois de 24 horas da reestimulação em todas as condições e o sobrenadante foi congelado. A análise de IFNγ por ELISA foi verificada no sobrenadante de ambos os processos ao mesmo tempo, usando a mesma placa ELISA. Foi observada produção maior de IFNγ no processo Gen 3 nos três tumores analisados. Ver **Figura 7 (A, B, C).**

Medição de níveis de IL-2 no meio de cultura:

[001857] Para comparar o consumo de IL-2 entre os processos Gen 2 e Gen 3, o sobrenadante celular foi coletado no início de REP, no escalonamento vertical e no dia da coleta, no tumor L4054 e L4055. A quantidade de IL-2 no sobrenadante da cultura celular foi medida pelo kit

Quantitate ELISA da R&D. A tendência geral indica que a concentração de IL-2 permanece maior no processo Gen 3 quando comparado ao processo Gen 2. Isso deve-se provavelmente à maior concentração de IL-2 no início de REP (6000 UI/mL) para Gen 3 acoplado com o *carryover* (quantidade residual) do meio por todo o processo. Ver **Figura 8 (A, B).**

Substrato metabólico e análise de metabólitos

[001858] Os níveis de substratos metabólicos, tais como D-glicose e L-glutamina, foram medidos como substitutos do consumo global do meio. Mediram-se seus respectivos metabólitos, tais como ácido láctico e amônia. Glicose é um açúcar simples no meio que é utilizado pela mitocôndria para produzir energia na forma de ATP. Quando a glicose é oxidada, ácido láctico é produzido (lactato é um éster do ácido láctico). Lactato é fortemente produzido durante a fase de crescimento celular exponencial. Níveis elevados de lactato têm um impacto negativo sobre processos de cultura celular. Ver **Figura 9 (A, B).**

[001859] O meio esgotado por L4054 e L4055 foi coletado nos dias de início de REP, escalonamento vertical e coleta para ambos os processos, Gen 2 e Gen 3. A coleta do meio esgotado foi no Dia 11, dia 16 e dia 22 para Gen 2; para Gen 3 foi no dia 7, dia 11 e dia 16. O sobrenadante foi analisado em um CEDEX Bio-analyzer para concentrações de glicose, ácido láctico, glutamina, glutamax e amônia.

[001860] L-glutamina é um aminoácido essencial instável necessário em formulações de meio de cultura celular. Glutamina contém uma amina, e esse grupo amida estrutural pode transportar e entregar nitrogênio para células. Quando L-glutamina é oxidada, um subproduto tóxico, amônia, é gerado pela célula. Para neutralizar a degradação de L-glutamina, o meio para os processos Gen 2 e Gen 3 foi suplementado com Glutamax, que é mais estável em soluções aquosas e não se degrada espontaneamente. Nas duas linhagens tumorais, o braço de Gen 3 mostrou uma diminuição na L-glutamina e

Glutamax durante o processo e um aumento na amônia por todo o REP. No braço de Gen 2, foi observada uma concentração constante de L-glutamina e Glutamax, e um leve aumento na produção de amônia. Os processos Gen 2 e Gen 3 foram comparáveis no dia da coleta para amônia e mostraram uma ligeira diferença em degradação de L-glutamina. Ver **Figura 10 (A, B, C).**

Repetições dos telômeros por Flow – FISH:

[001861] A tecnologia Flow-FISH foi usada para medir o comprimento médio da repetição dos telômeros em L4054 e L4055 no processo Gen 2 e Gen 3. A determinação de um comprimento relativa dos telômeros (RTL) foi calculada com o kit Telomere PNA kit/FITC para análise por citometria de fluxo pela DAKO. Gen 3 mostrou comprimento dos telômeros comparável ao de Gen 2.

Análise de CD3

[001862] Para determinar a diversidade clonal dos produtos celulares gerados em cada processo, o produto final TIL, coletado para L4054 e L4055, foi amostrado e analisado quanto à diversidade clonal através do sequenciamento da porção CDR3 dos receptores de células T.

[001863] Tabela 41: Comparação entre Gen 2 e Gen3 da percentagem de sequências únicas compartilhadas de CDR3 em L4054 no produto celular TIL coletado. 199 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 97,07% de 80% das melhores sequências únicas de CDR3 de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3.

Tabela 41: Comparação de sequências compartilhadas de uCDR3 entre os processos Gen 2 e Gen 3 em L4054.

Nº de uCDR3 (% de sobreposição)	**Todas uCDR3**		**80% principais das uCDR3**	
	Gen 2	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Gen 2-L4054	8915	4355 (**48,85%**)	205	199 (**97,07%**)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

[001864] Tabela 42: Comparação entre Gen 2 e Gen3 da percentagem de sequências únicas compartilhadas de CDR3 em L4055 no produto celular TIL coletado. 1833 sequências são compartilhadas entre o produto final de

Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 99,45% de 80% das melhores sequências únicas de CDR3 de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3.

Tabela 42: Comparação de sequências compartilhadas de uCDR3 entre os processos Gen 2 e Gen 3 em L4055.

Nº de uCDR3 (% de sobreposição)	**Todas uCDR3**		**80% principais das uCDR3**	
	Gen 2	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Gen 2-L4055	12996	6599 (**50,77%**)	1843	1833 (**99,45%**)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

[001865] Os meios CM1 e CM2 foram preparados antes sem filtração e mantidos a 4 ºC até o uso para o tumor L4055 no processo Gen 2 e Gen 3.

[001866] O meio foi aquecido até 37 ºC por 24 horas de antecedência para o tumor L4055 no dia de início de REP para o processo Gen 2 e Gen 3.

[001867] LDH não foi medido nos sobrenadantes coletados nos processos.

[001868] A contagem de células T em M1085T foi executada com o contador de células K2 cellometer.

[001869] No tumor M1085T, não houve amostras disponíveis, tal como sobrenadante para análise metabólica, produto TIL para análise de marcadores de ativação e de exaustão, comprimento dos telômeros e análise de CD3 - TCR vb.

Conclusões

[001870] Esse exemplo compara 3 tecidos tumorais de doadores independentes em termos de atributos de qualidade funcional, caracterização fenotípica mais ampliada e consumo do meio entre os processos Gen 2 e Gen 3.

[001871] A comparação de pré-REP e expansão REP entre Gen 2 e Gen foi avaliada em termos de células viáveis totais geradas e viabilidade da população de células nucleadas totais. As doses de células no dia da coleta não foram comparáveis entre Gen 2 (22 dias) e Gen 3 (16 dias). As doses de células do Gen 3 foram menores do que as de Gen 2 por volta de 40% das células viáveis totais recolhidas na coleta.

[001872] Um número extrapolado de células foi calculado para o processo Gen 3, pressupondo que a coleta pré-REP ocorreu no dia 11 em vez de no dia 7 e a Coleta do REP no Dia 22 em vez de no dia 16. Ambos os casos mostram número mais próximo em TVC, em comparação ao processo Gen 2, indicando que a ativação precoce permitiria um melhor desempenho global no crescimento de TIL. Linha inferior da Tabela 4 e 5.

[001873] No caso de valor extrapolado para frascos extra (2 ou 3) no processo Gen 3, supondo um tamanho maior de tumor processado, e atingindo o número de fragmentos requeridos segundo o processo como descrito. Foi observado que uma dose semelhante pode ser alcançável em TVC na Coleta do Dia 16 para o processo Gen 3 quando comparado ao processo Gen 2 no Dia 22. Essa observação é importante e indica que uma ativação precoce da cultura pode propiciar desempenho melhor dos TIL em menos tempo de processamento.

[001874] A comparação pré-REP e expansão REP, entre Gen 2 e Gen 3, foi avaliada em termos de células viáveis totais geradas e viabilidade da população celular nucleada total. células nucleadas totais. As doses de células no dia da coleta não foram comparáveis entre Gen 2 (22 dias) e Gen 3 (16 dias). As doses de células do Gen 3 foram menores do que as de Gen 2 por volta de 40% das células viáveis totais recolhidas na coleta.

[001875] Em termos de caracterização fenotípica, uma expressão maior de CD8+ e CD28+ foi observada em três tumores no processo Gen 3 quando comparado ao processo Gen 2. Esses dados indicam que o processo Gen 3 melhora mais os atributos do produto final TIL quando comparado ao Gen 2.

[001876] O processo Gen 3 revelou compartimentos de memória central ligeiramente maiores em comparação ao processo Gen 2.

[001877] O processo Gen 2 e Gen 3 mostraram marcadores de ativação e de exaustão comparáveis, apesar da duração mais curta do processo Gen 3.

[001878] A produção de IFN gama (IFNγ) foi 3 vezes maior no produto

final do Gen 3, em comparação ao Gen 2, nos três tumores analisados. Esses dados indicam que o processo Gen 3 gerou um produto final TIL altamente funcional e mais potente em comparação ao processo Gen 2, possivelmente devido à expressão maior de CD8 e CD28 no Gen 3. A caracterização fenotípica sugeriu tendências positivas no Gen 3 para expressão de CD8+, CD28+ em três tumores quando comparado ao processo Gen 2.

[001879] O comprimento dos telômeros no produto final TIL foi comparável entre Gen 2 e Gen 3.

[001880] Os níveis de Glicose e Lactato foram comparáveis entre os produtos finais de Gen 2 e Gen 3, sugerindo que os níveis de nutrientes no meio do processo Gen 3 não foram afetados pelo volume ter deixado de ser removido em cada dia do processo e menos volume global do meio no processo, quando comparado ao Gen 2.

[001881] O processo Gen 3 global mostrou uma redução de quase vezes no tempo do processo quando comparado ao Gen 2, o que resultariam em uma redução substancial no custo de mercadorias (COGs) para o produto TIL expandidos pelo processo Gen 3.

[001882] O consumo de IL-2 indica uma tendência geral do consumo de IL-2 no processo Gen 2 e, no processo Gen 3, IL-2 ficou mais alto devido à não remoção do meio antigo.

[001883] O processo Gen 3 revelou diversidade clonal mais alta, medida pela análise de sequência TCRab de CDR3.

[001884] A adição de alimentadoras e OKT-3 no dia 0 do pré-REP permitiu uma ativação precoce de TIL e melhor desempenho global no crescimento de TIL pelo processo Gen 3.

[001885] A Tabela 43 descreve várias modalidades e resultados para o processo Gen 3, em comparação ao processo Gen 2 atual.

Tabela 43: Processo Gen 3 exemplar

Etapa	Processo Gen 2	Processo Gen 3
Pré-REP - dia 0	≤50 fragmentos 1X G-Rex 100MCS 1L de meio IL-2 (6000 UI/mL) 11 dias	≤240 fragmentos ≤60 fragmentos/frasco ≤4 frascos ≤2L de meio (500 mL/frasco) IL-2 (6000 UI/mL) 2,5 x 10^8 células alimentadoras/frasco 15µg de OKT3/frasco
Início de REP	TIL fresco direto para REP Dia 11 ≤200 x 10^6 células viáveis 5 x 10^9 células alimentadoras G-Rex 500MCS 5L de meio CM2 + IL-2 (3000 UI/mL) 150 µg de OKT3	TIL fresco direto para REP Dia 7 Ativar a cultura toda 5 x 10^8 células alimentadoras 30 µg de OKT3/frasco G-Rex 100MCS 500 mL de meio+ IL-2 (6000 UI/mL)
Subcultura de TIL ou escalonamento vertical	≤5 G-REX 500MCS ≤1 x 10 células viáveis/ frasco 5L/frasco Dia 16	≤4 G-REX 500MCS Escalonamento vertical da cultura toda 4L/frasco Dia 10-11
Coleta	Coleta Dia 22, Lavadora automática de células LOVO 2 ciclos de lavagem	Coleta Dia 16 Lavadora automática de células LOVO 5 ciclos de lavagem
Formulação final	Produto crioconservado IL-2 300 UI/mL - CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto crioconservado IL-2 300 UI/mL - CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas
Duração do processo	**22 dias**	**16 dias**

[001886] Os exemplos apresentados acima são oferecidos para fornecer aos técnicos no assunto uma exposição e descrição completa de como preparar e usar as modalidades das composições, sistemas e métodos da invenção, e não se destinam a limitar o âmbito daquilo que os inventores consideram como a sua invenção. Modificações aos modos descritos acima para executar a invenção que sejam óbvias para os técnicos no assunto destinam-se a ser abrangidas pelo âmbito das reivindicações a seguir. Todas as patentes e as publicações mencionadas no relatório descritivo são indicativas dos níveis de capacidade dos técnicos no assunto ao qual a invenção diz respeito. Todas as referências citadas nessa exposição são aqui incorporadas por referência na mesma medida que o seriam caso cada referência tivesse sido incorporada, em sua totalidade, por referência individualmente.

[001887] TILs foram expandidos com êxito a partir de biópsias por agulha grossa isoladas de tumores pancreáticos. Os TILs foram também expandidos a partir do FNA de certos tipos de tumor. No estudo, não foi observado crescimento de TIL a partir de tumores ovarianos (n=3) e um tumor colorretal (n=1). O crescimento de TIL foi observado a partir do FNA obtido de tumor pulmonar, melanoma e tumor cervical. A fenotipagem e ensaios funcionais da população de TILs da primeira expansão e da segunda expansão estão atualmente em curso. Os dados do estudo revelam que uma população significativa de células CD4+ e CD8+ T estão presentes no aspirado pré-REP.

[001888] Todos os títulos e designações de seções são usados para fins de clareza e referência somente e não deverão ser considerados limitativos de maneira alguma. Por exemplo, os técnicos no assunto apreciarão a utilidade de combinar vários aspectos de diferentes títulos e seções, conforme adequado, de acordo com o espírito e âmbito da invenção aqui descrita.

[001889] Todas as referências aqui citadas são ora incorporadas, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente e para todos os efeitos na mesma medida em que seriam caso cada publicação ou patente ou pedido de patente individual tivesse sido específica e individualmente indicado para ser incorporado, em sua totalidade, por referência e para todos os efeitos.

[001890] Muitas modificações e variações deste pedido de patente podem ser efetuadas sem que se afastem de seu espírito e âmbito, como será óbvio para os técnicos no assunto. As modalidades específicas e exemplos aqui descritos são oferecidos a título de exemplo somente, e o pedido de patente deverá ser limitado apenas pelos termos das reivindicações anexadas, juntamente com o pleno alcance de equivalentes aos quais as reivindicações fazem jus.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) obter uma primeira população de TILs a partir de pelo menos um aspirado por agulha fina (FNA) ou pelo menos uma pequena biópsia de um tumor em um paciente;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 10 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5×10^7 TILs entre aproximadamente 3 dias e 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia; e

(iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma segunda expansão rápida.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado

pelo fato de que, depois da etapa (iii), as células são removidas da cultura celular e crioconservadas em um meio de armazenamento antes de realizar a etapa (iv).

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as células são descongeladas antes de realizar a etapa (iv).

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a etapa (iv) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 17 dias e 24 dias.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 18 dias e 22 dias.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 20 dias e 22 dias.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as etapas (i) a (iii) ou (iv) são realizadas dentro de aproximadamente 22 dias.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as células das etapas (iii) ou (iv) expressam CD4, CD8 e TCR α β em níveis semelhantes aos de células recentemente colhidas.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado

pelo fato de que as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (ii) e/ou qualquer um dos dias 11 ao 14 na etapa (iii).

13. Método de acordo com a reivindicação 2 a 12, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou as células T de memória central na população terapêutica de TILs na etapa (iv) exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou as células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-

15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente em que o paciente se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

23. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

24. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

26. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

27. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficiente para uma dose terapeuticamente

eficaz é entre aproximadamente $2,3\times10^{10}$ e $13,7\times10^{10}$.

29. Método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) realizar uma primeira expansão cultivando uma primeira população de TILs a partir de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia de um tumor em um paciente em um meio de cultura celular, compreendendo IL-2, para obter uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5×10^7 TILs entre aproximadamente 3 dias e 12 dias, quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia; e

(ii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) para obter uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

31. Método de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que as células do meio de cultura celular na etapa

(ii) são removidas e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da etapa (iii).

32. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que as células são descongeladas antes da etapa (iii).

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizado pelo fato de que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

35. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão na etapa (i) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

36. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

37. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão adicional na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da terceira população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

38. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

39. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

40. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado

pelo fato de que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

41. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente, em que o paciente se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

42. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

43. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

44. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

45. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

46. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a etapa (ii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

47. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3\times10^{10}$ e $13,7\times10^{10}$.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 47, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou as células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de

CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

50. Método para o tratamento de um indivíduo com câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos e de que compreende:

(i) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia obtida de um tumor em um paciente;

(ii) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5×10^7 TILs entre aproximadamente 3 dias e 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia;

(iii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(iv) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira

população de TILs ao paciente.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

52. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que, depois da etapa (ii), as células são removidas do meio de cultura celular e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da etapa (iv).

53. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que as células são descongeladas antes da etapa (iv).

54. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

55. Método de acordo com a reivindicação 50 a 54, caracterizado pelo fato de que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

56. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão na etapa (ii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

57. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

58. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

59. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

60. Método de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente. em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

61. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

62. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

63. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

64. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

65. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a etapa (iii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2{,}3\times10^{10}$ e $13{,}7\times10^{10}$.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 66, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou as células T de memória central exibem uma ou mais

características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57, e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

68. Método de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou as células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 68, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado dentre o grupo que consiste em melanoma, câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer de pâncreas, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de não pequenas células.

70. Método para tratamento de um indivíduo com câncer, caracterizado pelo fato de que compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos e de que compreende:

(i) realizar uma primeira expansão cultivando uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia de um tumor em um paciente em um meio de cultura celular compreendendo IL-2 para obter uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5×10^7 TILs entre aproximadamente 3 dias e 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia;

(ii) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs) para obter uma terceira população

de TILs, em que a terceira população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a segunda população de TILs, e em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(iii) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs ao paciente.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

72. Método de acordo com a reivindicação 70 ou 71, caracterizado pelo fato de que as células do meio de cultura celular na etapa (ii) são removidas e crioconservadas em um meio de armazenamento antes da etapa (iii).

73. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que as células são descongeladas antes da etapa (iii).

74. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 70 a 73, caracterizado pelo fato de que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

75. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 70 a 74, caracterizado pelo fato de que as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

76. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 75, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

77. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão na etapa (i) é realizada suplementando

ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

78. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão na etapa (iii) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

79. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o FNA na etapa (i) compreende pelo menos 400.000 TILs.

80. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

81. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

82. Método de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo fato de que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

83. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

84. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

85. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

86. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

87. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado

pelo fato de que a etapa (ii) é repetida de uma a quatro vezes a fim de obter TILs suficientes na população terapêutica de TILs para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

88. Método de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2,3\times10^{10}$ e $13,7\times10^{10}$.

89. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 70 a 88, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou as células T de memória central exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27, expressão de CD28, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56, em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central na terceira população de células.

90. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou as células T de memória central exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56.

91. Método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia obtida de um tumor em um paciente;

(b) adicionar a primeira população a um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira

expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter thae segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5×10^7 TILs entre aproximadamente 3 dias e 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a primeira população de TILs, e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem a abertura do sistema;

(d) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado, fornecendo uma segunda área de superfície permeável a gás, e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem a abertura do sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem a abertura do sistema; e

(f) transferir a população de TILs colhida na etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem a abertura do sistema.

92. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação

da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

93. Método de acordo com a reivindicação 91 ou 92, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de crioconservação da bolsa de infusão compreendendo a população de TILs colhida na etapa (f) utilizando um processo de crioconservação.

94. Método de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o processo de crioconservação é realizado usando uma relação 1:1 de população de TILs colhida/meio CS10.

95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 94, caracterizado pelo fato de que as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

96. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 95, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

97. Método de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (c) e/ou qualquer um dos dias 3 ao 12 na etapa (d).

98. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 95, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno são células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

99. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 98, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

100. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão na etapa (c) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

101. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão na etapa (d) é realizada suplementando

ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

102. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o FNA na etapa (a) compreende pelo menos 400.000 TILs.

103. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

104. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

105. Método de acordo com a reivindicação 104, caracterizado pelo fato de que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

106. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (a) são obtidos de um FNA.

107. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

108. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (a) são obtidos de uma pequena biópsia.

109. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

110. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a colheita na etapa (e) é realizada utilizando um sistema LOVO para o processamento das células.

111. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular é fornecido em um recipiente

selecionado dentre o grupo que consiste em um recipiente-G e uma bolsa Xuri Cellbag.

112. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a bolsa de infusão na etapa (f) é uma bolsa de infusão Hypothermosol.

113. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 17 dias a 24 dias.

114. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 18 dias a 22 dias.

115. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) a (f) são realizadas dentro de um período de aproximadamente 20 dias a 22 dias.

116. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) a (f) são realizadas em 22 dias ou menos.

117. Método de acordo com a reivindicação 91, em que as etapas (a) a (f) e a crioconservação são realizadas em 22 dias ou menos.

118. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 117, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs colhida na etapa (e) compreende TILs suficientes para uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs.

119. Método de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficiente para uma dose terapeuticamente eficaz é entre aproximadamente $2{,}3\times10^{10}$ e $13{,}7\times10^{10}$.

120. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 119, caracterizado pelo fato de que as etapas (b) a (e) são realizadas em um único recipiente, em que a realização das etapas (b) a (e) em um único recipiente resulta em um aumento no rendimento de TILs por tumor ressecado

em comparação a realizar as etapas (b) a (e) em mais de um recipiente.

121. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 120, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno são adicionadas aos TILs durante o segundo período na etapa (d) sem a reabertura do sistema.

122. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 121, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou as células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27+, expressão de CD28+, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras, e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

123. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 122, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou as células T de memória central obtidas da terceira população de TILs exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

124. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 123, caracterizado pelo fato de que o risco de contaminação microbiana é reduzido em comparação a um sistema aberto.

125. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 124, caracterizado pelo fato de que os TILs da etapa (g) são infundidos em um paciente.

126. Método para o tratamento de um indivíduo com câncer, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar linfócitos

infiltrantes de tumor (TILs) expandidos e de que compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA) ou uma pequena biópsia de um tumor ressecado de um indivíduo;

(b) adicionar a primeira população a um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, para produzir uma segunda população de TILs, em que o meio de cultura celular é suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias a fim de obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs compreende pelo menos 5×10^7 TILs entre aproximadamente 3 dias e 12 dias quando a primeira população de TILs for de uma pequena biópsia, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por aproximadamente 3-14 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número pelo menos 25 vezes maior do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem a abertura do sistema;

(d) realizar uma segunda expansão, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por aproximadamente 3 dias a 12 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado fornecendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem a abertura do sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (d),

em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem a abertura do sistema; e

(f) transferir a população de TILs colhida na etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem a abertura do sistema;

(g) opcionalmente crioconservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TILs colhida na etapa (f) utilizando um processo de crioconservação; e

(h) administrar uma dose terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs desde a bolsa de infusão na etapa (g) ao paciente.

127. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs colhida na etapa (e) compreende TILs suficientes para administrar uma dose terapeuticamente eficaz dos TILs na etapa (h).

128. Método de acordo com a reivindicação 126 ou 127, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura celular compreendendo IL-2 na etapa (ii) compreende ainda OKT-3 e não é opcionalmente suplementado com OKT-3 em qualquer um dos dias 1-3, e em que a etapa (i) é uma etapa de preparação da primeira expansão e a etapa (ii) é uma etapa de segunda expansão rápida.

129. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 128, caracterizado pelo fato de que as APCs são APCs artificiais (aAPCs) ou são APCs autólogas.

130. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 129, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

131. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão na etapa (c) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com

OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

132. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão na etapa (d) é realizada suplementando ainda mais o meio de cultura celular da segunda população de TILs com OKT-3, IL-15, anticorpo agonista de OX40 e/ou anticorpo agonista de 4-1BB.

133. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que o FNA na etapa (a) compreende pelo menos 400.000 TILs.

134. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pancreático, melanoma, mamário e ovariano.

135. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em pulmonar, melanoma, da cabeça e pescoço, cervical, ovariano, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma.

136. Método de acordo com a reivindicação 135, caracterizado pelo fato de que o tumor de pulmão é um carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e, opcionalmente, em que o indivíduo se submeteu anteriormente ao tratamento cirúrgico.

137. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de um FNA.

138. Método de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que o FNA é obtido utilizando uma agulha de calibre 25-18.

139. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que os TILs na etapa (i) são obtidos de uma pequena biópsia.

140. Método de acordo com a reivindicação 139, caracterizado pelo fato de que a pequena biópsia é obtida utilizando uma agulha de calibre 16-11.

141. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficientes para administrar uma dose

terapeuticamente eficaz na etapa (h) é entre aproximadamente $2,3\times10^{10}$ e $13,7\times10^{10}$.

142. Método de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno (APCs) são PBMCs.

143. Método de acordo com a reivindicação 142, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são adicionadas à cultura celular em qualquer um dos dias 3 a 12 na etapa (c) e/ou qualquer um dos dias 3 a 12 na etapa (d).

144. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 143, caracterizado pelo fato de que, antes de administrar uma dose terapeuticamente eficaz de células TIL na etapa (h), um esquema de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao paciente.

145. Método de acordo com a reivindicação 144, caracterizado pelo fato de que o esquema de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias, seguida pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

146. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 145, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de tratar o paciente com um esquema de dose alta de IL-2, iniciando no dia seguinte à administração das células TIL ao paciente na etapa (h).

147. Método de acordo com a reivindicação 146, caracterizado pelo fato de que o esquema de dose alta de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 UI/kg, administrado por infusão intravenosa em bolus durante 15 minutos a cada oito horas até tolerância.

148. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 147, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica

de TILs exibem uma ou mais características selecionadas dentre o grupo que consiste em expressão de CD27+, expressão de CD28+, telômeros mais longos, aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

149. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 148, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou as células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem aumento da expressão de CD57 e diminuição da expressão de CD56 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas da segunda população de células.

150. Método para a expansão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs de um aspirado por agulha fina (FNA), uma pequena biópsia, uma biópsia por agulha grossa ou uma pequena biópsia de um tumor em um paciente;

(b) realizar uma primeira expansão de preparação, cultivando a primeira população de TILs em um meio de cultura celular compreendendo IL-2, OKT-3 e células apresentadoras de antígeno (APCs), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de preparação é realizada por um primeiro período de aproximadamente 1 a 14 dias em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs tem um número maior do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida, suplementando o meio de cultura celular da segunda população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e APCs, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de

aproximadamente 1 a 14 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(d) colher a população terapêutica de TILs da etapa (c).

151. Método de acordo com a reivindicação 150, caracterizado pelo fato de que o primeiro período é de aproximadamente 6 a 12 dias.

152. Método de acordo com a reivindicação 150 ou reivindicação 151, caracterizado pelo fato de que o segundo período é de aproximadamente 6 a 12 dias.

153. Método de acordo com a reivindicação 150, caracterizado pelo fato de que o primeiro período é selecionado dentre o grupo que consiste em 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias ou 12 dias.

154. Método de acordo com a reivindicação 150 ou reivindicação 151, caracterizado pelo fato de que o segundo período é selecionado dentre o grupo que consiste em 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias ou 12 dias.

155. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 150 a 154, caracterizado pelo fato de que as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

156. Método de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que a relação entre APCs usadas na etapa (b) e as APCs usadas na etapa (c) é aproximadamente 1,1:1; 1,2:1; 1,3:1; 1,4:1; 1,5:1; 1,6:1; 1,7:1; 1,8:1; 1,9:1; 2:1; 2,1:1; 2,2:1; 2,3:1; 2,4:1; 2,5:1; 2,6:1; 2,7:1; 2,8:1; 2,9:1; 3:1; 3,1:1; 3,2:1; 3,3:1; 3,4:1; 3,5:1; 3,6:1; 3,7:1; 3,8:1; 3,9:1; 4:1; 4,1:1; 4,2:1; 4,3:1; 4,4:1; 4,5:1; 4,6:1; 4,7:1; 4,8:1; 4,9:1; 5:1 ou, de preferência, aproximadamente 1 a 2.

157. Método de acordo com a reivindicação 156, caracterizado pelo fato de que a primeira população de TILs é obtida de uma biópsia por agulha grossa.

158. Método de acordo com a reivindicação 157, caracterizado

pelo fato de que a biópsia por agulha grossa é obtida de um tumor selecionado dentre o grupo que consiste em um tumor melanoma, um tumor de câncer de ovário, um tumor de câncer cervical, um tumor de câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), um tumor de câncer de pulmão, um tumor de câncer de bexiga, um tumor de câncer de mama, um tumor de um câncer causado pelo papilomavírus humano, um tumor de câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP)), um tumor glioblastoma, um tumor de câncer gastrointestinal e um tumor de câncer renal.

159. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende TILs expandidos utilizando os métodos como definidos em qualquer uma das reivindicações 150 a 158.

160. Composição de acordo com a reivindicação 159, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um crioconservante.

161. Composição de acordo com a reivindicação 160, caracterizada pelo fato de que o crioconservante compreende dimetilsulfóxido.

162. Composição de acordo com a reivindicação 159, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um crioconservante e um agente isotônico.

163. Composição de acordo com a reivindicação 162, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um crioconservante compreendendo dimetilsulfóxido e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio.

164. Composição de acordo com a reivindicação 162 caracterizada pelo fato de que compreende ainda um crioconservante compreendendo dimetilsulfóxido e dextrano 40 e um agente isotônico compreendendo cloreto de sódio, gluconato de sódio e acetato de sódio.

165. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 159 a 164, caracterizada pelo fato de que a composição é fornecida em uma bolsa de infusão estéril.

Figura 1

Processo 2A: aproximadamente 22 dias das Etapas A – E

1. ETAPA A

Obter amostra do tumor do paciente

2. ETAPA B

Fragmentação e primeira expansão

3 dias a 14 dias

3. ETAPA C

Transição da primeira expansão para segunda expansão

4. ETAPA D

Segunda expansão

IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno

Sistema fechado

5. ETAPA E

Coleta de TILS da Etapa D

Sistema fechado

6. ETAPA F

Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão

(opcionalmente crioconservação)

Figura 2A

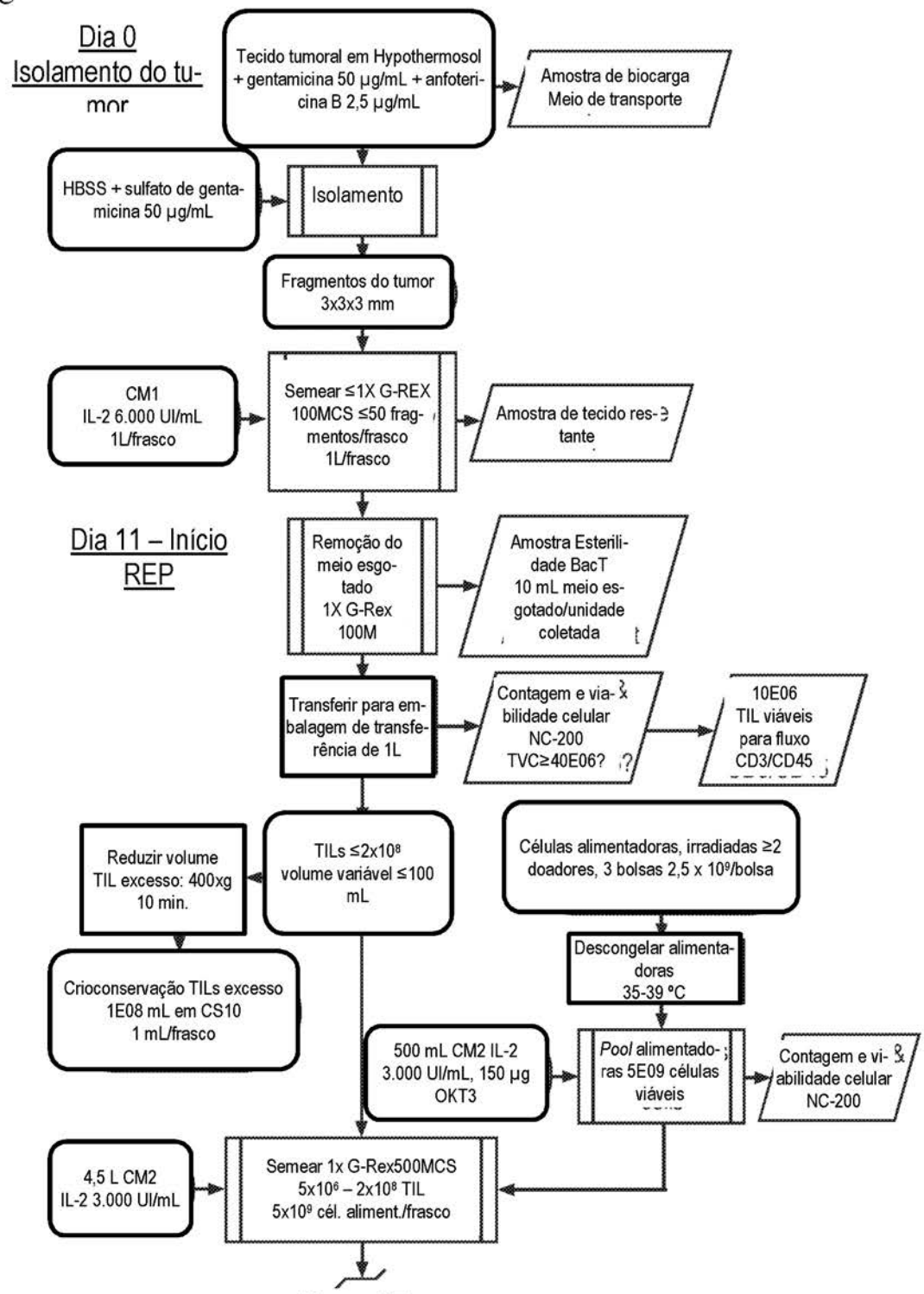


Figura 2B

Figura 2B

Figura 2A

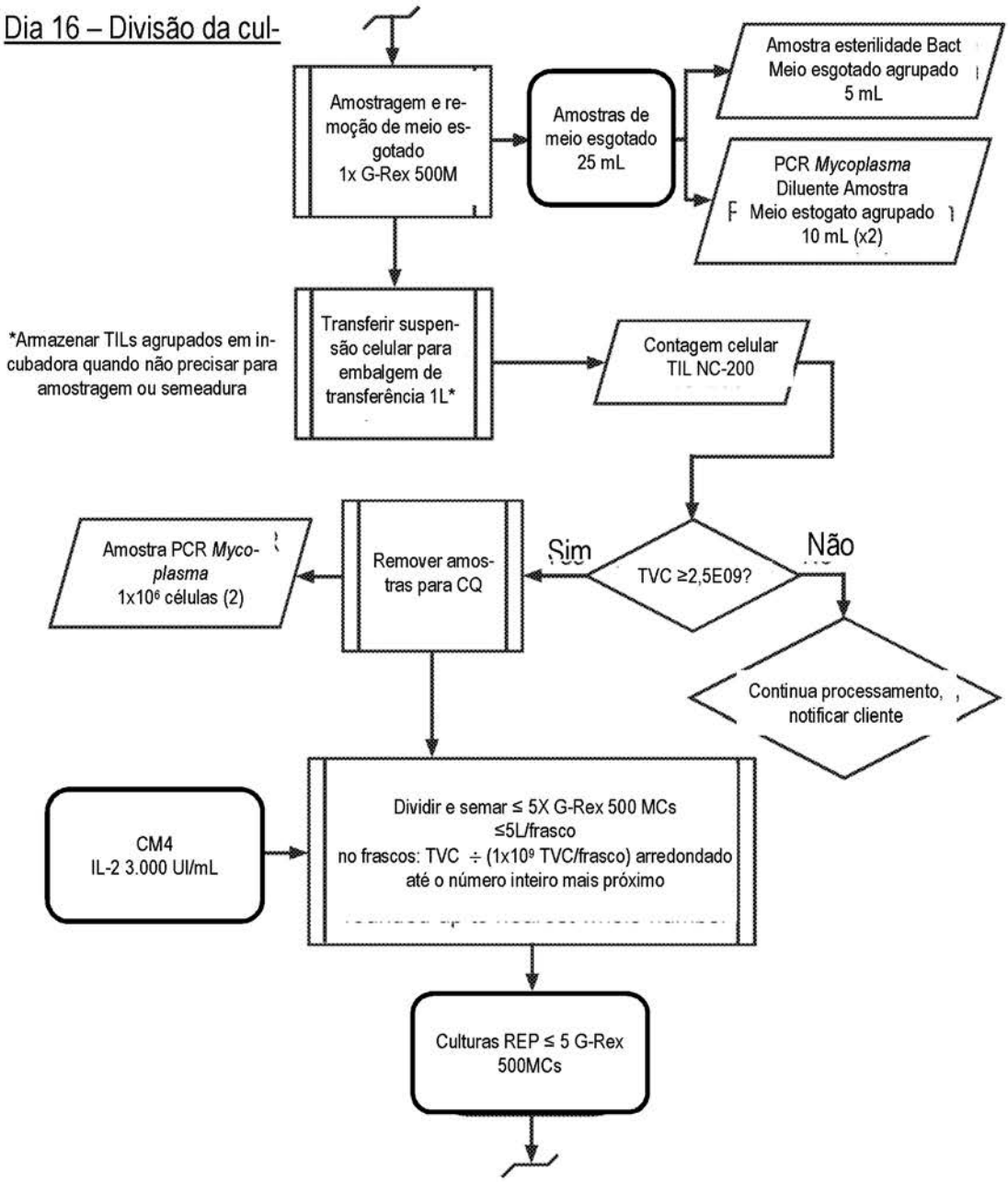


Figura 2C

Figura 2C

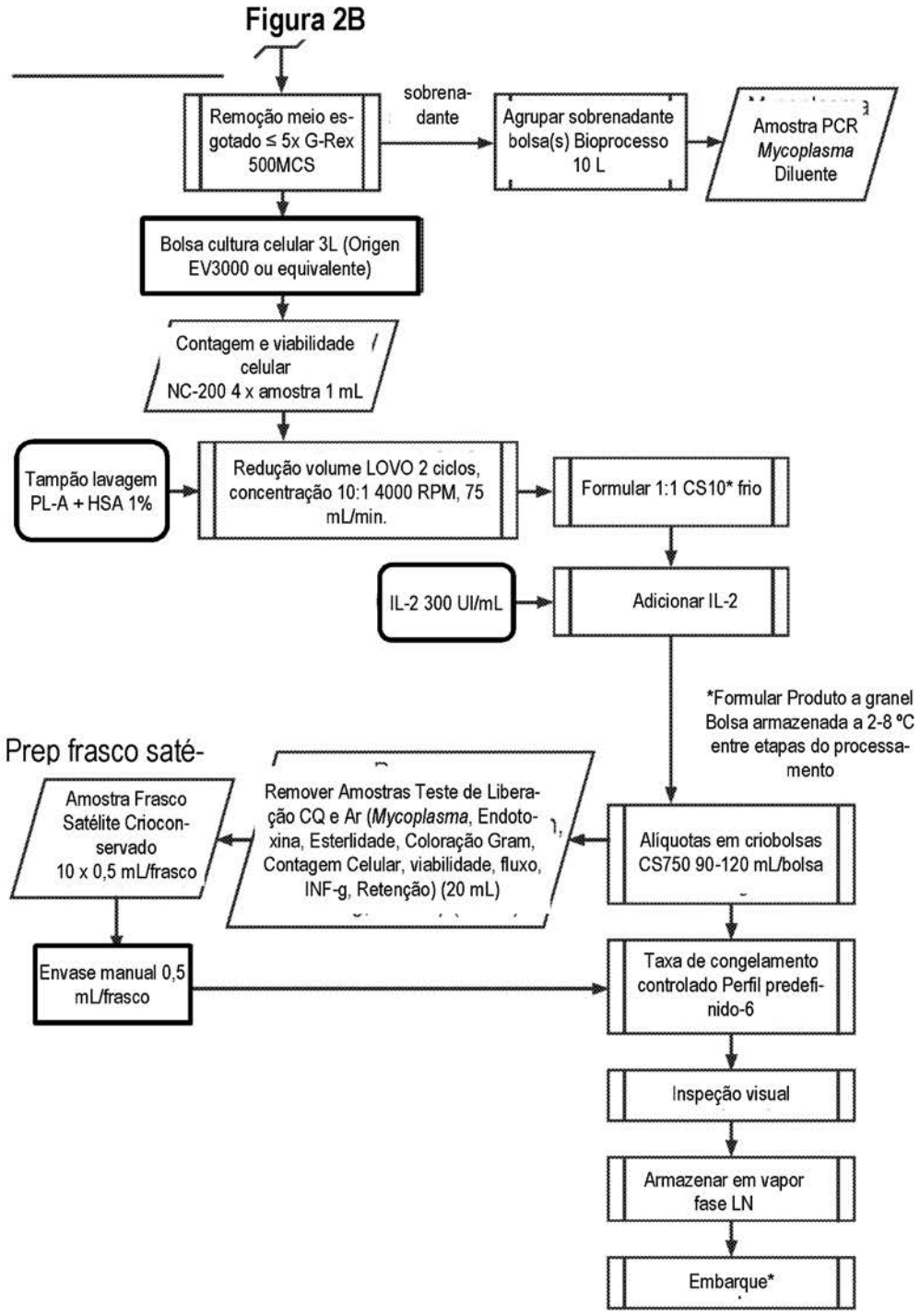


Figura 2B
Remoção meio esgotado ≤ 5x G-Rex 500MCS
sobrenadante
Agrupar sobrenadante bolsa(s) Bioprocesso 10 L
Amostra PCR *Mycoplasma* Diluente
Bolsa cultura celular 3L (Origen EV3000 ou equivalente)
Contagem e viabilidade celular NC-200 4 x amostra 1 mL
Tampão lavagem PL-A + HSA 1%
Redução volume LOVO 2 ciclos, concentração 10:1 4000 RPM, 75 mL/min.
Formular 1:1 CS10* frio
IL-2 300 UI/mL
Adicionar IL-2
*Formular Produto a granel Bolsa armazenada a 2-8 °C entre etapas do processamento
Prep frasco saté-
Amostra Frasco Satélite Criopreservado 10 x 0,5 mL/frasco
Remover Amostras Teste de Liberação CQ e Ar (*Mycoplasma*, Endotoxina, Esterlidade, Coloração Gram, Contagem Celular, viabilidade, fluxo, INF-g, Retenção) (20 mL)
Alíquotas em criobolsas CS750 90-120 mL/bolsa
Envase manual 0,5 mL/frasco
Taxa de congelamento controlado Perfil predefinido-6
Inspeção visual
Armazenar em vapor fase LN
Embarque*

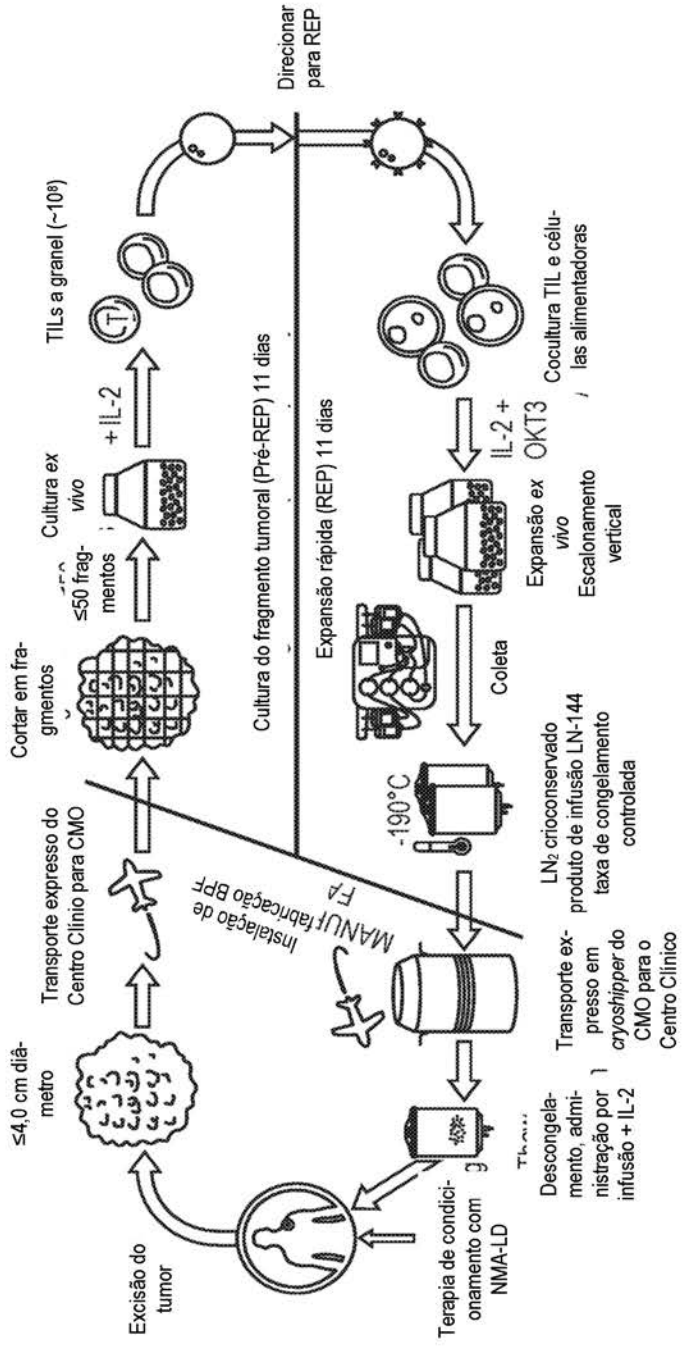

≤4,0 cm diâmetro
Excisão do tumor
Transporte expresso do Centro Clínio para CMO
Instalação de fabricação BPF
MANUFACTURE
FA
Cortar em fragmentos
≤50 fragmentos
Cultura ex vivo
+ IL-2
TILs a granel (~10⁸)
Direcionar para REP
Cultura do fragmento tumoral (Pré-REP) 11 dias
Expansão rápida (REP) 11 dias
Terapia de condicionamento com NMA-LD
Descongelamento, administração por infusão + IL-2
Transporte expresso em cryoshipper do CMO para o Centro Clínico
-190°C
LN2 crioconservado produto de infusão LN-144 taxa de congelamento controlada
Coleta
Expansão ex vivo Escalonamento vertical
IL-2 + OKT3
Cocultura TIL e células alimentadoras

Figura 3

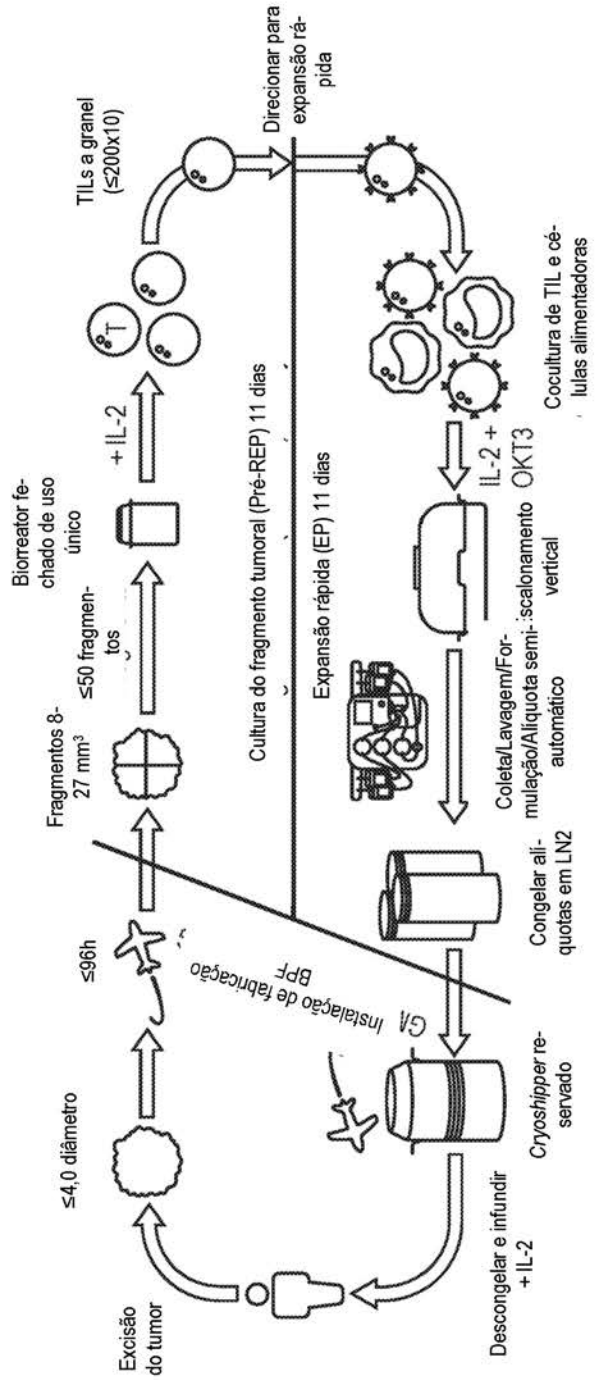

Excisão do tumor
≤4,0 diâmetro
≤96h
Instalação de fabricação BPF
GA
Fragmentos 8-27 mm³
≤50 fragmentos
Biorreator fechado de uso único
+ IL-2
TILs a granel (≤200x10)
Direcionar para expansão rápida
Cultura do fragmento tumoral (Pré-REP) 11 dias
Expansão rápida (EP) 11 dias
Cocultura de TIL e células alimentadoras
IL-2 + OKT3
Coleta/Lavagem/Formulação/Aliquota semi-automático
escalonamento vertical
Congelar alíquotas em LN2
Cryoshipper reservado
Descongelar e infundir + IL-2

Figura 4

Figura 5

Processo 1C: 43-55 dias para Etapas A – E	Processo 2A: aprox. 22 dias das Etapas A - E
1. ETAPA A Obter amostra de tumor do paciente	**1. ETAPA A** Obter amostra de tumor do paciente
2. ETAPA B Fragmentação e primeira expansão 11 dias a 21 dias	**2. ETAPA B** Fragmentação e primeira expansão 3 dias a 1Q dias
3. ETAPA C Transição da primeira expansão para segunda expansão Armazenamento opcional até seleção	**3. ETAPA C** Transição da primeira expansão para segunda expansão Sem armazenamento e sistema fechado
4. ETAPA D Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno Repetir opcionalmente uma ou mais vezes	**4. ETAPA D** Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno Sistema fechado
5. ETAPA E Coleta de TILs da Etapa D	**5. ETAPA E** Coleta de TILs da Etapa D Sistema fechado
6. ETAPA F Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão	**6. ETAPA F** Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente, crioconservação)

Figura 6

Etapa do processo	Modalidade Processo 1C	Modalidade Processo 2A	Vantagens
Pré-REP	• 4 fragmentos por 10 frascos GREX-10 • 11-21 dias de duração	• 40 fragmentos por 10 frascos GREX-100M • 11 dias de duração	• Mais fragmentos por frasco • Tempo de cultura encurtado • Número reduzido de etapas • Passível de sistema fechado
Transição de Pré-REP a REP	• TIL Pré-REP são congelados até que fenotipados para seleção, então, congelados para prosseguir para REP (~dia 30) • REP requer >40 x 10^6 TIL	• TIL Pré-REP transferido diretamente para REP no dia 11 • REP requer 25-200 x 10^6 TIL	• Processo pré-REP para REP encurtado • Número reduzido de etapas • Eliminada seleção por fenotipagem • Passível de sistema fechado
REP	• 6 frascos GREX-100M no dia 0 de REP • 5x10^6 TIL e 5 x 10^8 PBMC alimentadoras por frasco no dia 0 REP • Dividir em 18-36 frascos no dia 7 REP • 14 dias de duração	• 1 frasco GREX-500M no dia 11 • 25-200x10^6 TIL e 5 x 10^9 PBMC alimentadoras no dia 11 • Dividir em ≤6 frascps GREX-500M no dia 16 • 11 dias de duração	• Número reduzido de etapas • Duração mais curta de REP • Transferência de TIL entre frascos em sistema fechado • Trocas de meios em sistema fechado
Coleta	• TIL coletados através de centrifugação	• TIL coletados através de sistema de lavagem celular automático LOVO	• Número reduzido de etapas • Lavagem automática das células • Sistema fechado • Perda reduzida de produto durante a lavagem
Formulação final	• Produto fresco em Hypothermosol • Bolsa de infusão única • Estabilidade limitada no transporte	• Produto crioconservado em PlasmaLyte-A + HSA 1% e CS10 armazenado em LN_2 • Múltiplas alíquotas • Estabilidade mais longa no transporte	• Flexibilidade no transporte • Programação flexível para o paciente • Testes de liberação mais oportunos
Tempo global estimado para o processo	• 43-55 dias	• 22 dias	• Tempo de entrega mais rápido para o paciente

Figura7A

Processo de pequena biópsia: Versão 1 **Aproximadamente 21-33 dias das Etapas A - E**
1. ETAPA A Obter amostra do tumor do paciente
2. ETAPA B Primeira expansão 1 dia a 19 dias (com OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno no dia 3)
3. ETAPA C Transição da primeira expansão para segunda expansão Sem armazenamento e sistema fechado
4. ETAPA D Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno 11 a 14 dias Sistema fechado
5. ETAPA E Coleta de TILS da Etapa D Sistema fechado
6. ETAPA F Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)

Figura 7B

Processo de pequena biópsia: Versão 2 **Aproximadamente 17-24 dias das Etapas A - E**
1. ETAPA A Obter amostra do tumor do paciente
2. ETAPA B Primeira expansão 3 dia a 12 dias (com OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno no dia 3)
3. ETAPA C Transição da primeira expansão para segunda expansão Sem armazenamento e sistema fechado
4. ETAPA D Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno 3 a 12 dias Sistema fechado
5. ETAPA E Coleta de TILS da Etapa D Sistema fechado
6. ETAPA F Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)

Figura 7C

Processo de pequena biópsia: Versão 1 **Aproximadamente 21-33 dias das Etapas A - E**	**Processo de pequena biópsia: Versão 2** **(Processo baseado em Gen3)** **Aproximadamente 17-24 dias das Etapas A – E**	**Processo 2A: aproximadamente 22 dias das Etapas A – E**
1. ETAPA A Obter amostra do tumor do paciente	**1. ETAPA A** Obter amostra do tumor do paciente	**1. ETAPA A** Obter amostra do tumor do paciente
2. ETAPA B Primeira expansão 1 dia a 19 dias (com OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno no dia 3)	**2. ETAPA B** Primeira expansão 3 dia a 12 dias (com OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno no dia 3)	**2. ETAPA B** Fragmentação e primeira expansão 3 dias a 14 dias
3. ETAPA C Transição da primeira expansão para segunda expansão Sem armazenamento e opcionalmente sistema fechado	**3. ETAPA C** Transição da primeira expansão para segunda expansão Sem armazenamento e opcionalmente sistema fechado	**3. ETAPA C** Transição da primeira expansão para segunda expansão
4. ETAPA D Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno 11 a 14 dias opcionalmente sistema fechado	**4. ETAPA D** Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno 3 a 12 dias opcionalmente sistema fechado	**4. ETAPA D** Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno Sistema fechado
5. ETAPA E Coleta de TILS da Etapa D opcionalmente sistema fechado	**5. ETAPA E** Coleta de TILS da Etapa D Sistema fechado	**5. ETAPA E** Coleta de TILS da Etapa D Sistema fechado
6. ETAPA F Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)	**6. ETAPA F** Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)	**6. ETAPA F** Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)

Figuras 8A e 8B

Figura 8A

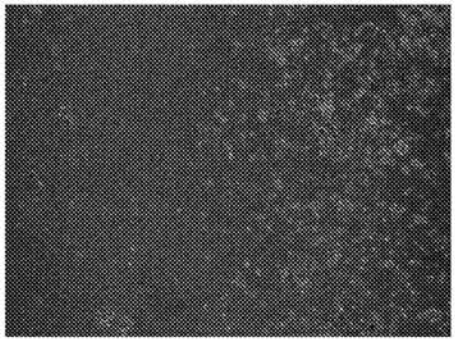
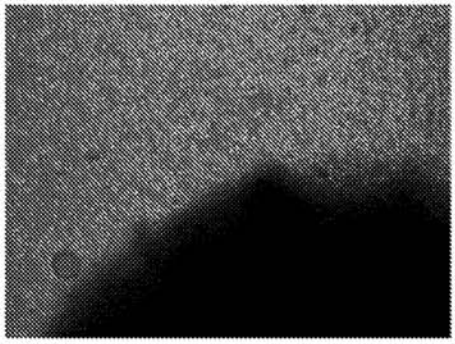


Figura 8B



Figuras 9A e 9B

Figura 9A

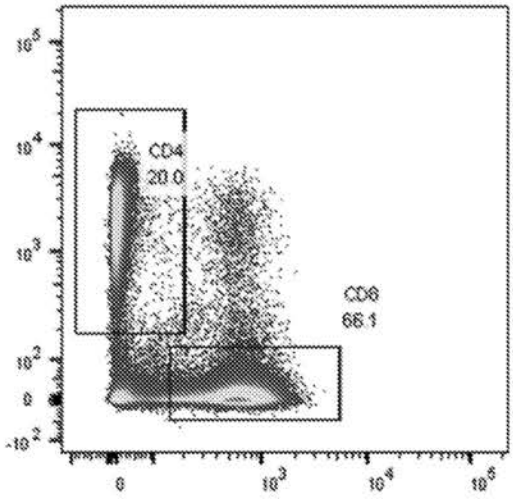
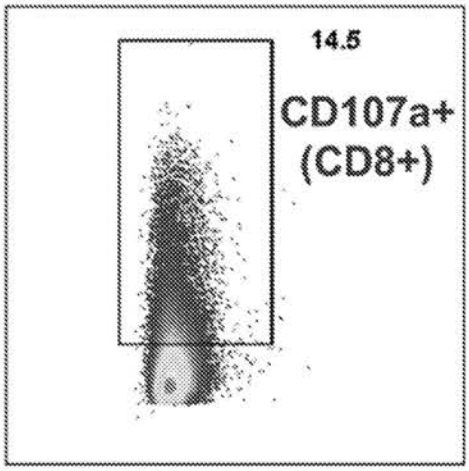


Figura 9B



Figuras 9C e 9D

Figura 9C

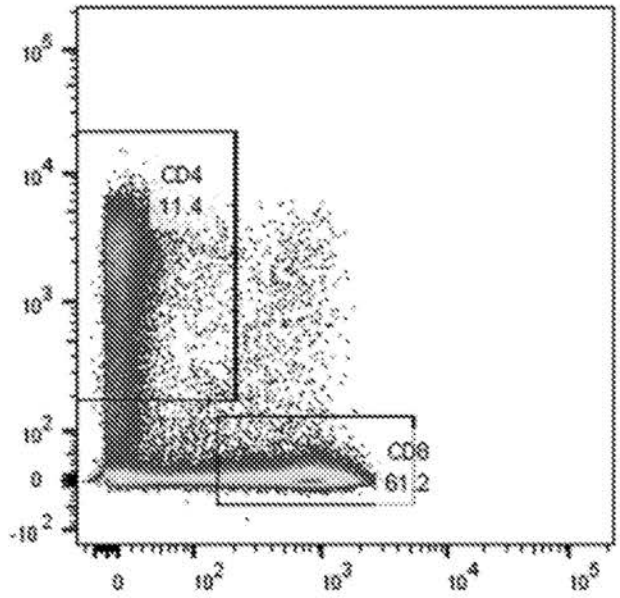
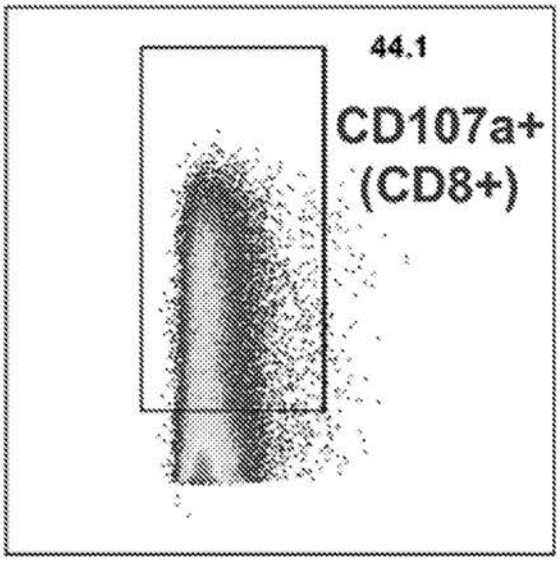


Figura 9D



Figuras 10A e 10B

Figura 10A

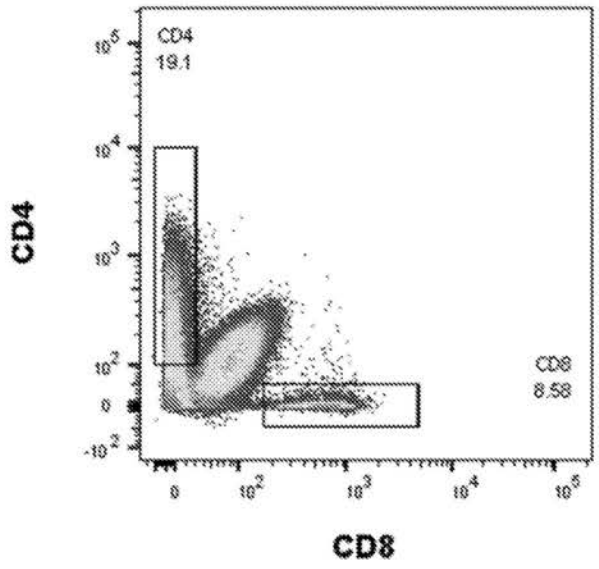
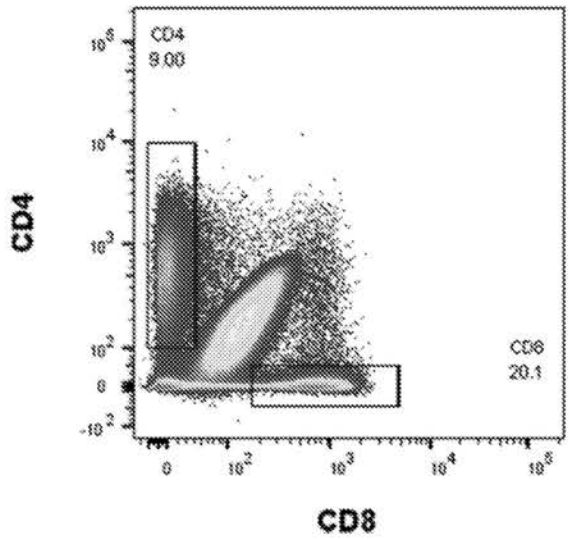


Figura 10B



Figuras 11A e 11B

Figura 11A

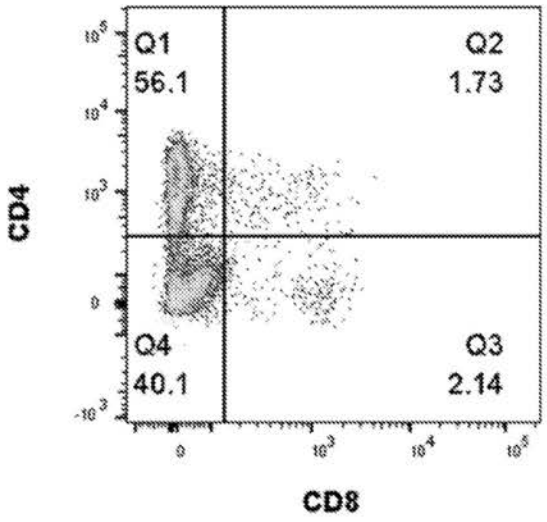


Figura 11B

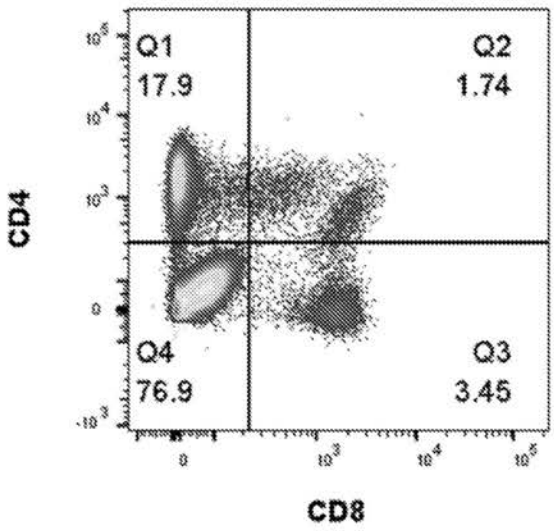
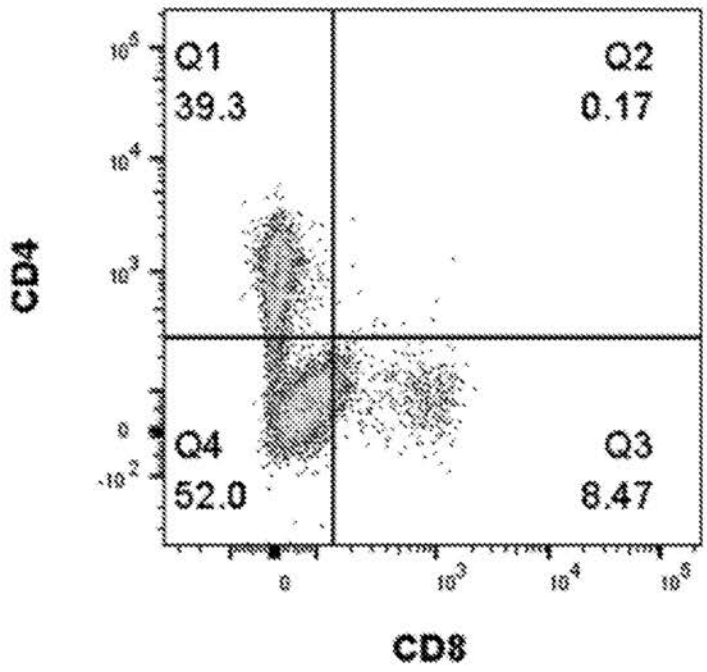


Figura 11C



Figuras 12A e 12B

Figura 12A

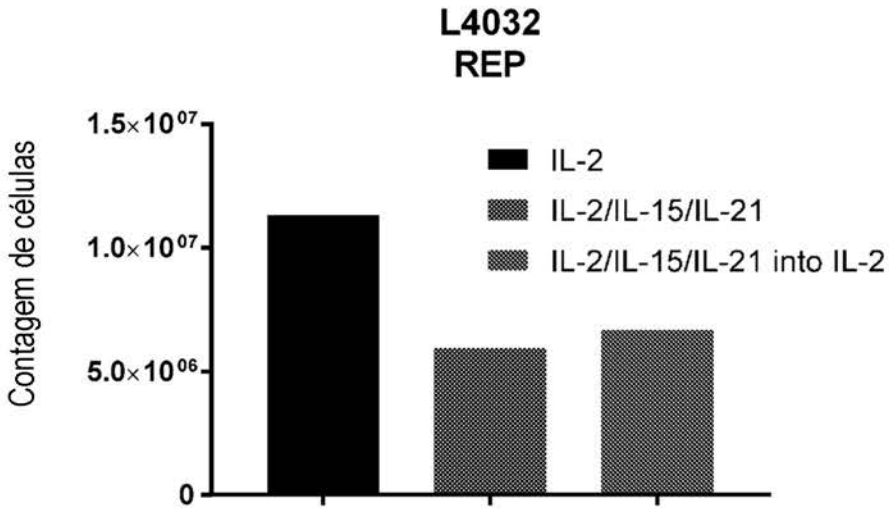
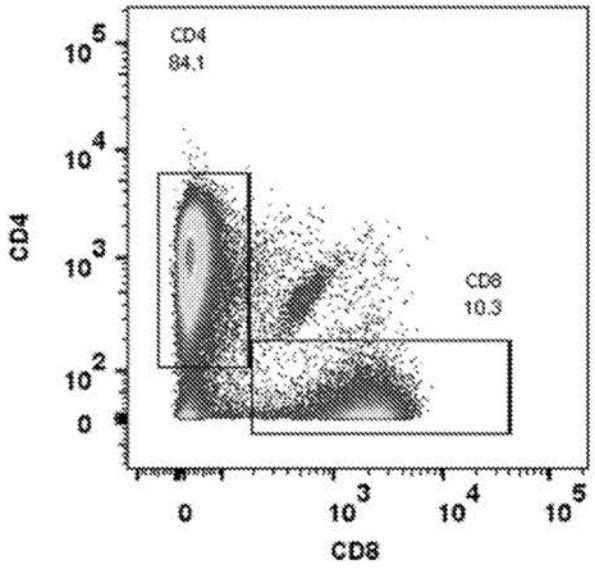


Figura 12B



Figuras 13A e 13B

Figura 13A

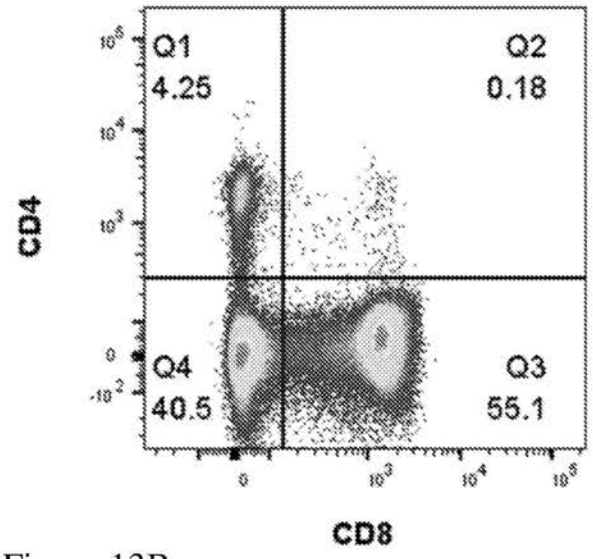


Figura 13B

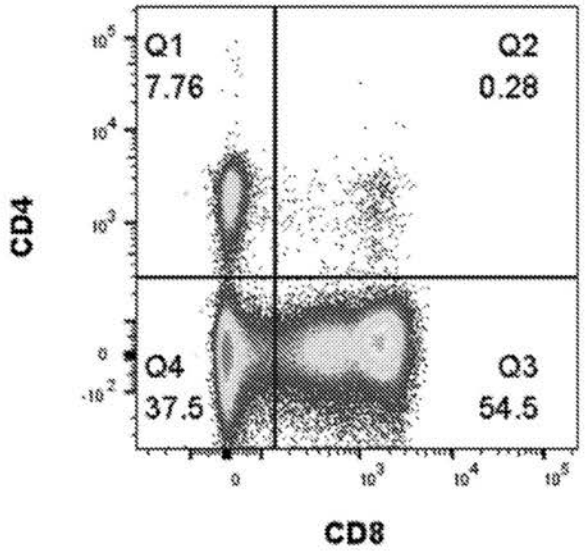


Figura 14

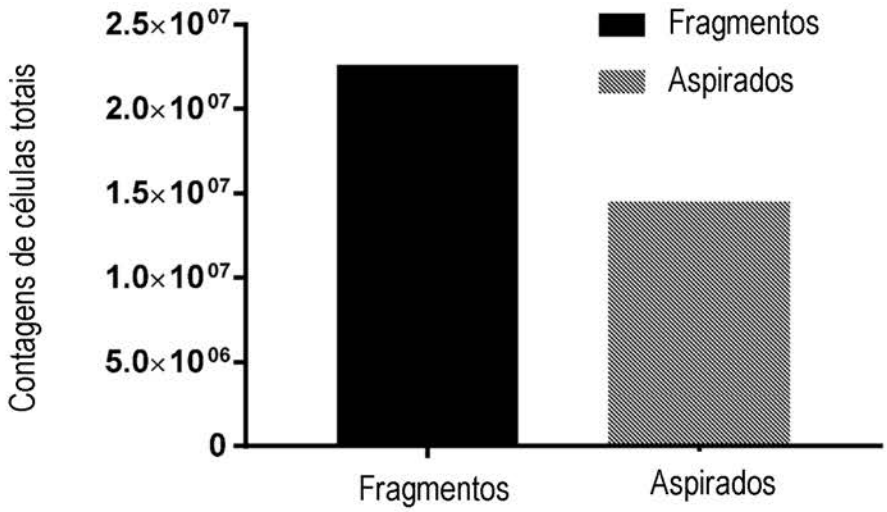
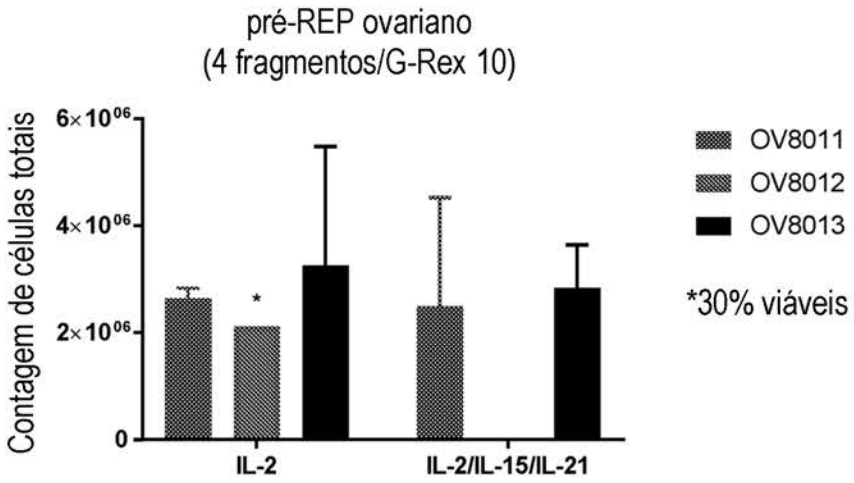

Contagens de células totais
2.5×10^07
2.0×10^07
1.5×10^07
1.0×10^07
5.0×10^06
0
Fragmentos
Aspirados
Fragmentos
Aspirados

Figura 15


pré-REP ovariano
(4 fragmentos/G-Rex 10)
Contagem de células totais
6×10^06
4×10^06
2×10^06
0
*
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
OV8011
OV8012
OV8013
*30% viáveis

Figuras 16A e 16B

Figura 16A

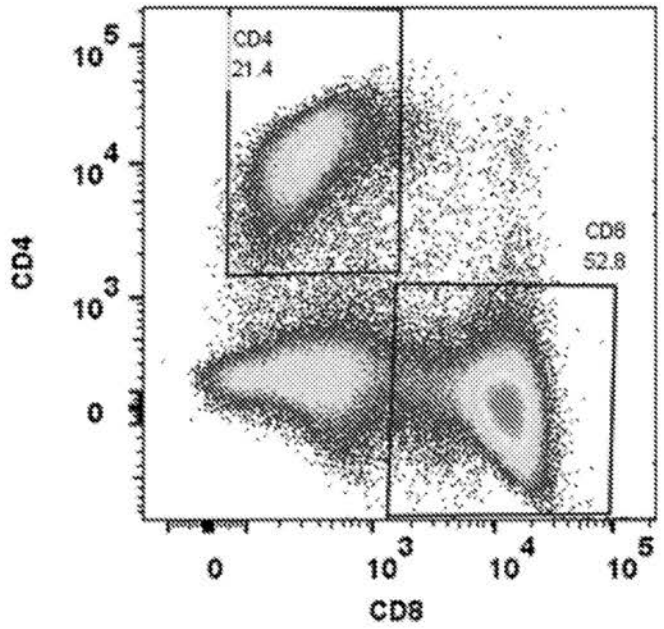
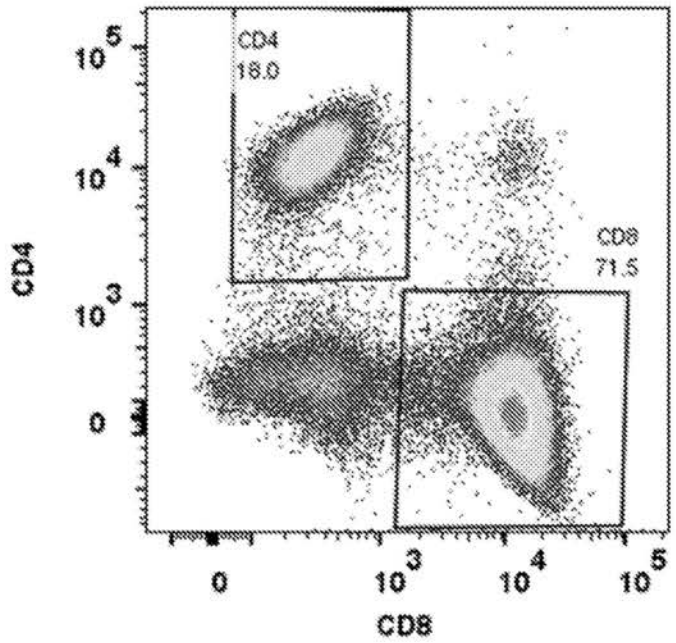


Figura 16B



Figuras 17A e 17B

Figura 17A

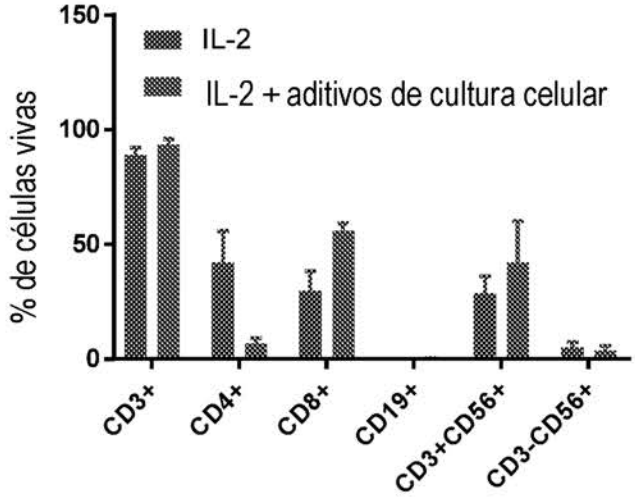
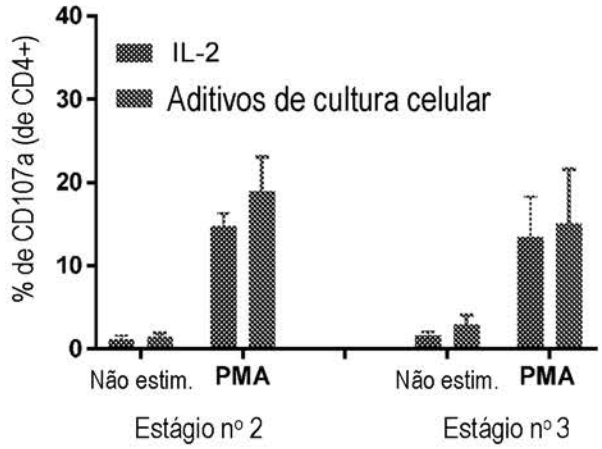


Figura 17B



Figuras 17C e 17D

Figura 17C

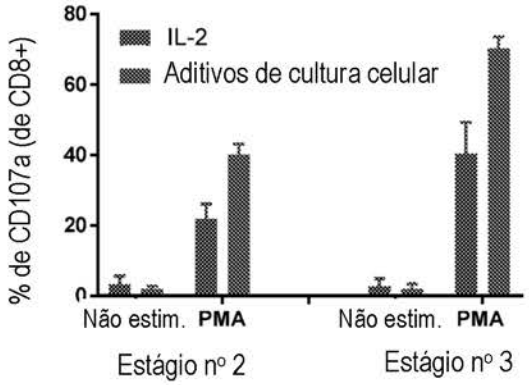


Figura 17D

ID tumor	Citocinas	Dias para atingir Estágio no 1	Critérios de aceitação para Estágio no 2	Células analisadas para Estágio no 2	Critérios de aceitação para Estágio no 3	Células analisadas para Estágio no 3
Pan-17-004	IL-2 #1	27	$20x10^6$	$116x10^6$	$100x10^6$	falha de mídia
	IL-2 #2	27		$130x10^6$		falha de mídia
	aditivos da cultura de celulas #1	14		falha de mídia		N/A
	aditivos da cultura de celulas #2	32		$102x10^6$		$148x10^6$
Pan-17-007	IL2	19		não cumpriu com os critérios para progredir para REP		N/A
	aditivos da cultura de celulas	25		$118x10^6$		$244x10^6$
Pan-17-009	IL2	não cumpriu com os critérios para G-Rex 10		N/A		N/A
	aditivos da cultura de celulas	21		$106x10^6$		$144x10^6$

Figura 18A

Histologia	FNA/biópsia	Contagem inicial de células (FNA)	Condições	Dias em cultura	Contagem final de células	Ensaios
Pancreática (P7015)	Amostra Placa de 24 cavidades	N/A	**Uma amostra** 1) IL-2 (3 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (2 cav.) **Duas amostras** 1) IL-2 (1 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (1 cav.)	28 dias	**Uma amostra** IL-2 1,2e6 células viáveis/cav. média IL-2/IL-15-IL-21 2e6 células viáveis/cav. média **Duas amostras** Sem crescimento	**Fenotípico** FACS **Funcional** CD107a
Pancreática (P7017)	Amostras Placa de 24 cavidades	N/A	**Uma amostra**	N/A	Sem crescimento de TIL	
Pancreática (P7017)	Amostras G-Rex 10	N/A	**6 amostras**	Em curso		
Pulmão (L4032)	FNA Placa de 24 cavidades	1,6e6 células (28% viáveis)	1) IL-2 (2 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (2 cav.) + fragmentos	13 dias	IL-2 4,6e5 células/cav. média, 76% viáveis IL-2/IL-15-IL-21 7,75e5 células/cav. média, 94% viáveis	**Fenotípico** FACS **Funcional** CD107a (N/A) **REP** (recentemente coletado)
Pulmão (L4033)	**FNA G-Rex10**	5,5e6 células (76% viáveis)	1) IL-2 (2 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (2 cav.) + fragmentos	12 dias	IL-2 6,6e5, 73% viáveis IL-2/IL-15-IL-21 Nenhuma célula detectável (nenhum ensaio foi feito nesta amostra)	**Fenotípico** FACS **Funcional** CD107a (N/A) **REP** (recentemente coletado)
Pulmão (L4034)	**FNA G-Rex 10**	N/A			Sem crescimento de TIL	Nenhum ensaio

Figura 18B

Histologia	FNA/biópsia	Contagem inicial de células (FNA)	Condições	Dias em cultura	Contagem final de células	Ensaios
Colorretal (CC10024)	Amostra Placa de 24 cavidades	8,0e5 células viáveis, 42% viáveis	1) IL-2 (2 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (2 cav.) Fragmentos como controle	27 dias	Sem crescimento de TIL	
Ovariano (OV8012)	FNA Placa de 24 cavidades	3,19e5 células viáveis, 28% viáveis	1) IL-2 (2 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (2 cav.)		Sem crescimento de TIL	Nenhum ensaio
Ovariano (OV8013)	FNA Placa de 24 cavidades	8,3e5 células, 11% viáveis	1) IL-2 (2 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (2 cav.)		Sem crescimento de TIL	Nenhum ensaio
Ovariano (OV8014)	FNA Placa de 24 cavidades	1,0e5 células, 7% viáveis	1) IL-2 (1 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (1 cav.)		Sem crescimento de TIL	Nenhum ensaio
Cervical (C2005)	FNA Placa de 24 cavidades	6,8e5 células, (13% viáveis)	1) IL-2 (2 cav.) 2) IL-2/IL-15/IL-21 (2 cav.) + fragmentos	21 dias	IL-2 3,45e5 células viáveis/cav. média, 39% viáveis IL-2/IL-15-IL-21 8,69e5 células viáveis/cav. média, 40% viáveis	**Fenotípico** FACS **Funcional** CD107a (N/A)
Melanoma (M1101)	FNA G-Rex 10	1,96e6, (65% viáveis)	IL-2 (1 G-Rex 10) + fragmentos	12 dias	IL-2 3,0e6, 78% viáveis	**Fenotípico** FACS **Funcional** CD107a (N/A) **REP** (recentemente coletado)
Melanoma (M1107)	FNA G-Rex 10	2,25e6, (69% viáveis)	IL-2 (2 G-Rex 10) IL-2/IL-15/IL-21 (2 G-Rex) + fragmentos			Pré-REP em curso

Figuras 19A e 19B

Figura 19A

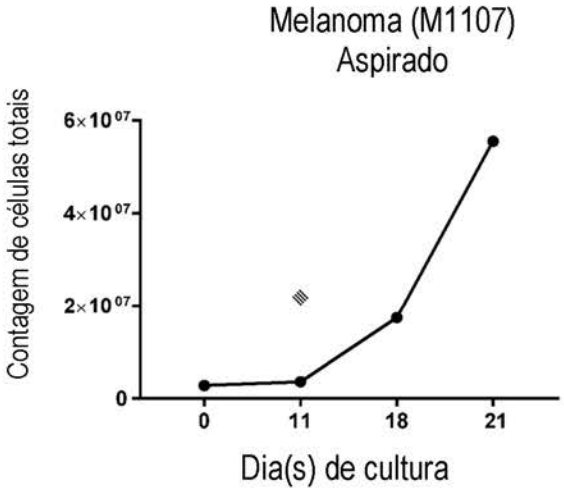


Figura 19B

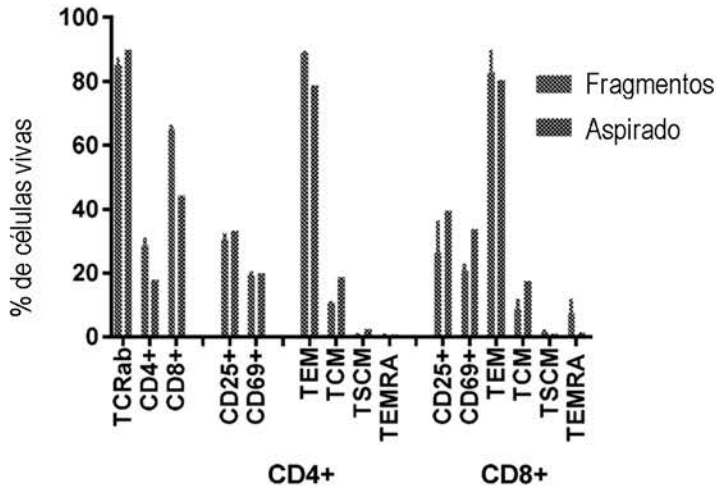


Figura 19C

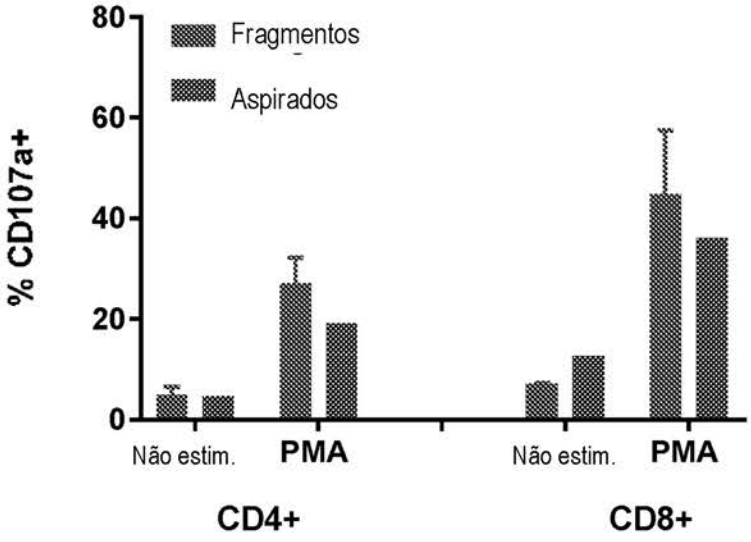

80
60
40
20
0
% CD107a+
Fragmentos
Aspirados
Não estim.
PMA
Não estim.
PMA
CD4+
CD8+

Figura 20

Nome do tumor	Crescimento de células	Análise
UPMC-3 Relatado	Placa de 24 cavidade: 1) IL-2 versus 2) Citocina, Aditivos	Crescimento celular, viabilidade, fenotipagem, CD107a
UPMC-9 Relatado	Pouca expansão	N/A
UPMC-17 Relatado	Cultura contaminada	N/A
UPMC-26	Pouca expansão	N/A
UPMC-30	Pré-REP Dia 11: 1,6e6, 40% viáveis Pré-REP Dia 18: 3,49e7, 89% viáveis	Crescimento celular, viabilidade, fenotipagem, CD107a, IFNγ, início de REP e análise
UPMC-61	Pré-REP Dia 11: 1,52e5, 66% viáveis Pré-REP Dia 18: 1,14e7, 1,14e7, 40% viáveis	Crescimento celular, viabilidade, fenotipagem, CD107a, IFNγ, início de REP e análise
UPMC-59	Pouca expansão	N/A
UPMC-61	Pré-REP: em curso	

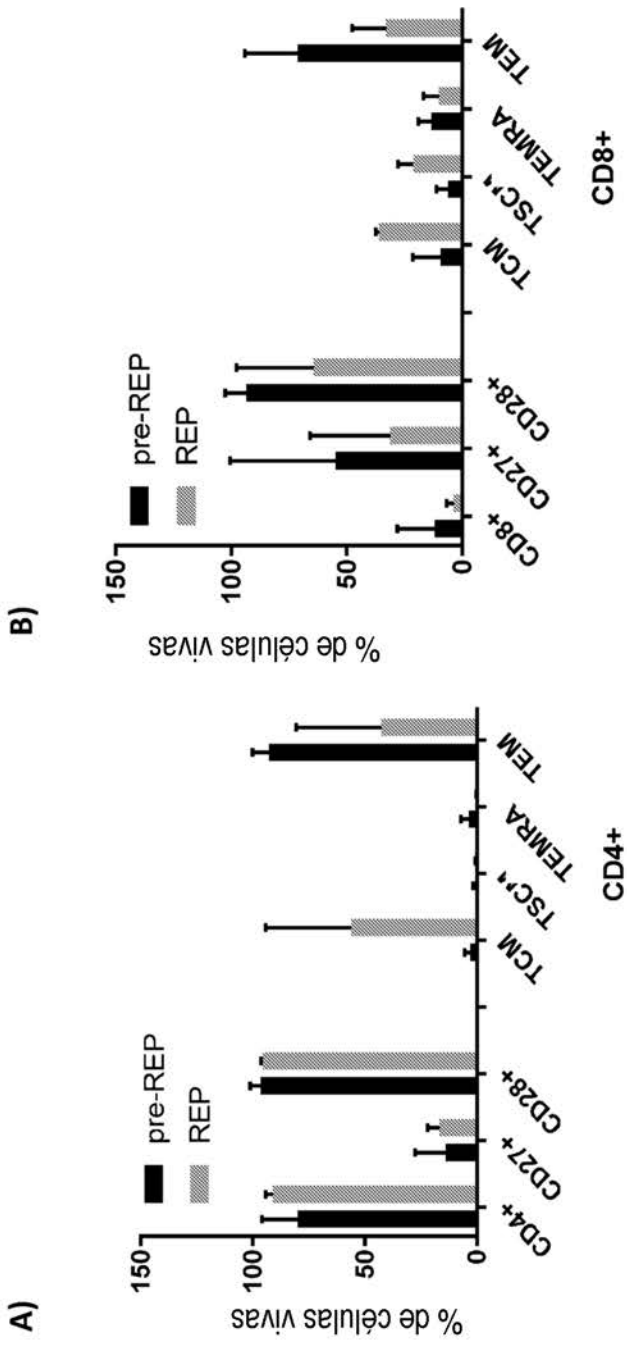

A)
% de células vivas
150
100
50
0
pre-REP
REP
CD4+
CD27+
CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
B)
% de células vivas
150
100
50
0
pre-REP
REP
CD8+
CD27+
CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM

Figura 21

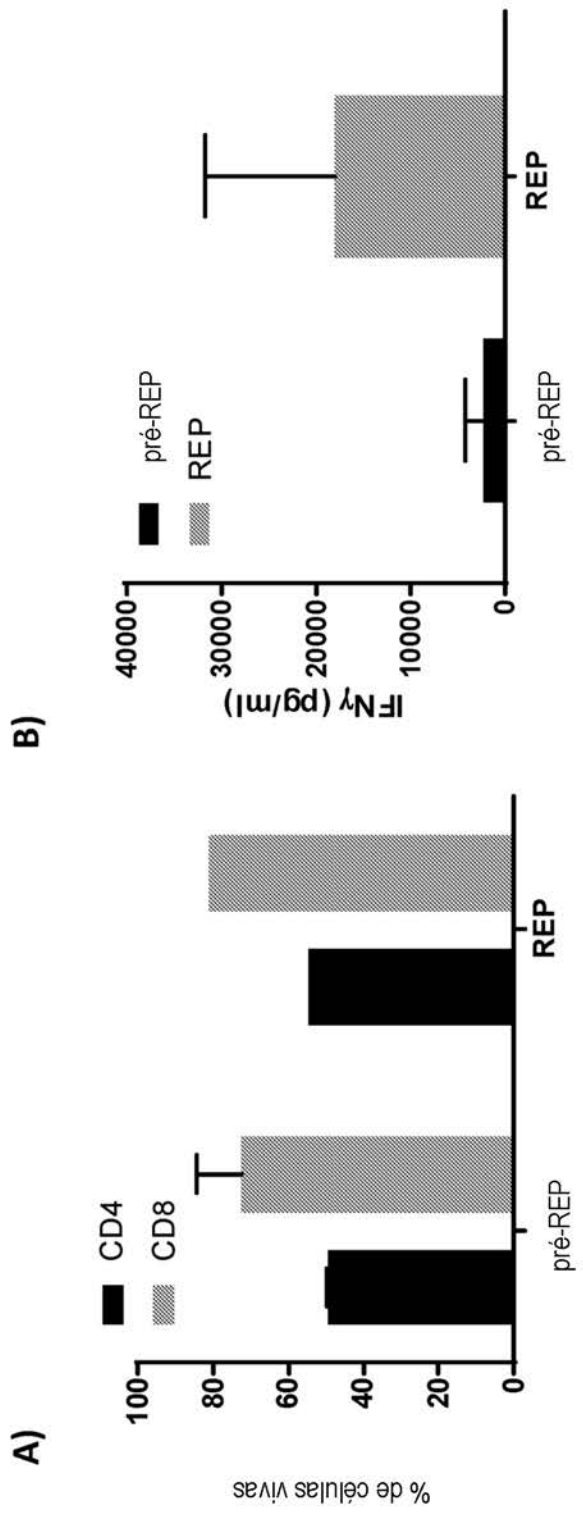

A)
% de células vivas
100
80
60
40
20
0
CD4
CD8
pré-REP
REP
B)
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
pré-REP
REP
pré-REP
REP

Figura 22

Figura 23

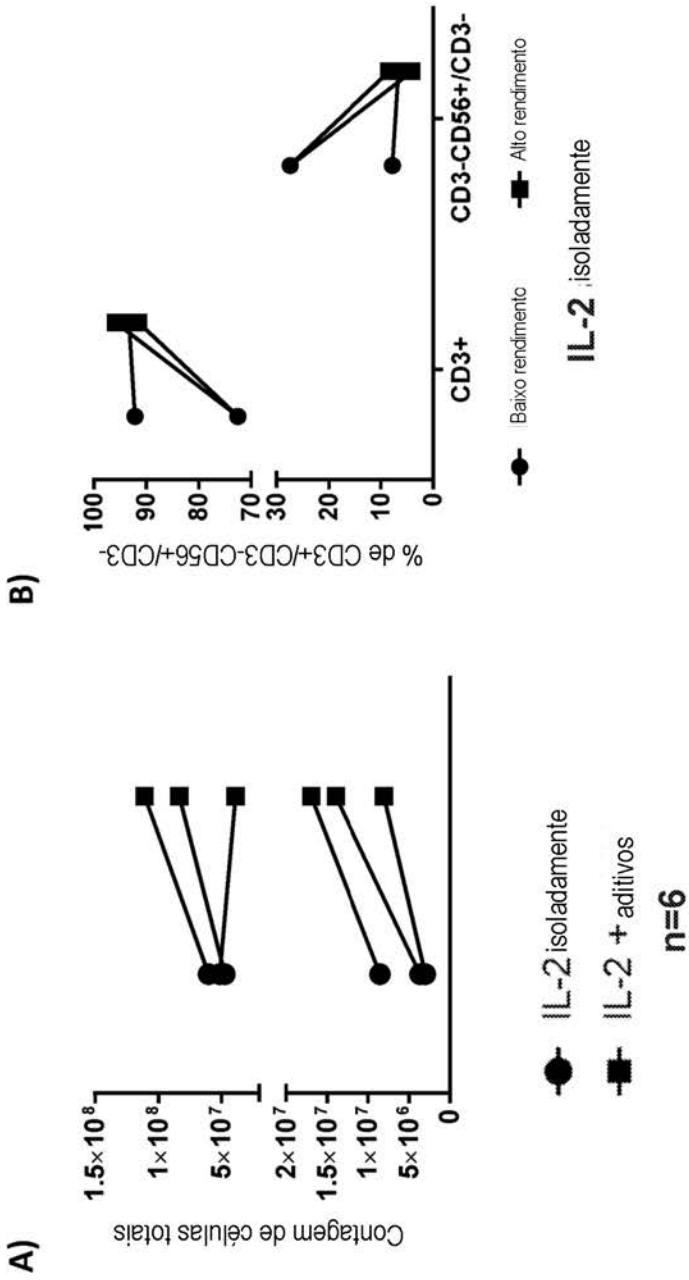

A)
Contagem de células totais
1.5×10^8
1×10^8
5×10^7
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
5×10^6
0
IL-2 isoladamente
IL-2 + aditivos
n=6
B)
% de CD3+/CD3-CD56+/CD3-
100
90
80
70
30
20
10
0
CD3+
CD3-CD56+/CD3-
Baixo rendimento
Alto rendimento
IL-2 isoladamente

Figura 24

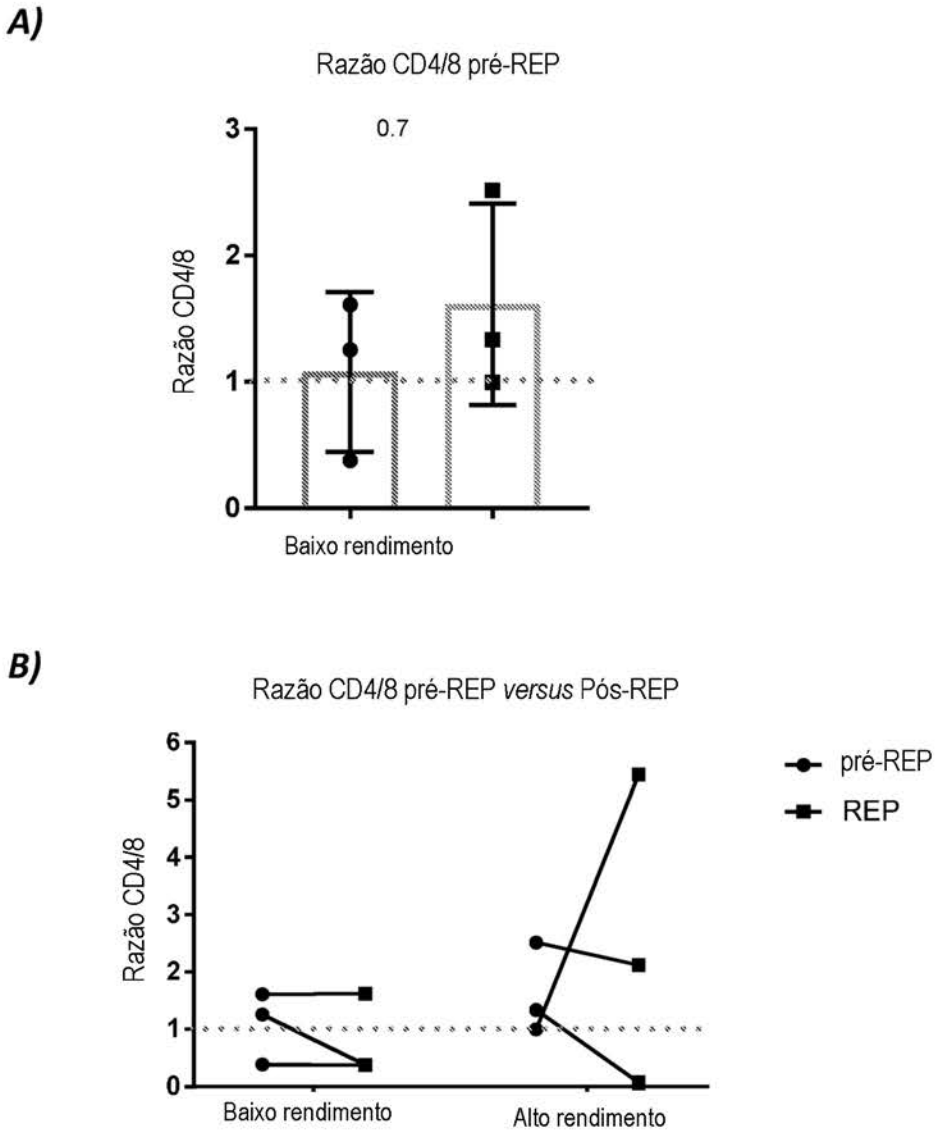
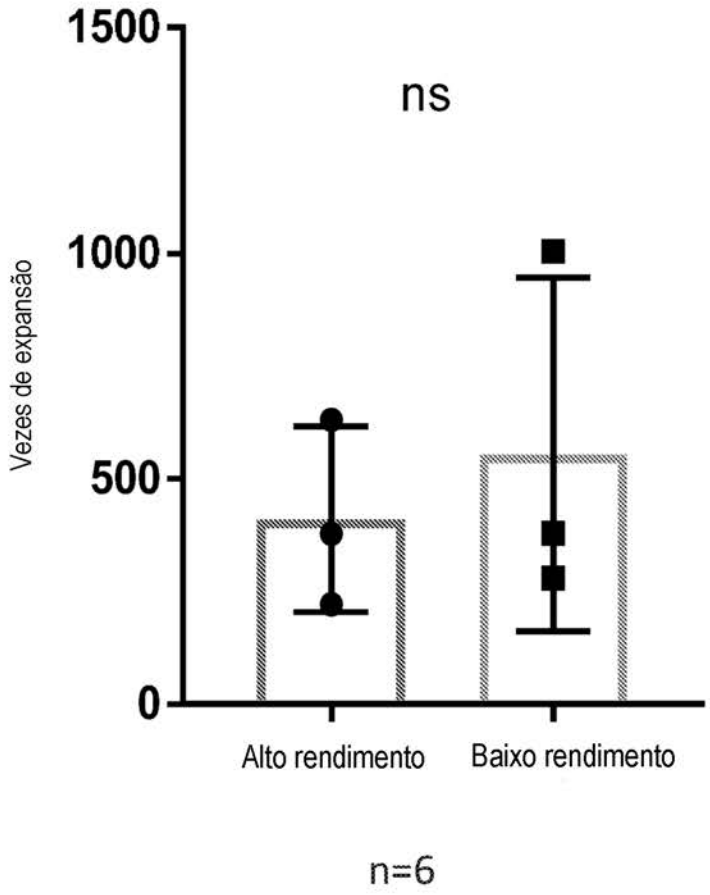

A)
Razão CD4/8 pré-REP
0.7
Razão CD4/8
Baixo rendimento
B)
Razão CD4/8 pré-REP *versus* Pós-REP
Razão CD4/8
pré-REP
REP
Baixo rendimento
Alto rendimento

Figura 25


1500
1000
500
0
ns
Vezes de expansão
Alto rendimento
Baixo rendimento
n=6

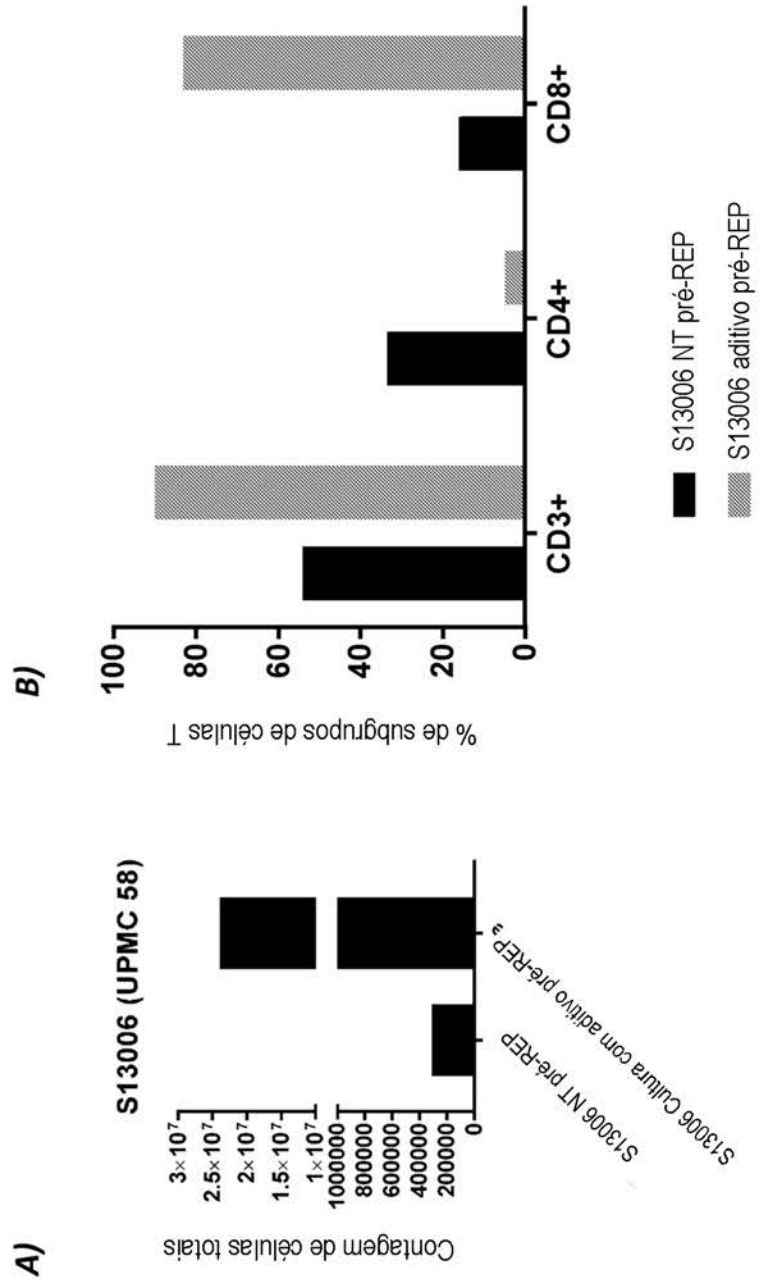
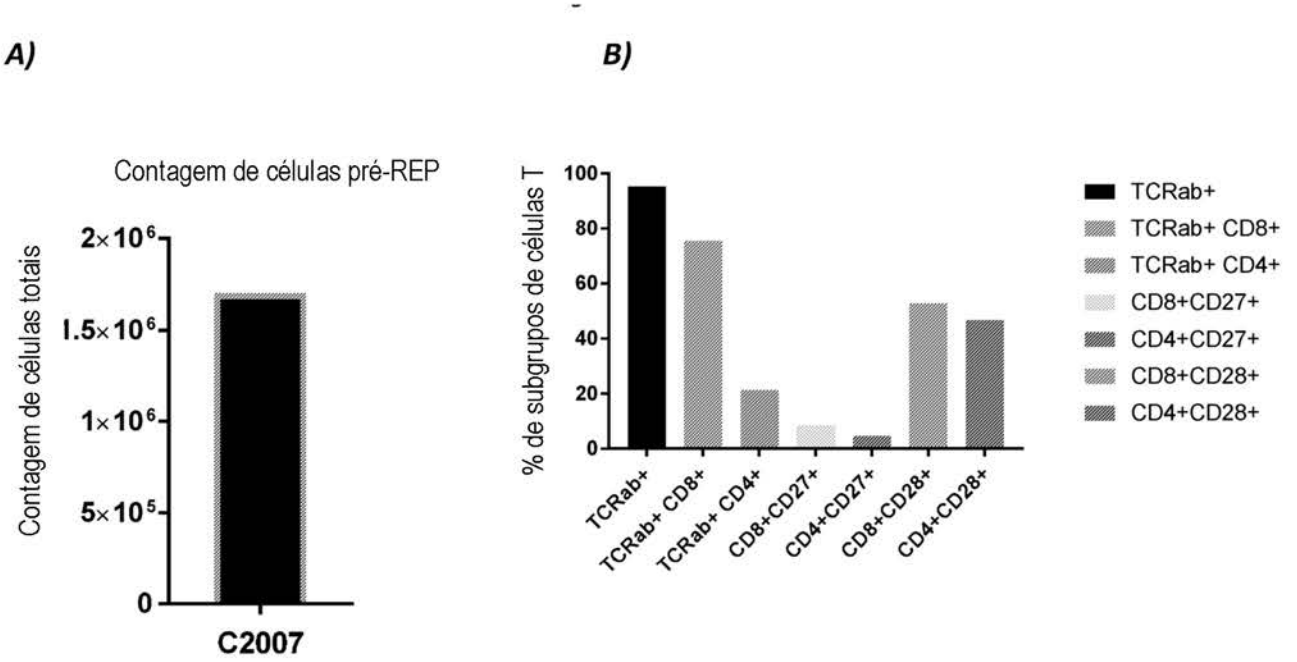

A)
S13006 (UPMC 58)
Contagem de células totais
3×10^7
2.5×10^7
2×10^7
1.5×10^7
1×10^7
1000000
800000
600000
400000
200000
0
S13006 NT pré-REP
S13006 Cultura com aditivo pré-REP 3
B)
% de subgrupos de células T
100
80
60
40
20
0
CD3+
CD4+
CD8+
S13006 NT pré-REP
S13006 aditivo pré-REP

Figura 26

Petição 870200083164, de 03/07/2020, pág. 594/709

Figura 27



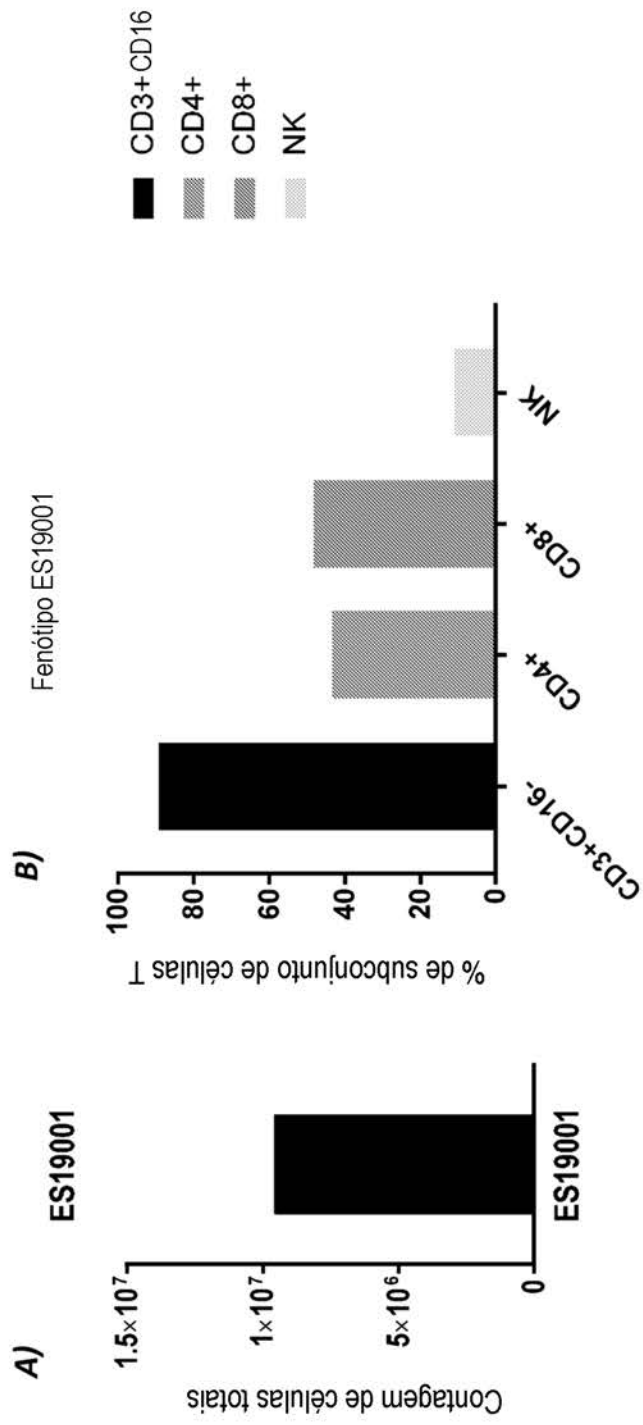

A)
ES19001
Contagem de células totais
1.5x10^7
1x10^7
5x10^6
0
ES19001
B)
Fenótipo ES19001
% de subconjunto de células T
100
80
60
40
20
0
CD3+CD16-
CD4+
CD8+
NK
CD3+CD16
CD4+
CD8+
NK

Figura 28

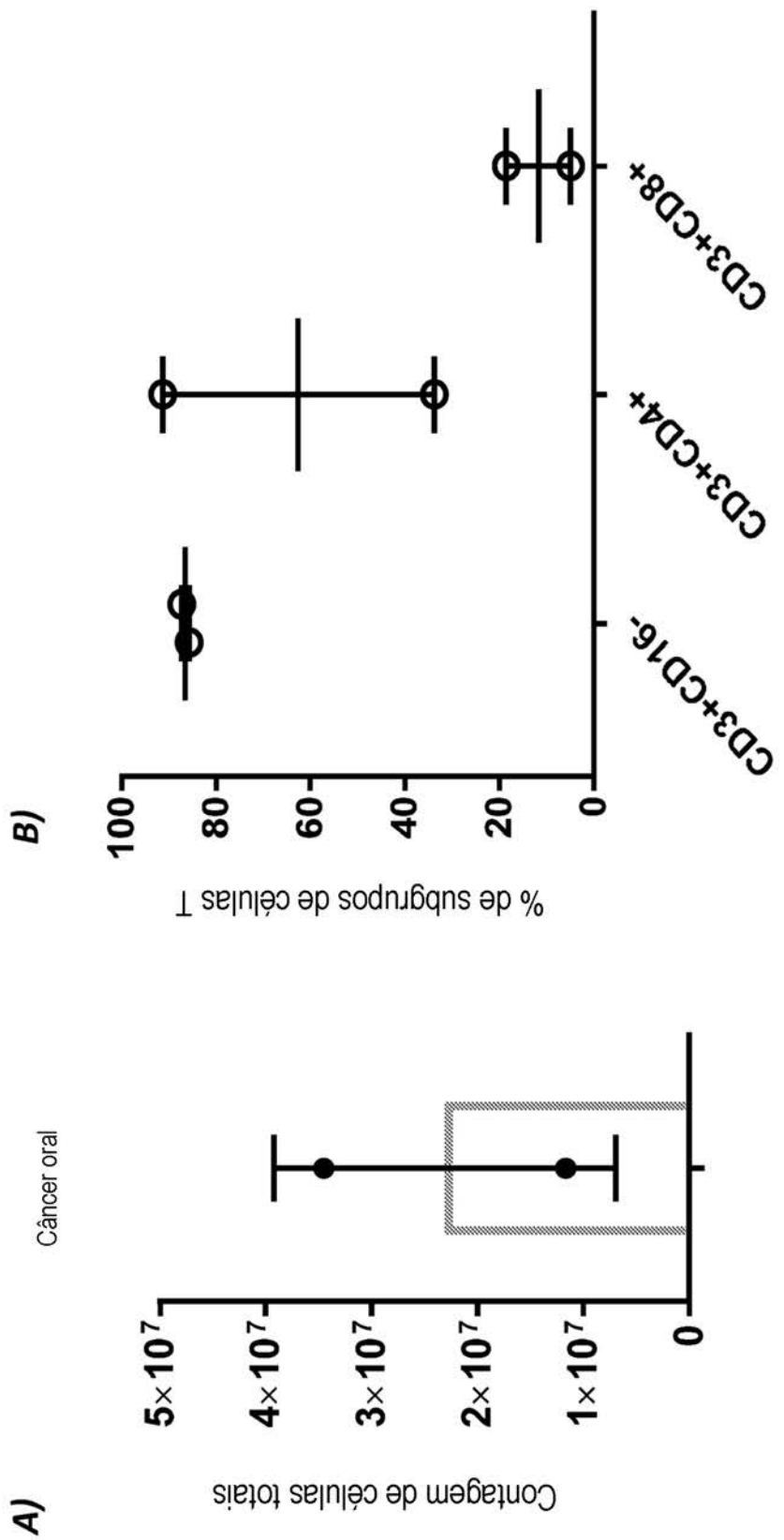

A)
Contagem de células totais
5×10^7
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
Câncer oral
B)
% de subgrupos de células T
100
80
60
40
20
0
CD3+CD16-
CD3+CD4+
CD3+CD8+

Figura 29

Figura 30

Nome do tumor	Crescimento celular	Análise
UPMC-3 (P7011) Relatado	Placa de 24 cavidades; 1) IL-2 versus 2) Citocinas aditivos	Crescimento celular, viabilidade, fenotipagem, CD107a
UPMC-9 (P7017) Relatado	Pouca expansão	N/A
UPMC-17 (P7019) Relatado	Cultura contaminada. Descartado.	N/A
UPMC-26 (P7022)	Pouca expansão	N/A
UPMC-30 (P7028)	Pré-REP Dia 12: 1,6e6, 40% viáveis Pré-REP Dia 21: 3,49e7, 89% viáveis	Crescimento celular, viabilidade, fenotipagem, CD107a, IFNγ, início de REP e análise
UPMC-61 (P7031)	Pré-REP Dia 12: 1,52e5, 66% viáveis Pré-REP Dia 21: 1,14e7, 1,14e7, 40% viáveis	Crescimento celular, viabilidade, fenotipagem, CD107a, IFNγ, início de REP e análise
UPM-59 (P7033)	Pouca expansão	N/A
UPMC-61 (P7034)	Pré-REP: em curso	

Petição 870200083164, de 03/07/2020, pág. 598/709

Figura 31

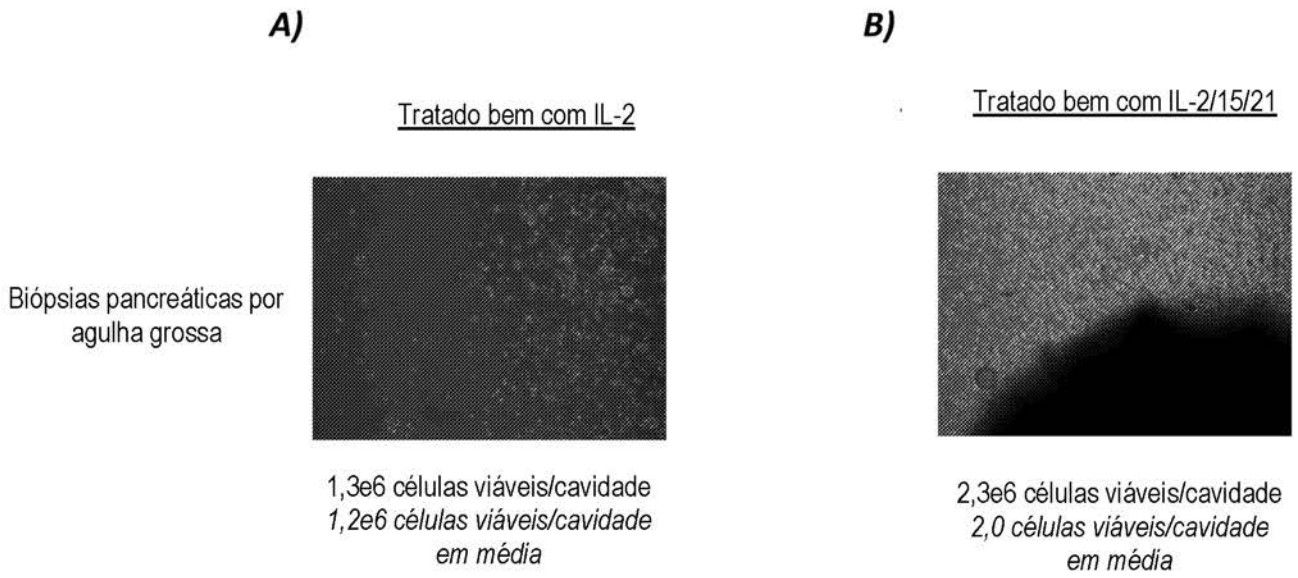
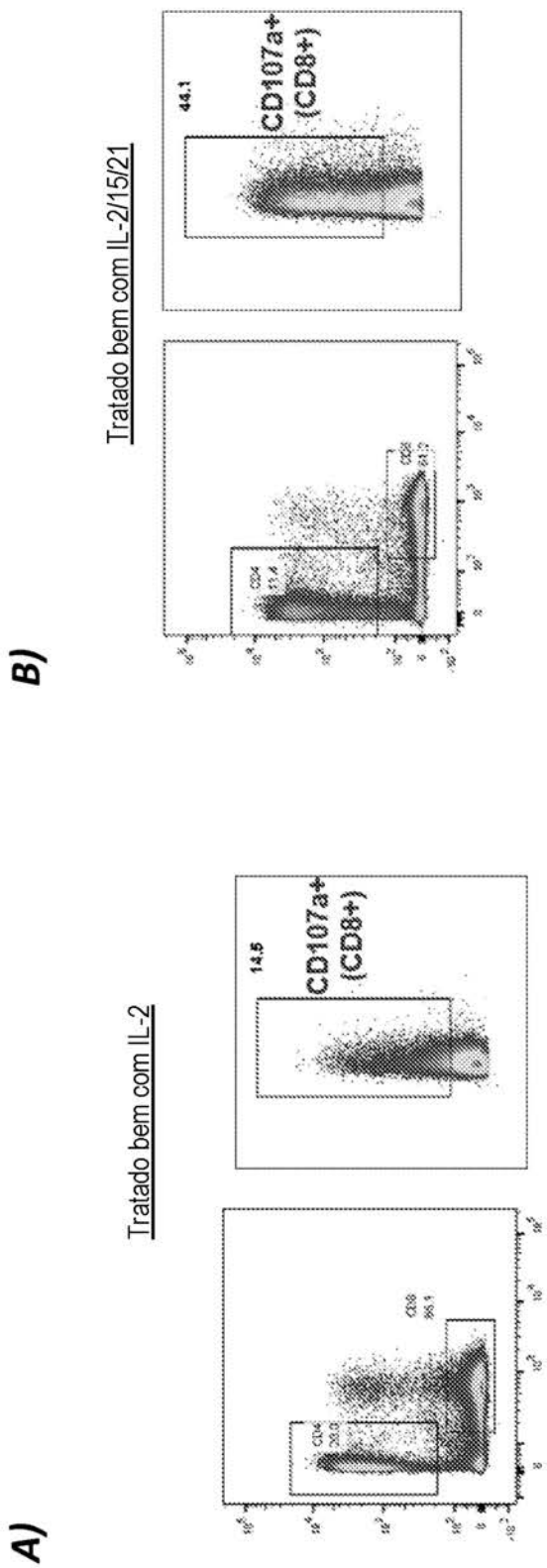


Figura 32


A)
Tratado bem com IL-2
14.5
CD107a+
(CD8+)
B)
Tratado bem com IL-2/15/21
44.1
CD107a+
(CD8+)

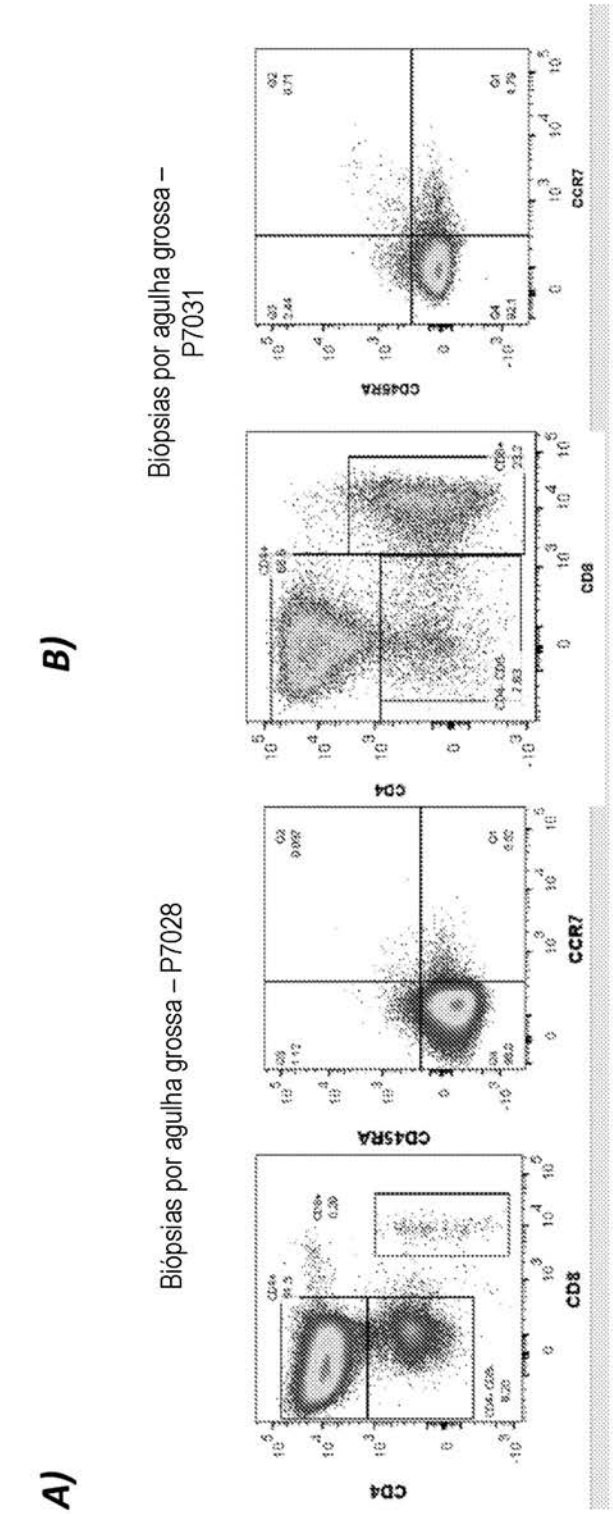

A)
Biópsias por agulha grossa – P7028
CD4
CD8
CD45RA
CCR7
B)
Biópsias por agulha grossa – P7031
CD4
CD8
CD45RA
CCR7

Figura 33

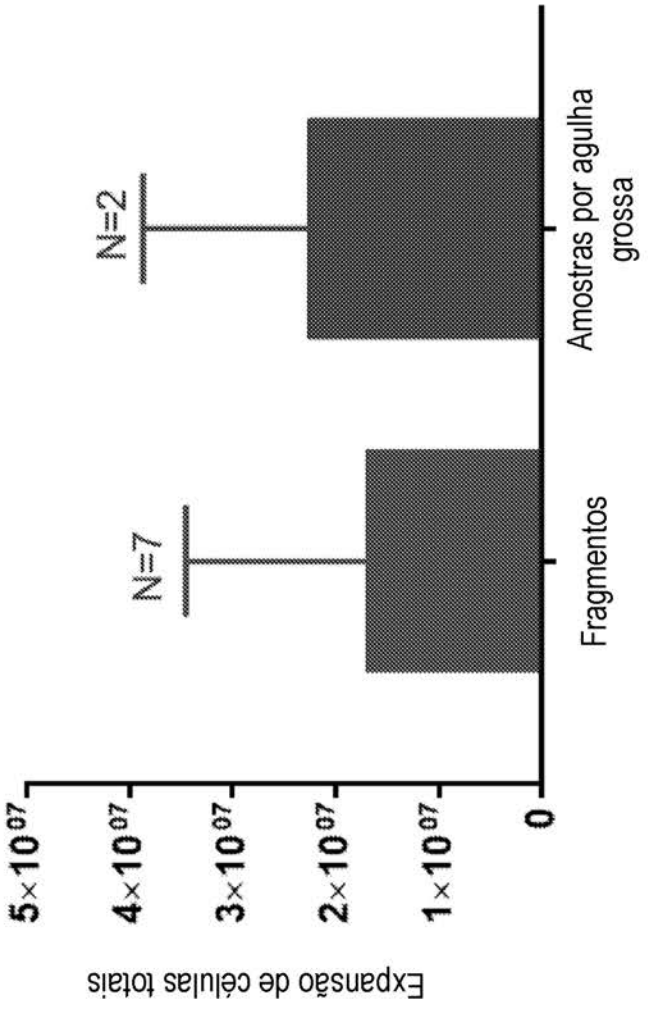

Expansão de células totais
5×10^07
4×10^07
3×10^07
2×10^07
1×10^07
0
N=7
N=2
Fragmentos
Amostras por agulha grossa

Figura 34

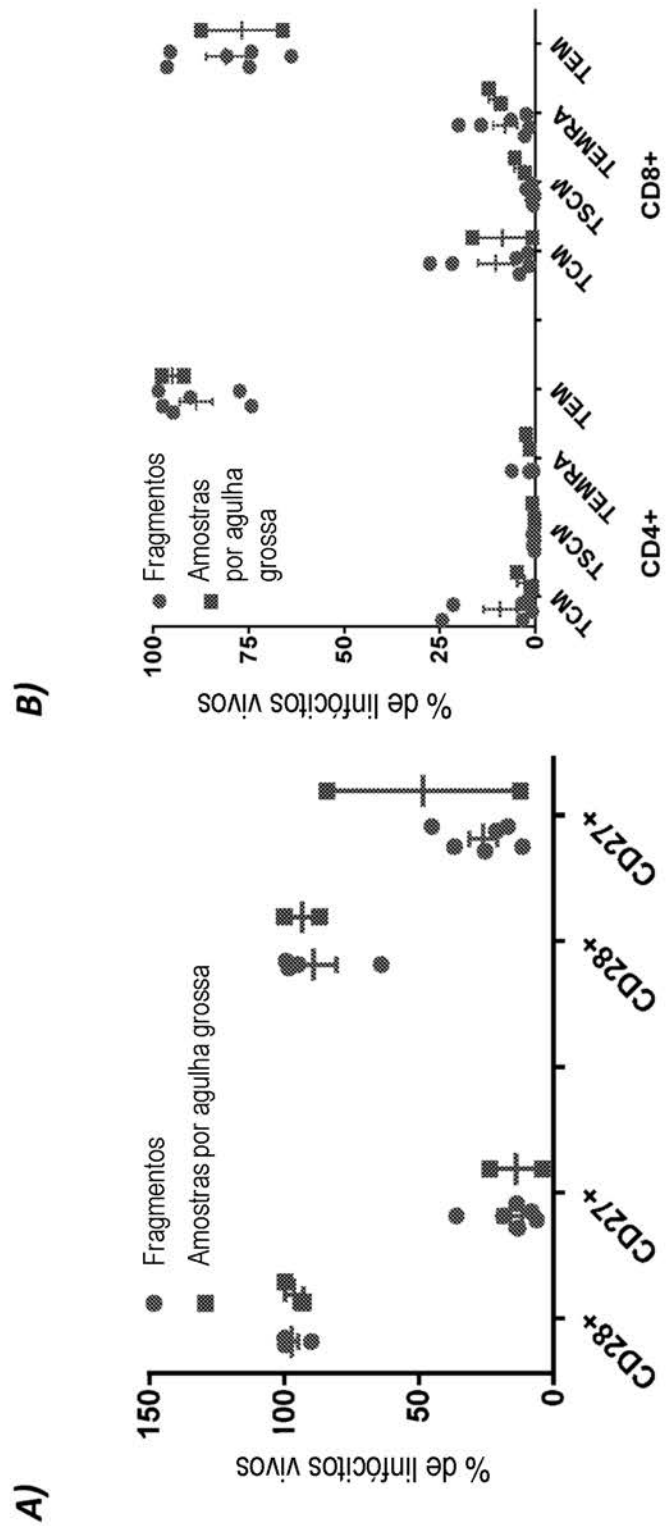

A)
% de linfócitos vivos
150
100
50
0
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
CD28+
CD27+
CD28+
CD27+
B)
% de linfócitos vivos
100
75
50
25
0
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4+
TCM
TSCM
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+

Figura 35

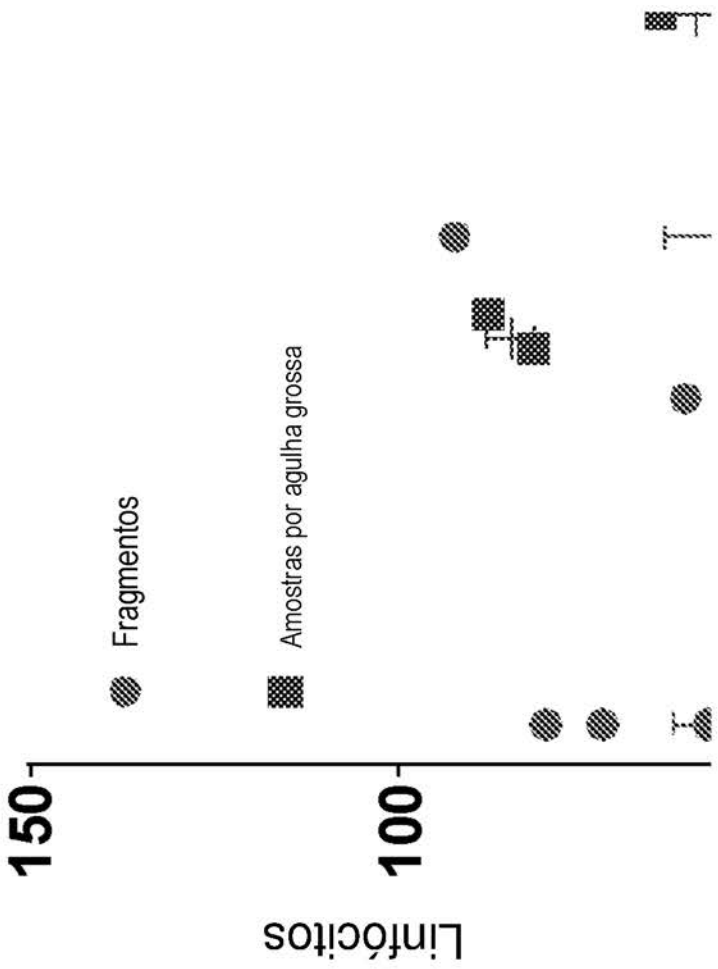


Figura 36

Figura 37

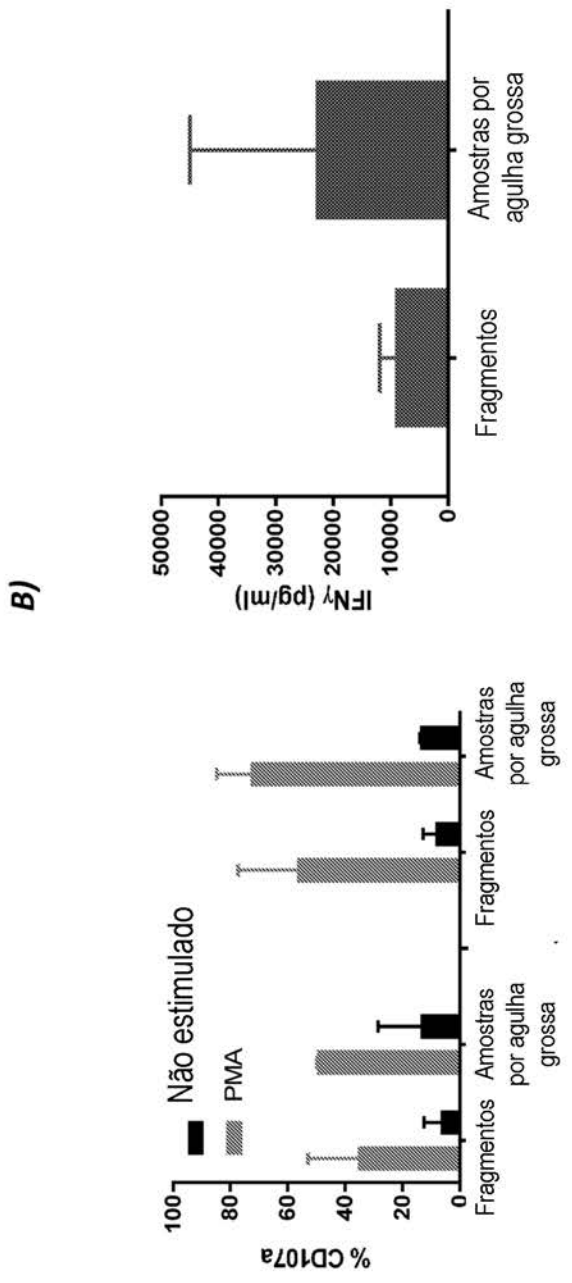
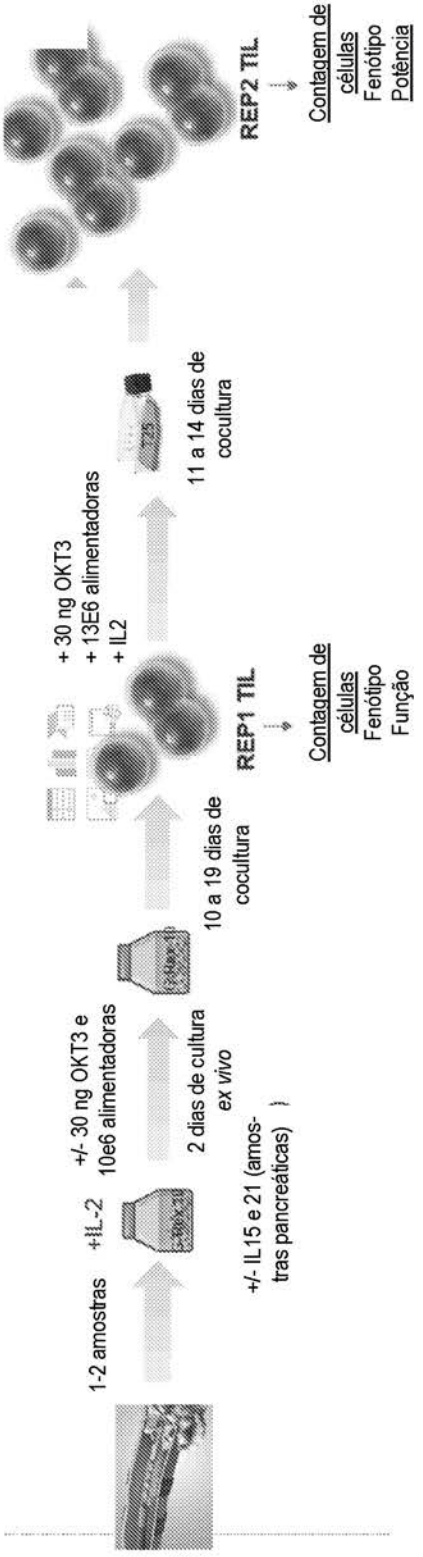

A)
Não estimulado
PMA
% CD107a
100
80
60
40
20
0
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
CD4+
CD8+
B)
IFNγ (pg/ml)
50000
40000
30000
20000
10000
0
Fragmentos
Amostras por agulha grossa

Figura 38A


1-2 amostras
+IL-2
+/- 30 ng OKT3 e
10e6 alimentadoras
2 dias de cultura
ex vivo
+/- IL15 e 21 (amos-
tras pancreáticas)
10 a 19 dias de
cocultura
REP1 TIL
Contagem de
células
Fenótipo
Função
+ 30 ng OKT3
+ 13E6 alimentadoras
+ IL2
11 a 14 dias de
cocultura
REP2 TIL
Contagem de
células
Fenótipo
Potência
+ 30 ng OKT3
+ 13E6 alimentadoras
+ IL2

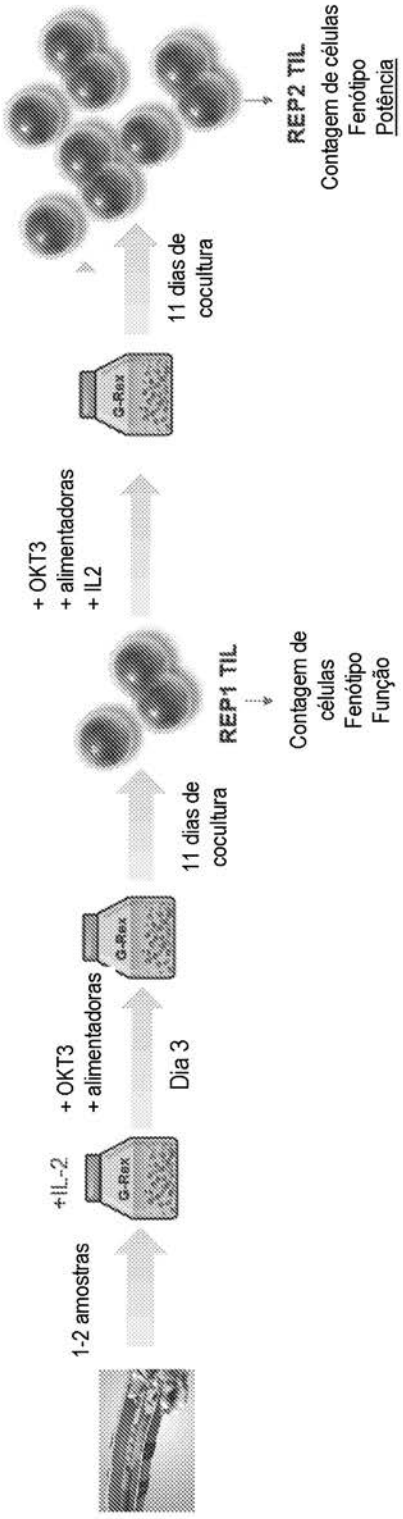

1-2 amostras
+IL-2
G-Rex
+ OKT3
+ alimentadoras
Dia 3
G-Rex
11 dias de cocultura
REP1 TIL
Contagem de células
Fenótipo
Função
+ OKT3
+ alimentadoras
+ IL2
G-Rex
11 dias de cocultura
REP2 TIL
Contagem de células
Fenótipo
Potência

Figura 38B

Petição 870200083164, de 03/07/2020, pág. 607/709

Figura 39

	Condições da cultura	Amostras por agulha grossa/ cond. (nº)	REP1	REP2
Pâncreas (P7034)	REP1: + TC + OKT3 e alimentadoras *versus* SEM OKT3 e alimentadoras REP2: +/- coquetel triplo	2 (2 condições)	**>50E6 células** no Dia 17 SOMENTE na presença de OKT3 e alimentadoras	**207 e 162 vezes** de expansão +/- coquetel triplo **IFNγ 3000 pg/mL** +/- coquetel triplo
Pâncreas (P7033)	REP1: IL2 *versus* TC REP2: +/- coquetel triplo	4 (2 condições)	**>50E6 células** no Dia 11 somente na presença de OKT3 e alimentadoras +/- TC	**207 e 231 vezes** de expansão +/- coquetel triplo **IFNγ 1000 pg/mL** +/- coquetel triplo
Pâncreas (P7039)	REP1: TC + OKT3 e alimentadoras SEM OKT3 e alimentadoras IL-2 + OKT3 e alimentadoras, IL-2 SEM OKT3 e alimentadoras REP2: +/- TC	2 (4 condições)	**>50E6 células** no Dia 12 (-/+ TC) SOMENTE na presença de OKT3 e alimentadoras	**662 e 582 vezes** de expansão +/- coquetel triplo **IFNγ 10K e 3K pg/mL** +/- coquetel triplo

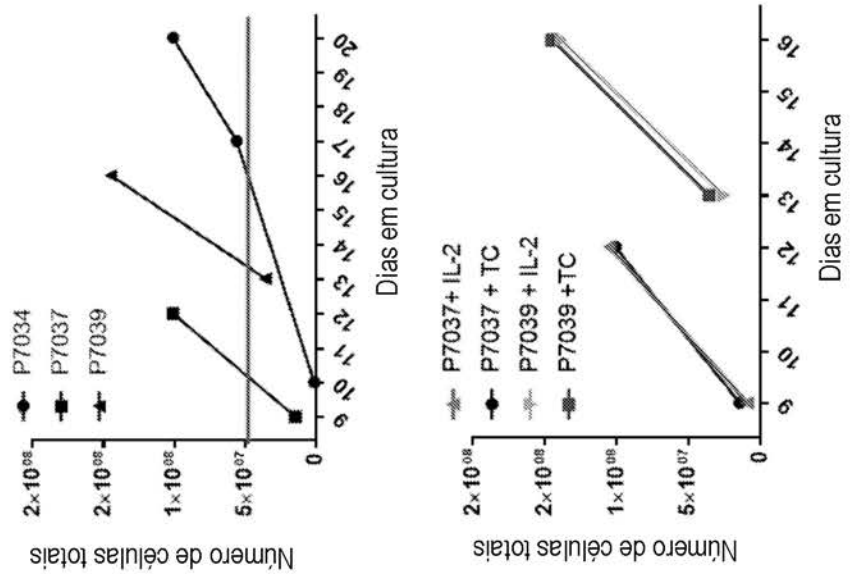

P7034
P7037
P7039
Número de células totais
Dias em cultura
P7037+ IL-2
P7037 + TC
P7039 + IL-2
P7039 +TC
Número de células totais
Dias em cultura

Figura 40

Petição 870200083164, de 03/07/2020, pág. 609/709

Figura 41

	Condições da cultura	Amostras por agulha grossa/ cond. (nº)	REP1	REP2
Melanoma (M1114)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	2	**>50E6 células** no Dia 11	**215 vezes** de expansão **IFNγ ~1000 pg/mL**
Melanoma (M1115)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	2	**>50E6 células** no Dia 12	**662 vezes** de expansão **IFNγ ~3000 pg/mL**
Melanoma (M1118)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	1	**>50E6 células** no Dia 11	**215 vezes** de expansão +/- coquetel triplo **IFNγ -10.000 pg/mL**
** Melanoma (M1121)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	1	**50E6 células** no Dia 9	**115 vezes** de expansão +/- coquetel triplo **IFNγ -2000 pg/mL**

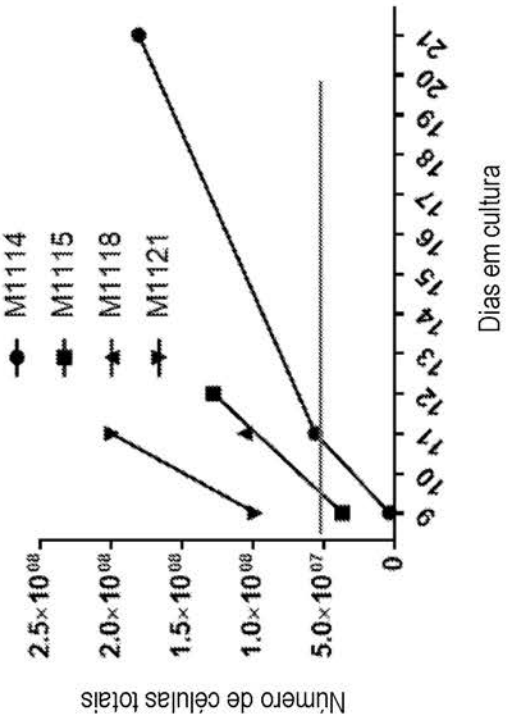

M1114
M1115
M1118
M1121
2.5×10^08
2.0×10^08
1.5×10^08
1.0×10^08
5.0×10^07
0
Número de células totais
6
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
Dias em cultura

Figura 42

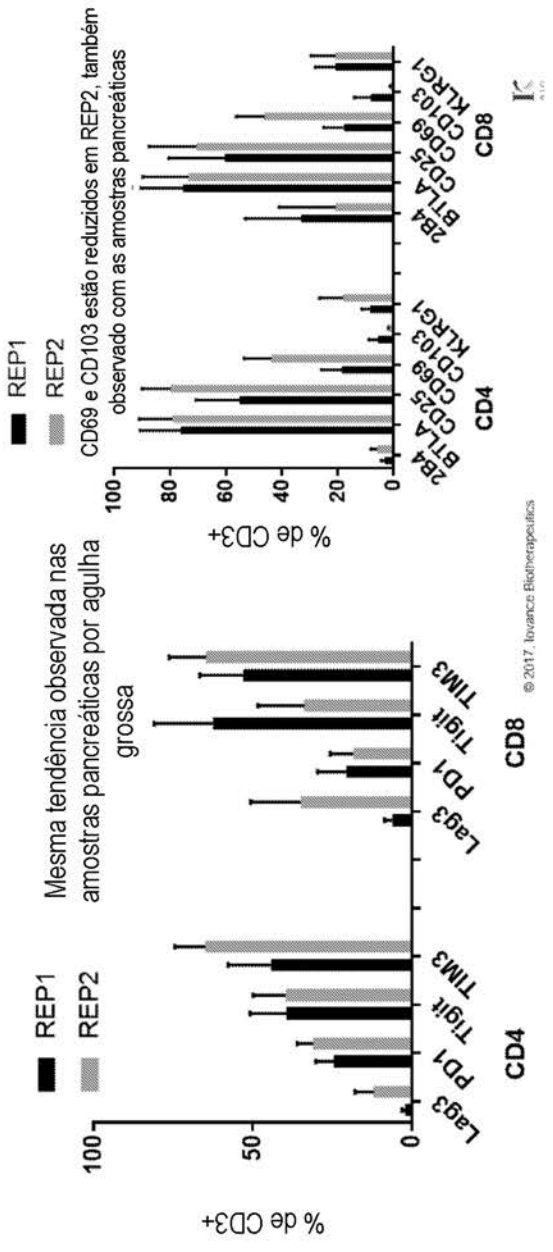

REP1
REP2
Mesma tendência observada nas amostras pancreáticas por agulha grossa
% de CD3+
100
50
0
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD8
REP1
REP2
CD69 e CD103 estão reduzidos em REP2, também observado com as amostras pancreáticas
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD8
© 2017, Iovance Biotherapeutics

Figura 43

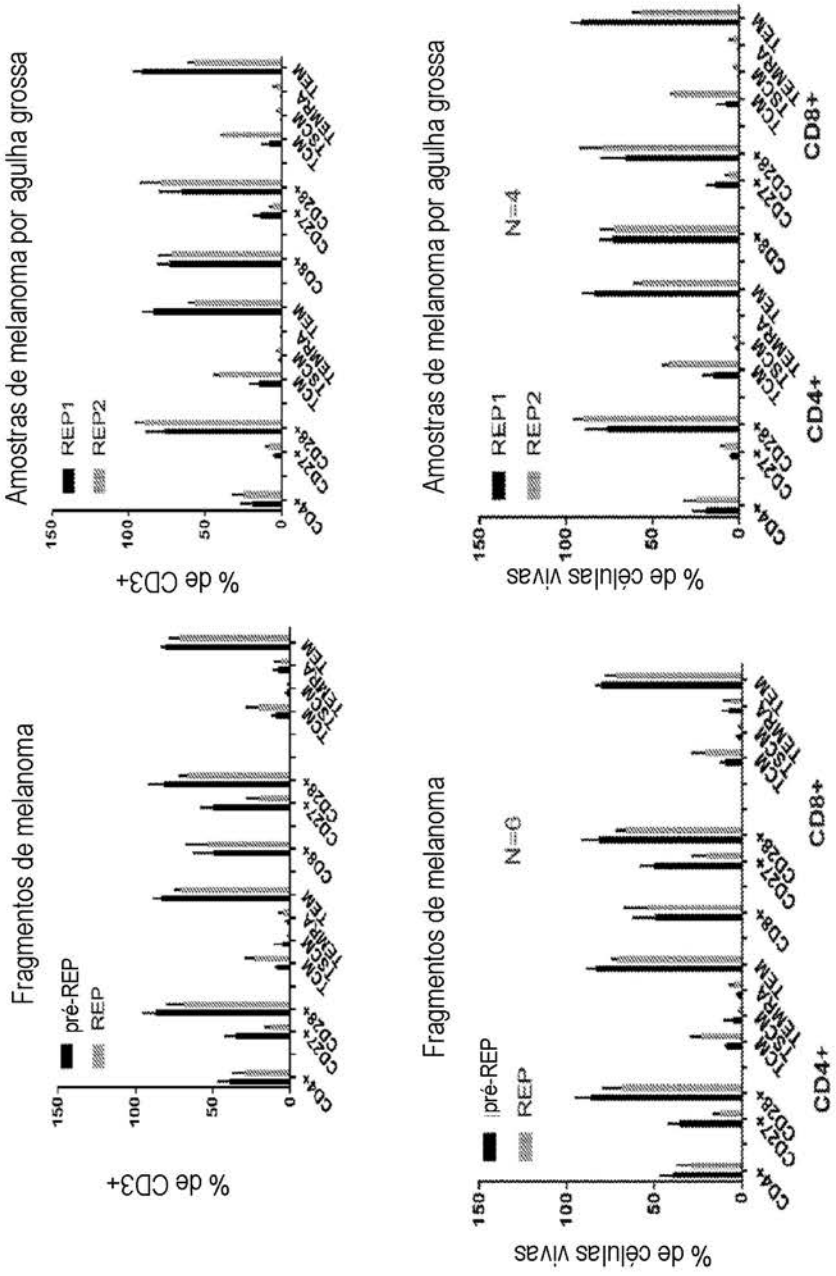

Amostras de melanoma por agulha grossa
REP1
REP2
% de CD3+
Fragmentos de melanoma
pré-REP
REP
% de CD3+
Amostras de melanoma por agulha grossa
REP1
REP2
N=4
% de células vivas
CD4+
CD8+
Fragmentos de melanoma
pré-REP
REP
N=6
% de células vivas
CD4+
CD8+

Figura 44

Petição 870200083164, de 03/07/2020, pág. 613/709

Figura 45

	Condições da cultura	Amostras por agulha grossa/ cond. (nº)	REP1	REP2
Mama (EP11032)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	1 *versus* 2	**>50E6 células** no Dia 11	**173 e 158 vezes de expansão (1/2 amostras)** **IFNγ ~ pg/mL**
Ovariano (OV8016)	REP1: IL-2 +/- OX40 REP2: IL-2 +/- OX40 (em curso)	2	**>50E6 células** no Dia 11 (condição com OXO40)	**Em curso**

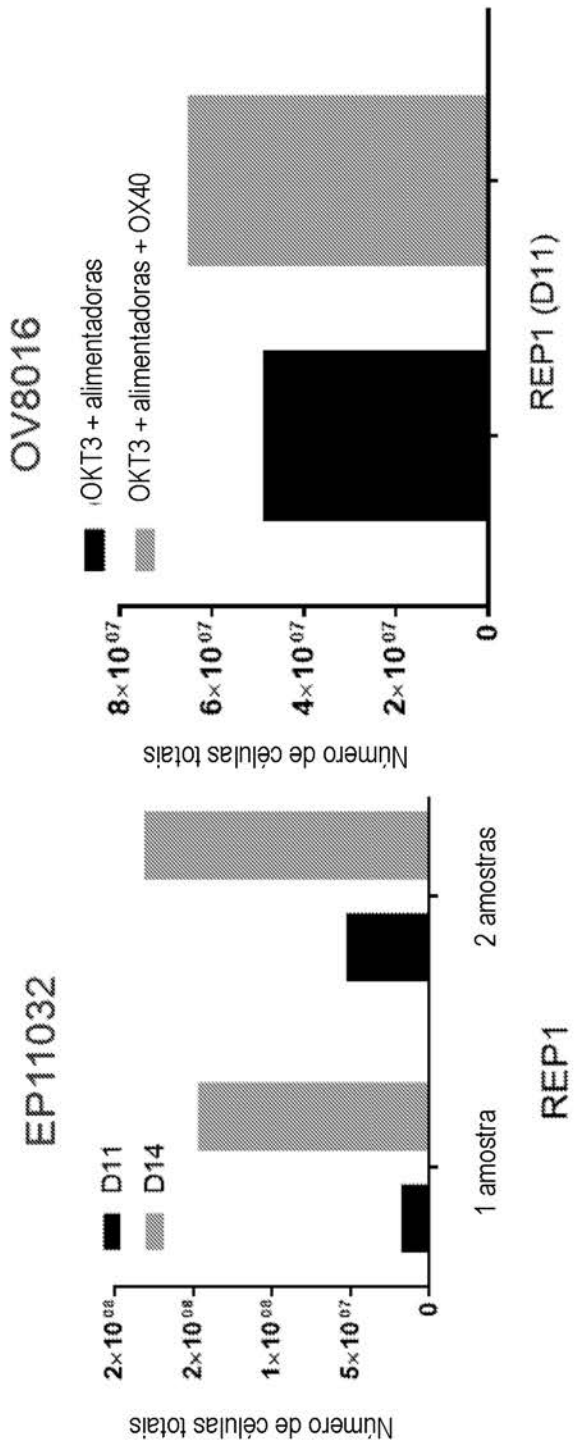

EP11032
D11
D14
Número de células totais
2×10^08
2×10^08
1×10^08
5×10^07
0
1 amostra
2 amostras
REP1
OV8016
OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
Número de células totais
8×10^07
6×10^07
4×10^07
2×10^07
0
REP1 (D11)

Figura 46

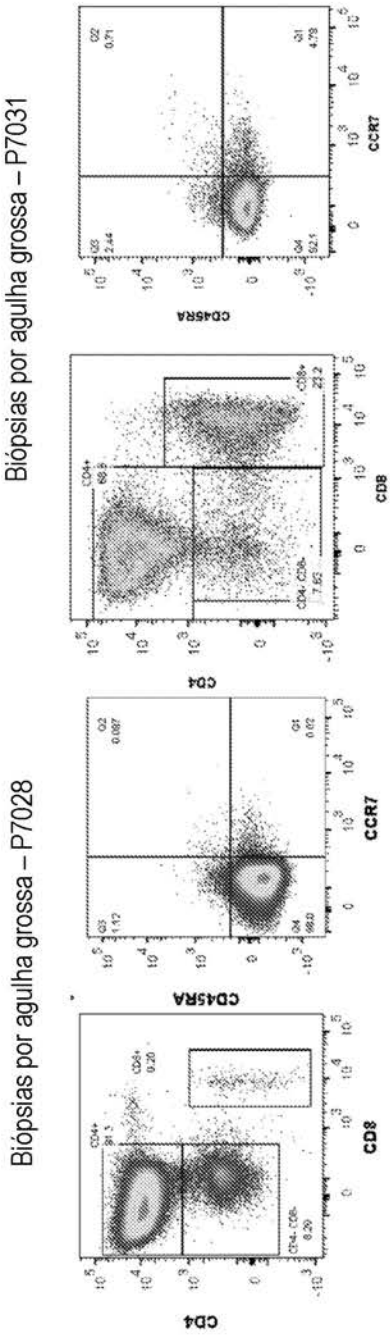

Biópsias por agulha grossa – P7028
Biópsias por agulha grossa – P7031
CD4
CD8
CD45RA
CCR7

Figura 47

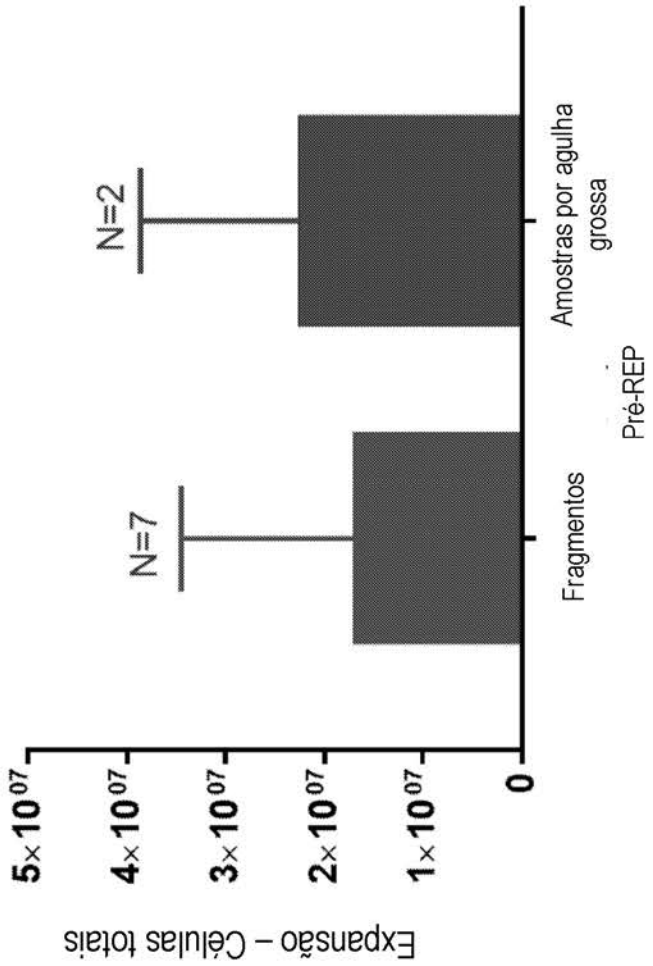

Expansão – Células totais
5×10^07
4×10^07
3×10^07
2×10^07
1×10^07
0
N=7
N=2
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
Pré-REP

Figura 48

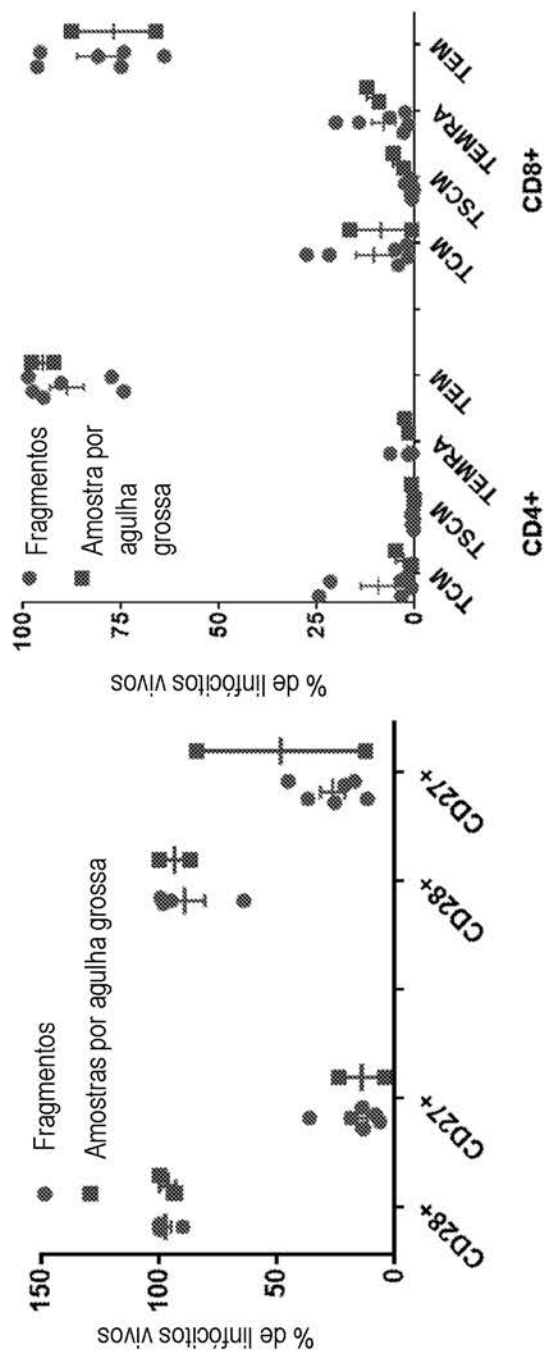

Fragmentos
Amostras por agulha grossa
% de linfócitos vivos
150
100
50
0
CD28+
CD27+
CD28+
CD27+
Fragmentos
Amostra por agulha grossa
% de linfócitos vivos
100
75
50
25
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+

Figura 49

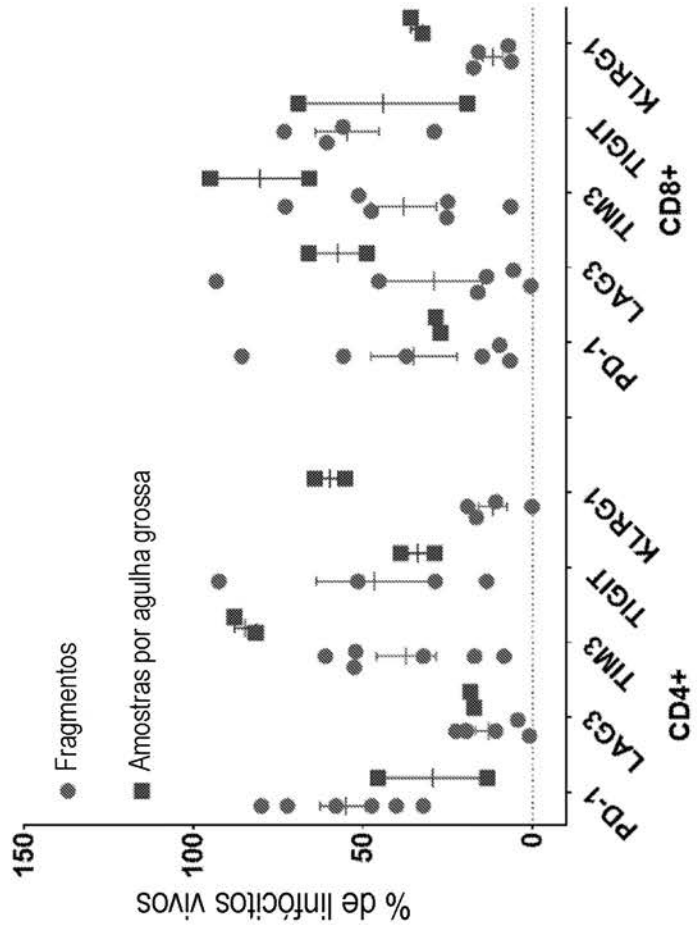
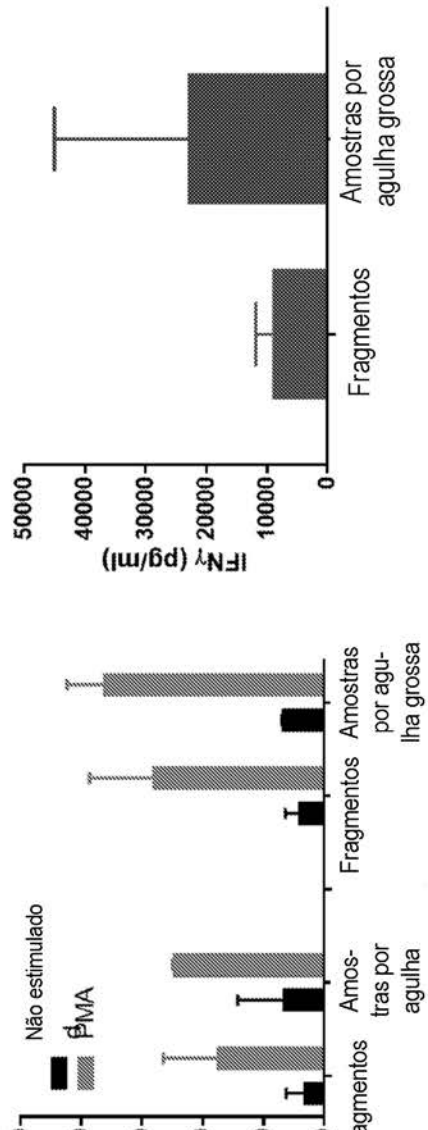

Fragmentos
Amostras por agulha grossa
% de linfócitos vivos
150
100
50
0
PD-1
LAG3
TIM3
TIGIT
KLRG1
CD4+
PD-1
LAG3
TIM3
TIGIT
KLRG1
CD8+

Figura 50

Figura 51


IFNγ (pg/ml)
50000
40000
30000
20000
10000
0
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
% CD107a
100
80
60
40
20
0
Não estimulado
PMA
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
Fragmentos
Amostras por agulha grossa
CD4
CD8

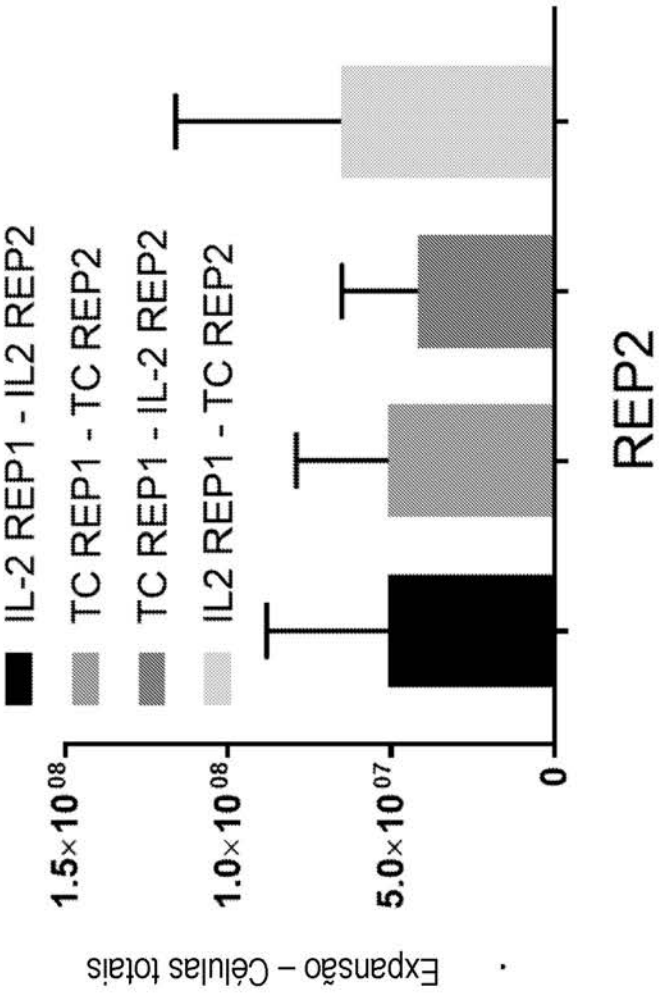

IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP1 - TC REP2
TC REP1 - IL-2 REP2
IL2 REP1 - TC REP2
1.5×10^08
1.0×10^08
5.0×10^07
0
Expansão – Células totais
REP2

Figura 52

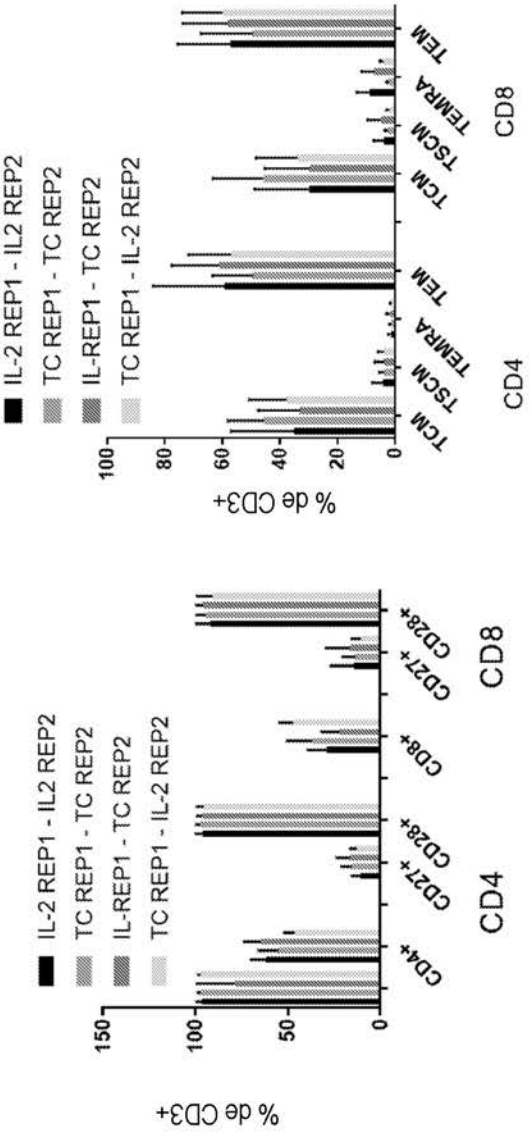

IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP1 - TC REP2
IL-REP1 - TC REP2
TC REP1 - IL-2 REP2
% de CD3+
150
100
50
0
CD4+
CD27+
CD28+
CD8+
CD27+
CD28+
CD4
CD8
IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP1 - TC REP2
IL-REP1 - TC REP2
TC REP1 - IL-2 REP2
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4
CD8

Figura 53

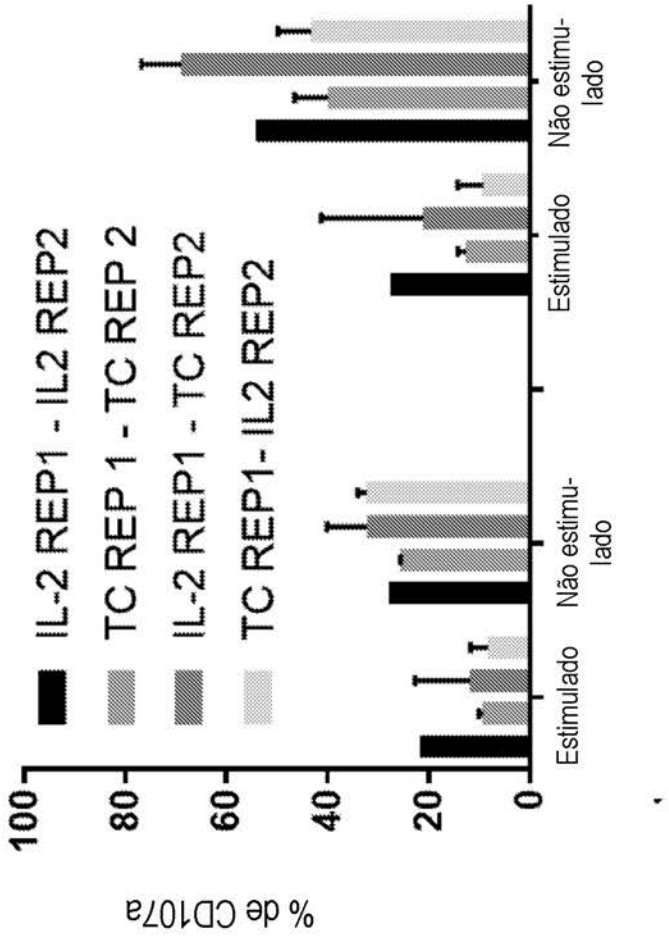

IL-2 REP1 - IL2 REP2
TC REP 1 - TC REP 2
IL-2 REP1 - TC REP2
TC REP1- IL2 REP2
% de CD107a
100
80
60
40
20
0
Estimulado
Não estimu-
lado
Estimulado
Não estimu-
lado
REP2

Figura 54

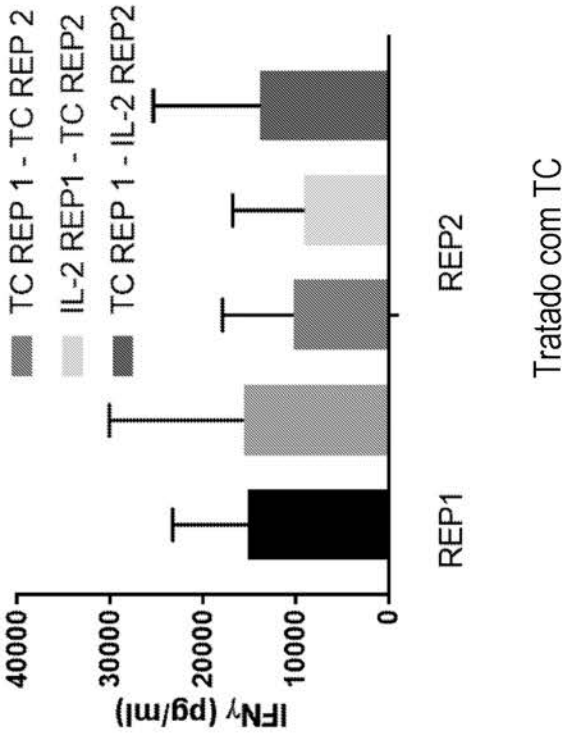

REP1
IL-2 REP1 - IL-REP2
TC REP 1 - TC REP 2
IL-2 REP1 - TC REP2
TC REP 1 - IL-2 REP2
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
REP1
REP2
Tratado com TC

Figura 55

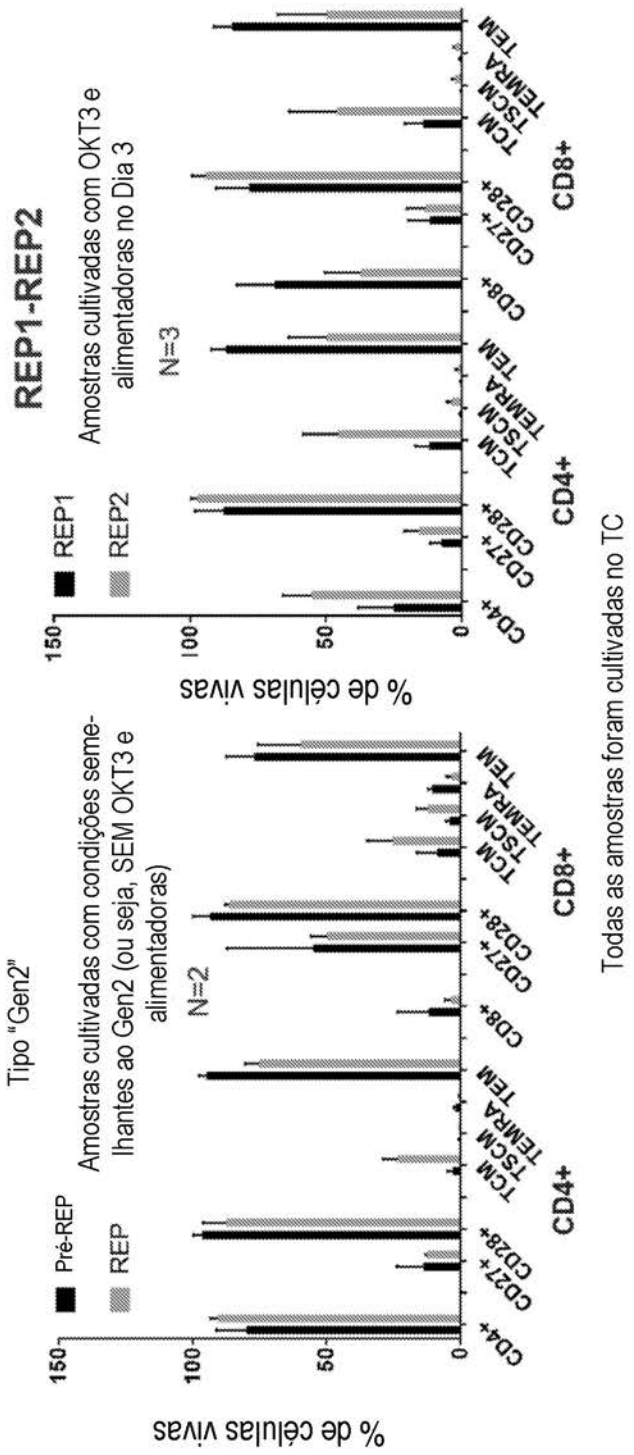

REP1-REP2
Amostras cultivadas com OKT3 e alimentadoras no Dia 3
N=3
REP1
REP2
% de células vivas
150
100
50
0
CD4+
CD27+ CD28+
CD8+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
Tipo "Gen2"
Amostras cultivadas com condições semelhantes ao Gen2 (ou seja, SEM OKT3 e alimentadoras)
N=2
Pré-REP
REP
Todas as amostras foram cultivadas no TC

Figura 56

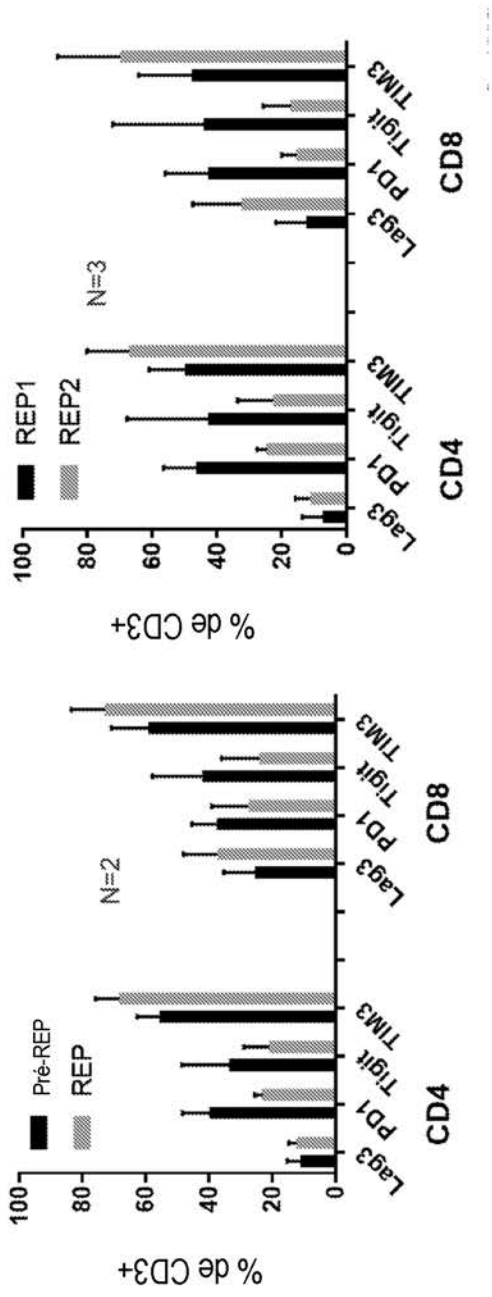

Pré-REP
REP
REP1
REP2
N=2
N=3
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
CD8

Figura 57

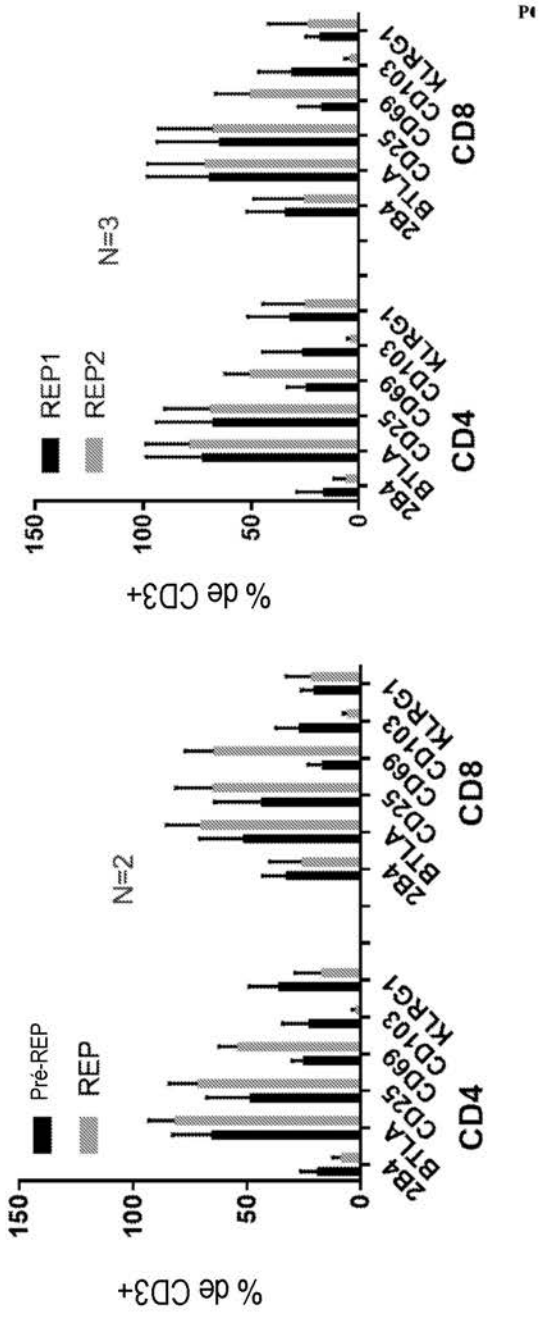

Pré-REP
REP
N=2
% de CD3+
150
100
50
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
CD8
REP1
REP2
N=3

Figura 58

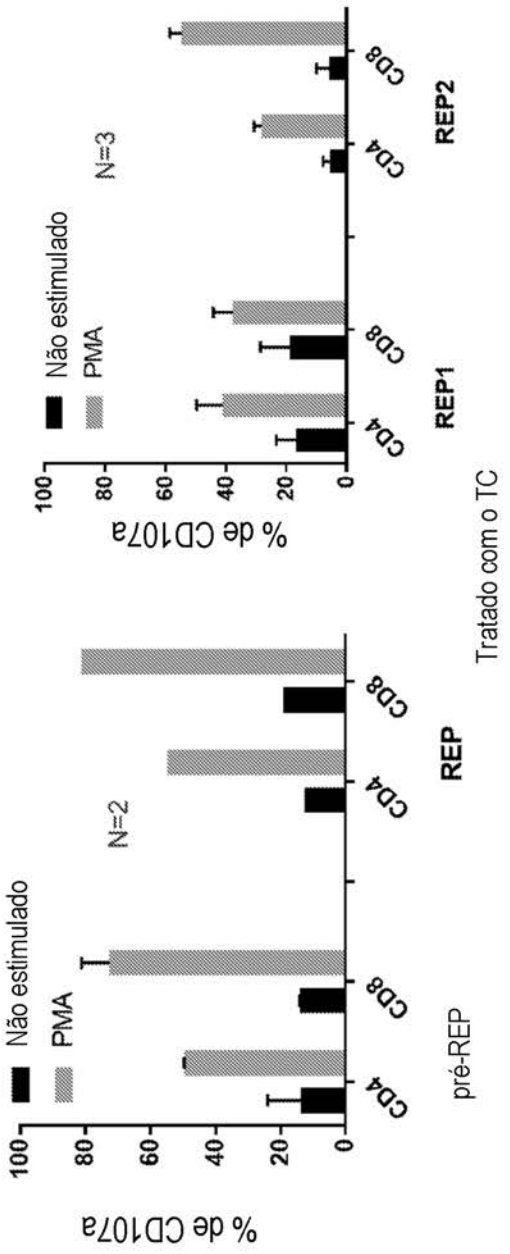

Não estimulado
PMA
N=2
N=3
% de CD107a
100
80
60
40
20
0
CD4
CD8
pré-REP
REP
REP1
REP2
Tratado com o TC

Figura 59

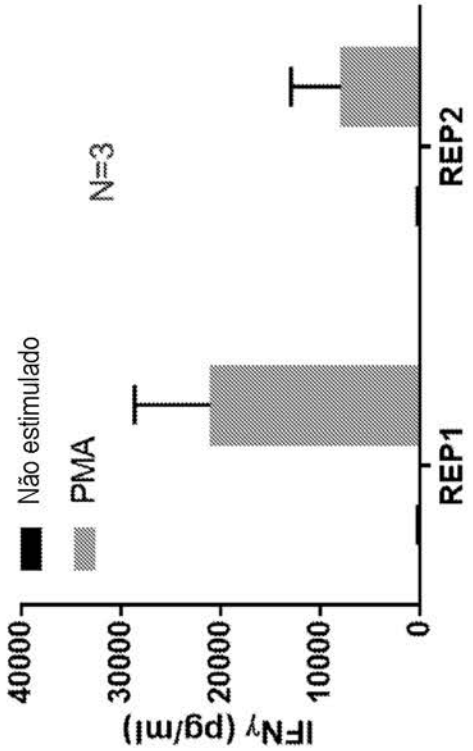

Não estimulado
PMA
N=3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
REP1
REP2

Figura 60

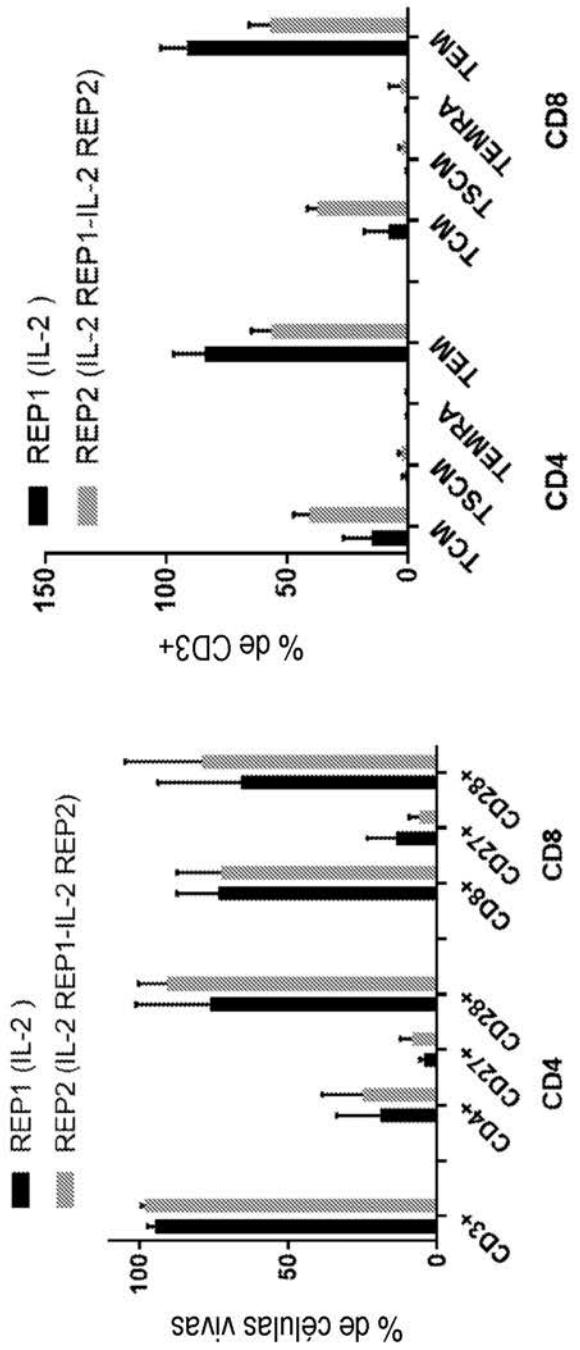

REP1 (IL-2)
REP2 (IL-2 REP1-IL-2 REP2)
% de células vivas
100
50
0
CD3+
CD4+
CD27+
CD28+
CD8+
CD27+
CD28+
CD4
CD8
% de CD3+
150
100
50
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4
CD8

Figura 61

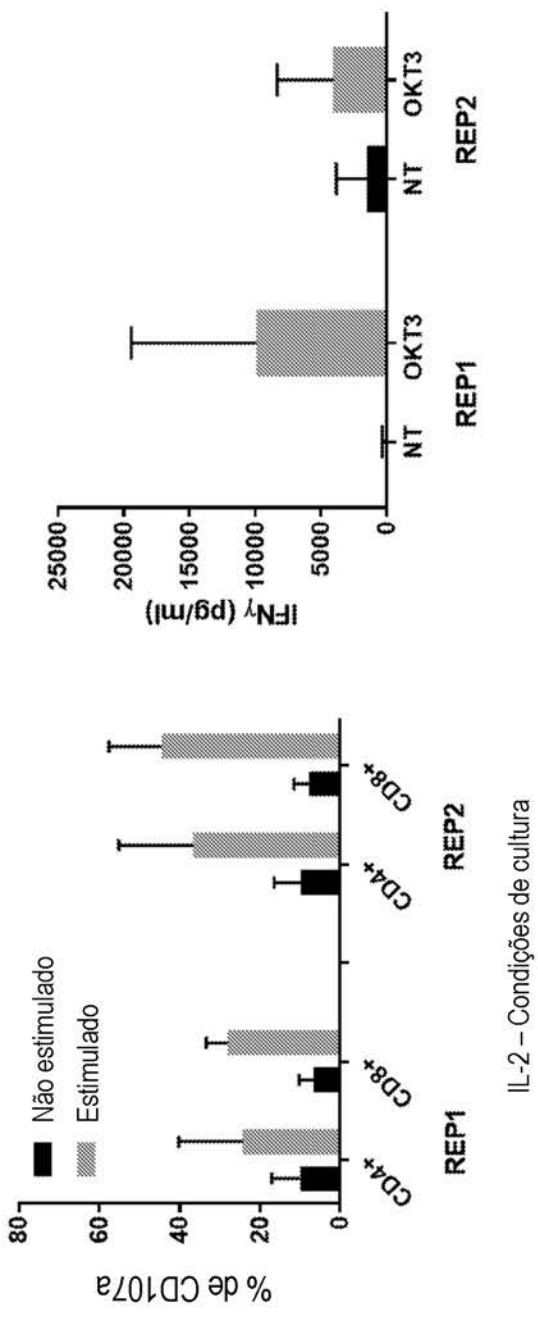

IFNγ (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
NT
OKT3
NT
OKT3
REP1
REP2
% de CD107a
80
60
40
20
0
Não estimulado
Estimulado
CD4+
CD8+
CD4+
CD8+
REP1
REP2
IL-2 – Condições de cultura

Figura 62

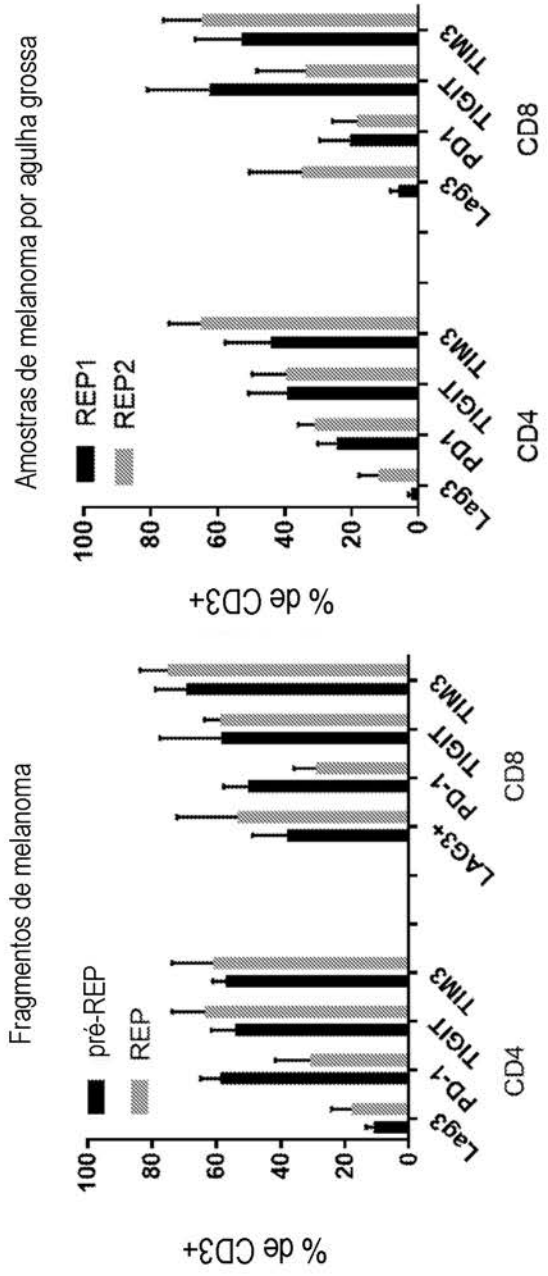

Fragmentos de melanoma
pré-REP
REP
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
Lag3
PD-1
TIGIT
TIM3
CD4
LAG3+
PD-1
TIGIT
TIM3
CD8
Amostras de melanoma por agulha grossa
REP1
REP2
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
Lag3
PD1
TIGIT
TIM3
CD4
Lag3
PD1
TIGIT
TIM3
CD8

Figura 63

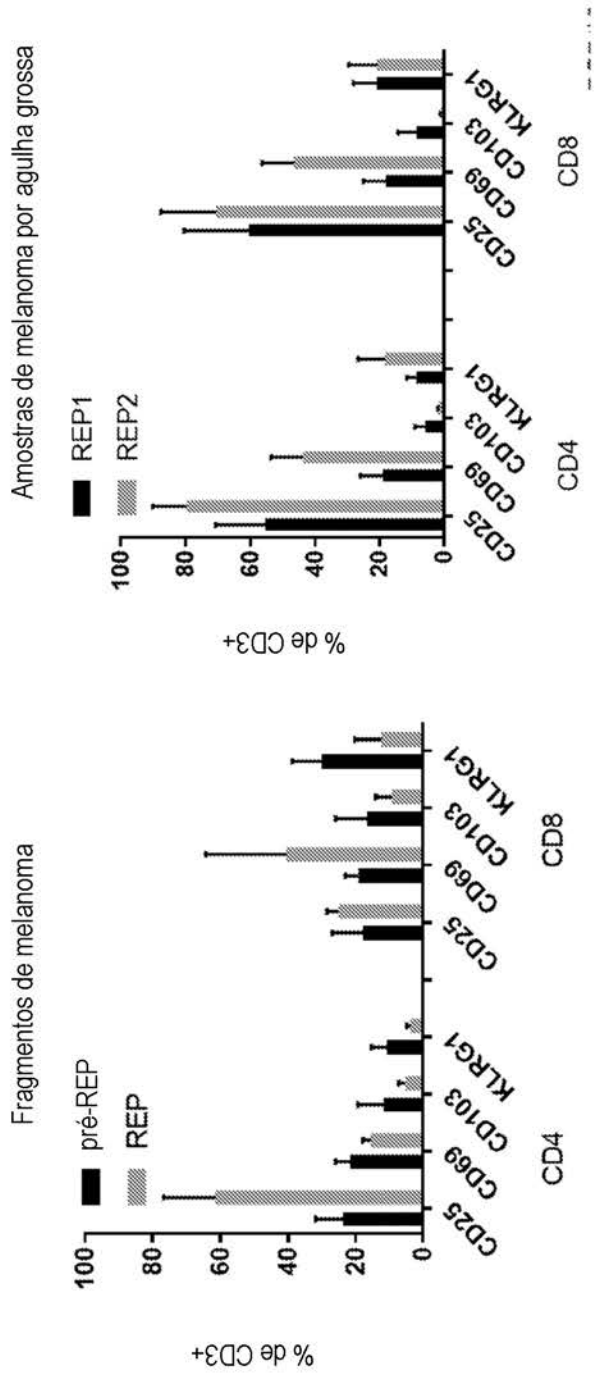

Amostras de melanoma por agulha grossa
REP1
REP2
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD8
Fragmentos de melanoma
pré-REP
REP
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD8

Figura 64

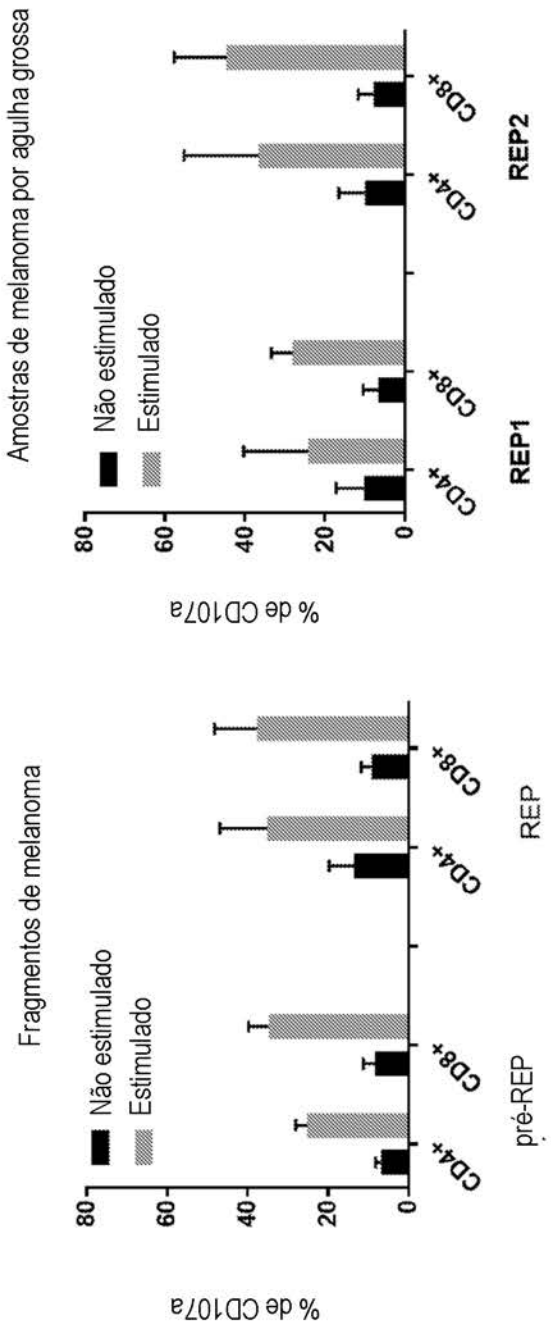

Amostras de melanoma por agulha grossa
Não estimulado
Estimulado
% de CD107a
0
20
40
60
80
CD4+
CD8+
CD4+
CD8+
REP1
REP2
Fragmentos de melanoma
Não estimulado
Estimulado
% de CD107a
0
20
40
60
80
CD4+
CD8+
CD4+
CD8+
pré-REP
REP

Figura 65

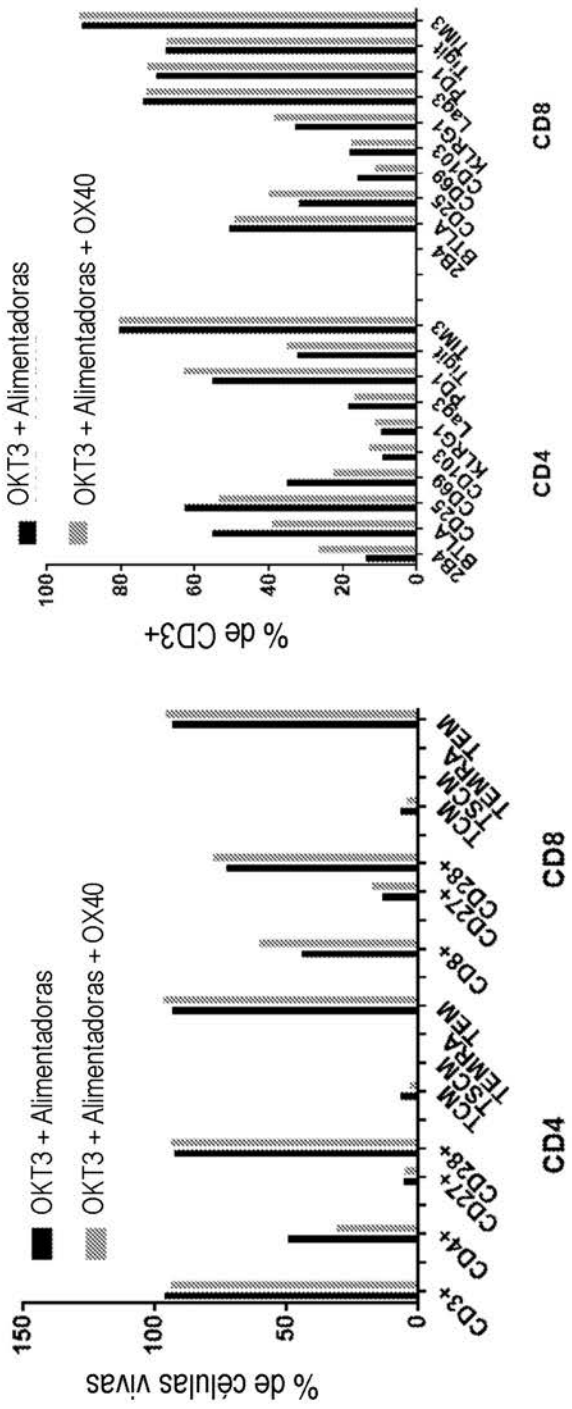

OKT3 + Alimentadoras
OKT3 + Alimentadoras + OX40
% de células vivas
150
100
50
0
CD3+
CD4+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4
CD8
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
LAG3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
CD8

Figura 66

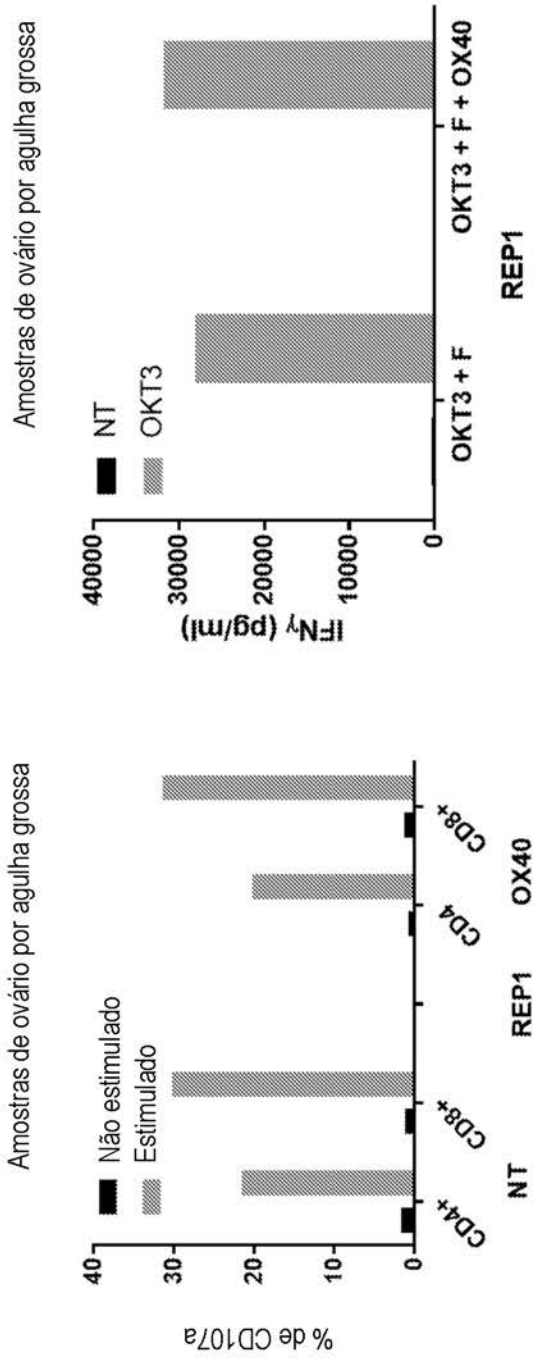

Amostras de ovário por agulha grossa
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
OKT3 + F
OKT3 + F + OX40
REP1
Amostras de ovário por agulha grossa
Não estimulado
Estimulado
% de CD107a
40
30
20
10
0
CD4+
CD8+
CD4
CD8+
NT
REP1
OX40

Figura 67

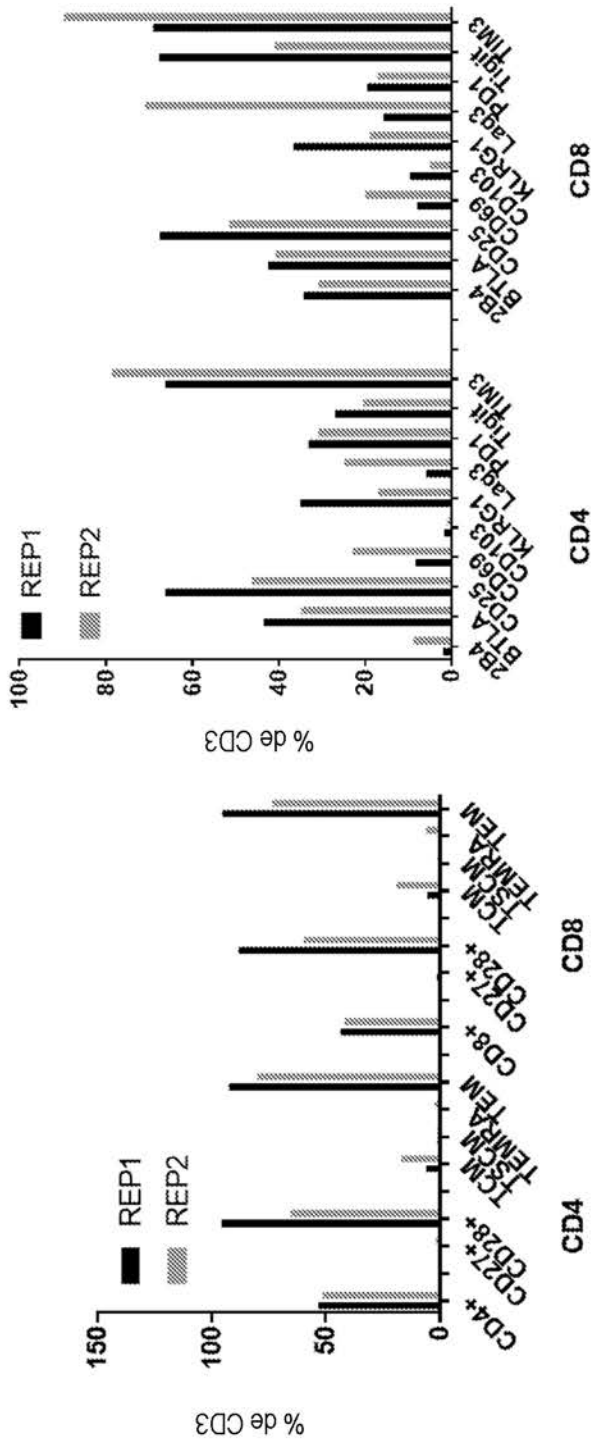

REP1
REP2
% de CD3
150
100
50
0
CD4+
CD27+ CD28+
TCM TSCM TEMRA TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM TSCM TEMRA TEM
CD4
CD8
100
80
60
40
20
0
2B4 BTLA CD25 CD69 CD103 KLRG1 Lag3 PD1 Tigit TIM3
2B4 BTLA CD25 CD69 CD103 KLRG1 Lag3 PD1 Tigit TIM3
CD4
CD8

Figura 68

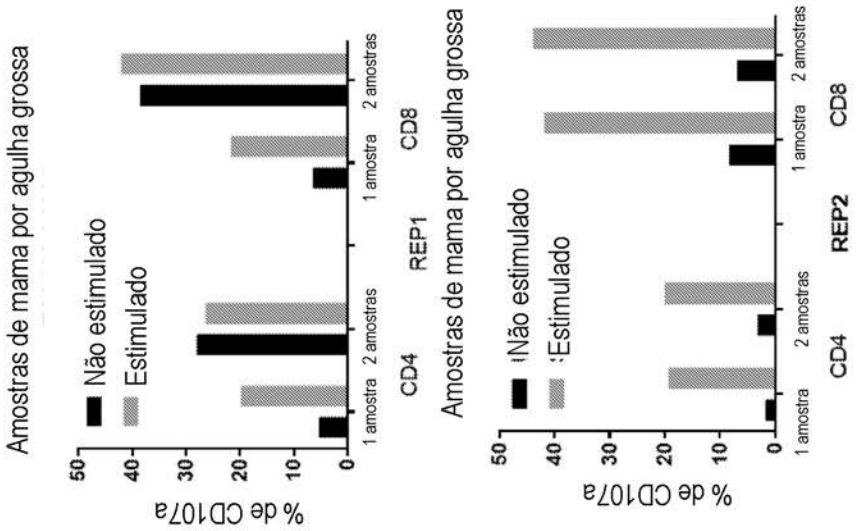


Figura 69A e 69B

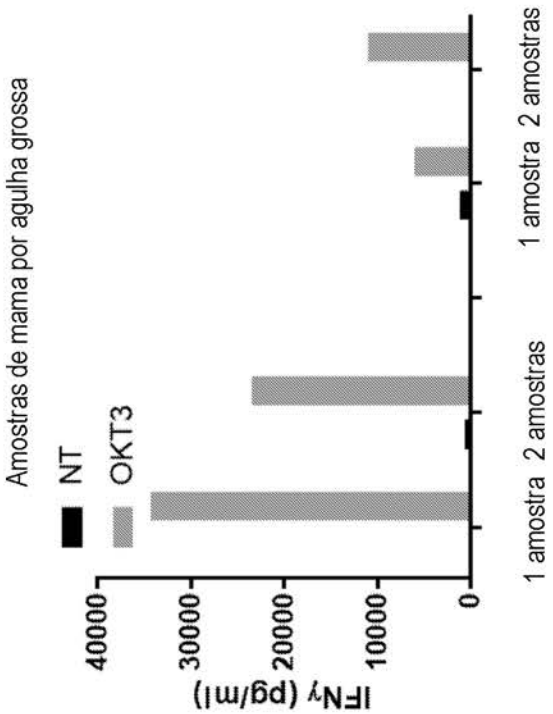

Amostras de mama por agulha grossa
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
1 amostra
2 amostras
1 amostra
2 amostras
REP1
REP2

Figura 69C

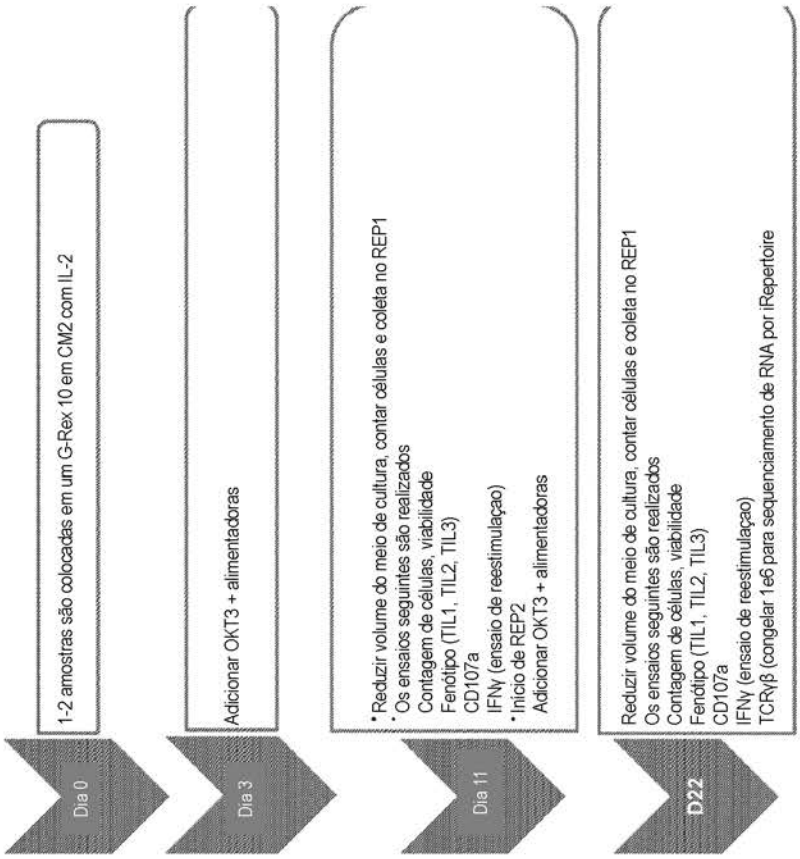

Dia 0
1-2 amostras são colocadas em um G-Rex 10 em CM2 com IL-2
Dia 3
Adicionar OKT3 + alimentadoras
Dia 11
• Reduzir volume do meio de cultura, contar células e coleta no REP1
• Os ensaios seguintes são realizados
Contagem de células, viabilidade
Fenótipo (TIL1, TIL2, TIL3)
CD107a
IFNγ (ensaio de reestimulaçao)
• Início de REP2
Adicionar OKT3 + alimentadoras
D22
Reduzir volume do meio de cultura, contar células e coleta no REP1
Os ensaios seguintes são realizados
Contagem de células, viabilidade
Fenótipo (TIL1, TIL2, TIL3)
CD107a
IFNγ (ensaio de reestimulaçao)
TCRγβ (congelar 1e6 para sequenciamento de RNA por iRepertoire

Figura 70

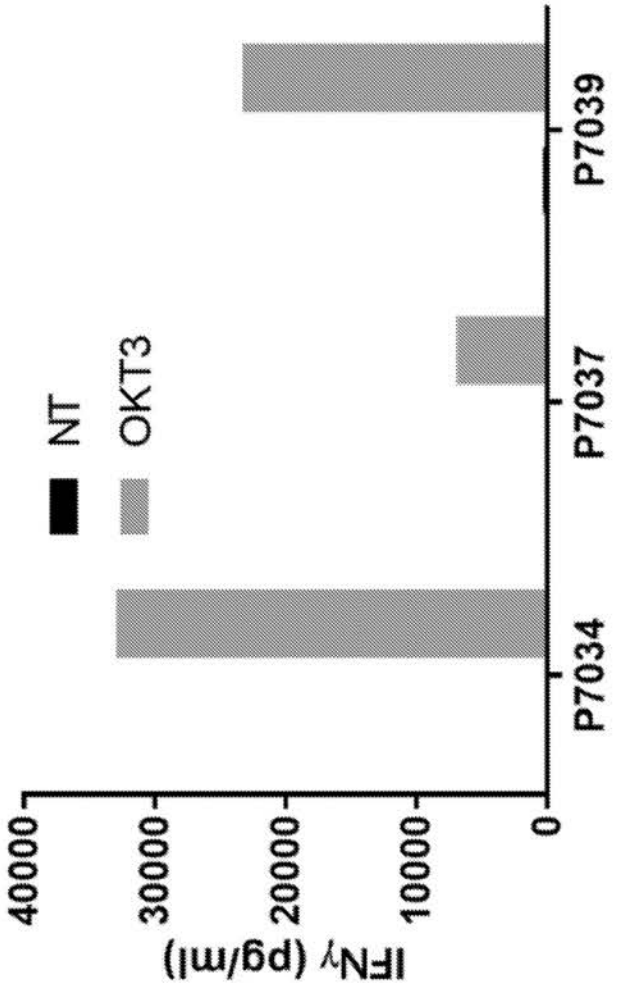
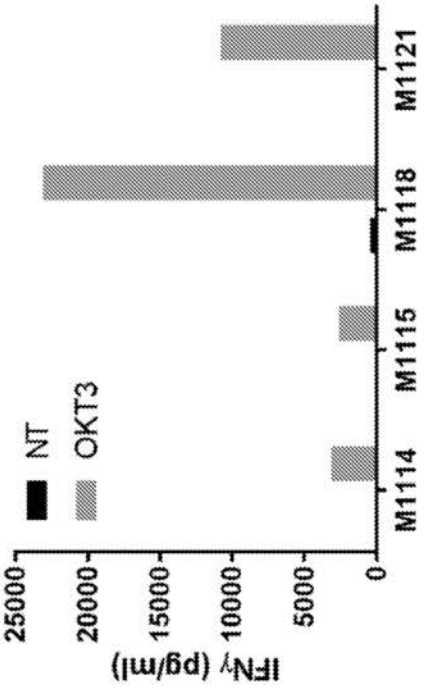

NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
P7034
P7037
P7039

Figura 71


IFNγ (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
NT
OKT3
M1114
M1115
M1118
M1121

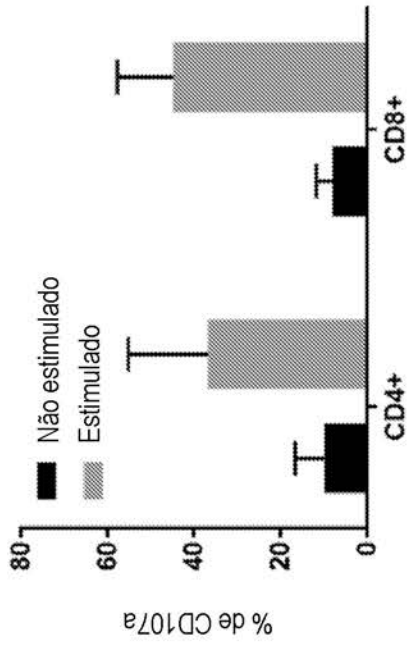

% de CD107a
80
60
40
20
0
Não estimulado
Estimulado
CD4+
CD8+

Figura 72

Figura 73A

	Condições da cultura	Amostras por agulha grossa/ cond. (nº)	REP1	REP2
Mama (EP11028)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	1 versus 2	**>50E6 células** no Dia 11 (2 amostras)	**173 e 158 vezes** de expansão (1/2 amostras) **IFNγ ~34.000 e 23.000 pg/mL**
Mama (EP11045)	REP1: IL-2 (+/- OKT3 – alimentadoras) REP2: IL-2 (OKT3 + alimentadoras)	2	**>50E6 células** no Dia 11 (OKT3 + alimentadoras)	**1178 e 1920 vezes** de expansão (+/- OKT3 + alimentadoras) **IFNγ ~99.000 e 45.000 pg/mL**
Ovariano (OV8016)	REP1: IL-2 +/- OX40 REP2: IL-2 +/- OX40	2	**>50E6 células** no Dia 11 (condição com OX40)	**1860 e 1540 vezes** de expansão (SEM OX40/OX40) **IFNγ ~10.000 e 20.000 pg/mL**
Ovariano (OV8031)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	1 (amostra pequena)	1,3e6 células no Dia 11	**400 vezes** de expansão **~ELISA está em curso**

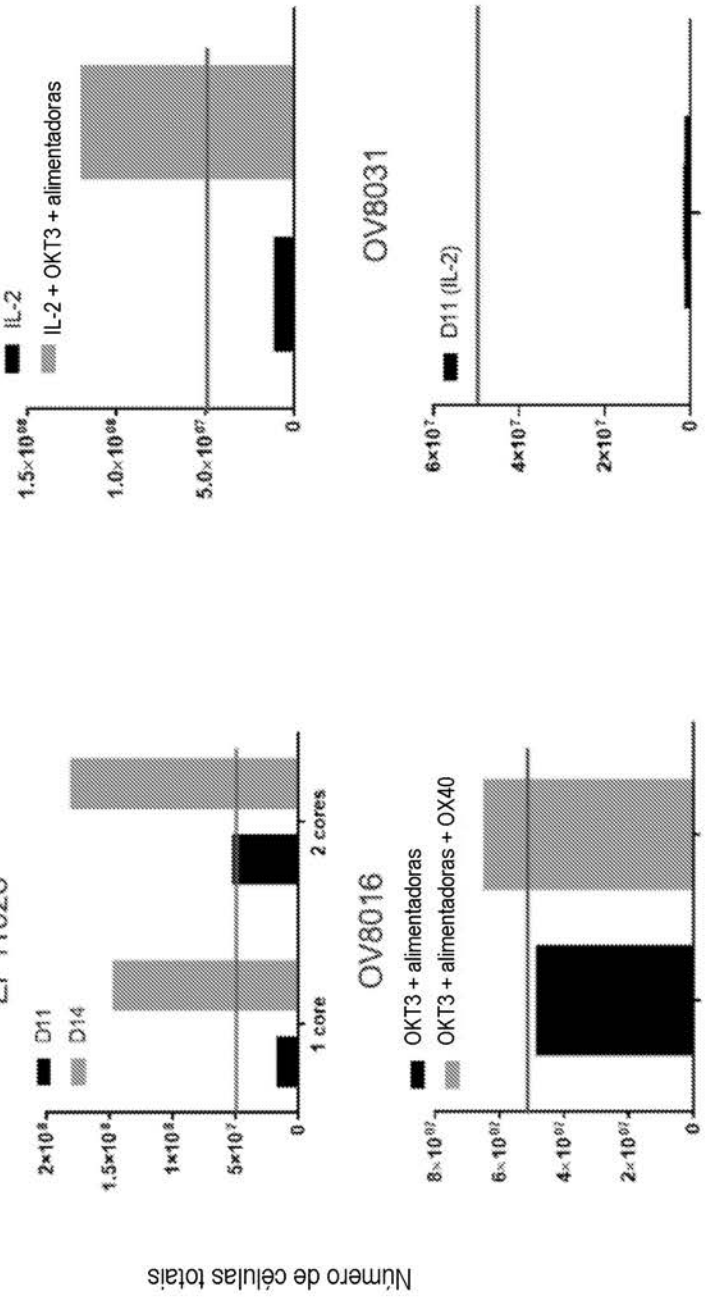

EP11028
D11
D14
2×10⁸
1.5×10⁸
1×10⁸
5×10⁷
0
1 core
2 cores
EP11045
IL-2
IL-2 + OKT3 + alimentadoras
1.5×10⁸
1.0×10⁸
5.0×10⁷
0
OV8016
OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
OV8031
D11 (IL-2)
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
Número de células totais

Figura 73B

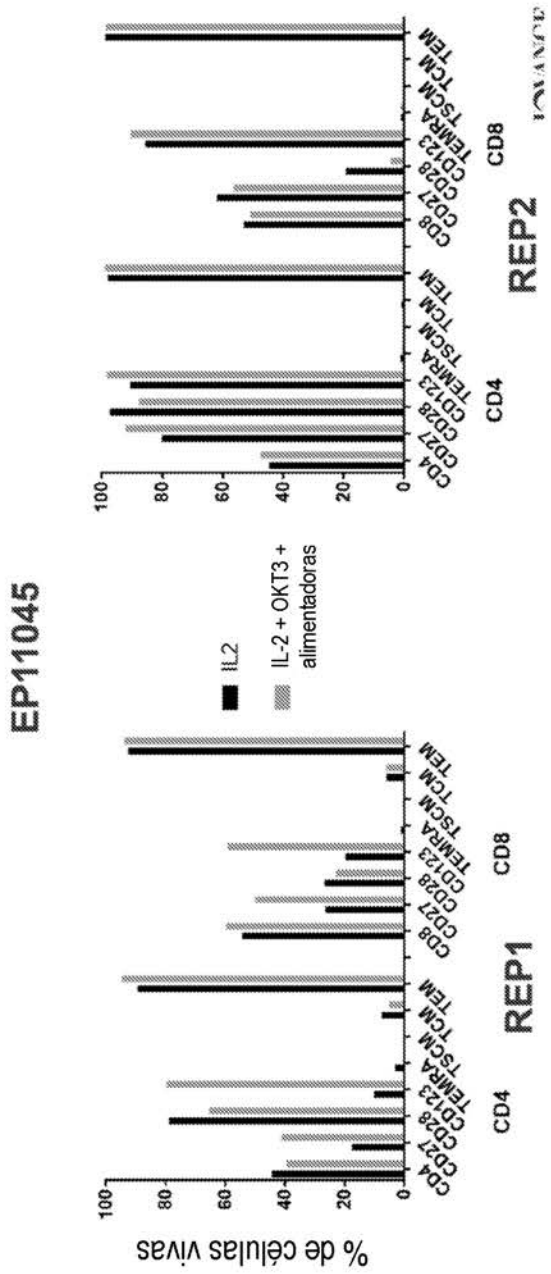

EP11045
IL2
IL-2 + OKT3 + alimentadoras
% de células vivas
100
80
60
40
20
0
CD4
CD27
CD28
CD123
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
CD8
REP1
REP2

Figura 74

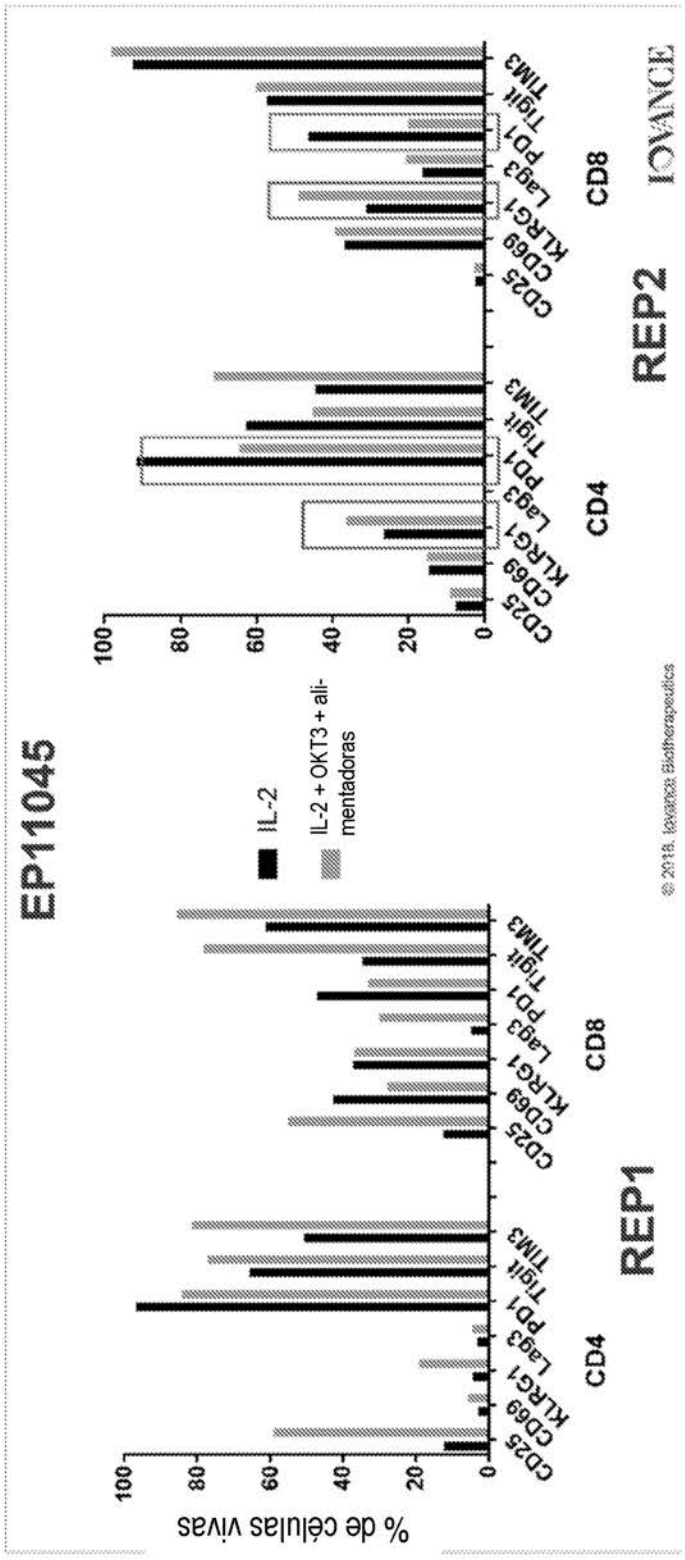

EP11045
% de células vivas
100
80
60
40
20
0
CD25
CD69
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
CD8
REP1
REP2
IL-2
IL-2 + OKT3 + ali-mentadoras
IOVANCE
© 2018, Iovance Biotherapeutics

Figura 75

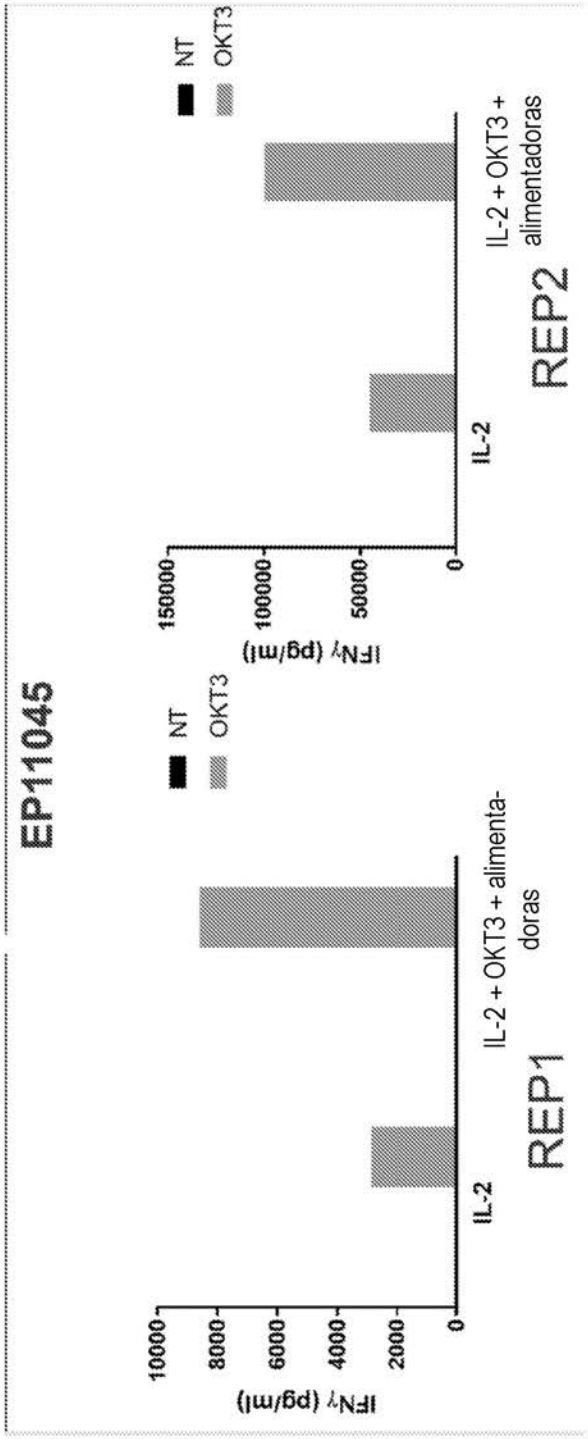

EP11045
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
IL-2
IL-2 + OKT3 + alimenta-doras
REP1
150000
100000
50000
0
IL-2 + OKT3 + alimentadoras
REP2

Figura 76

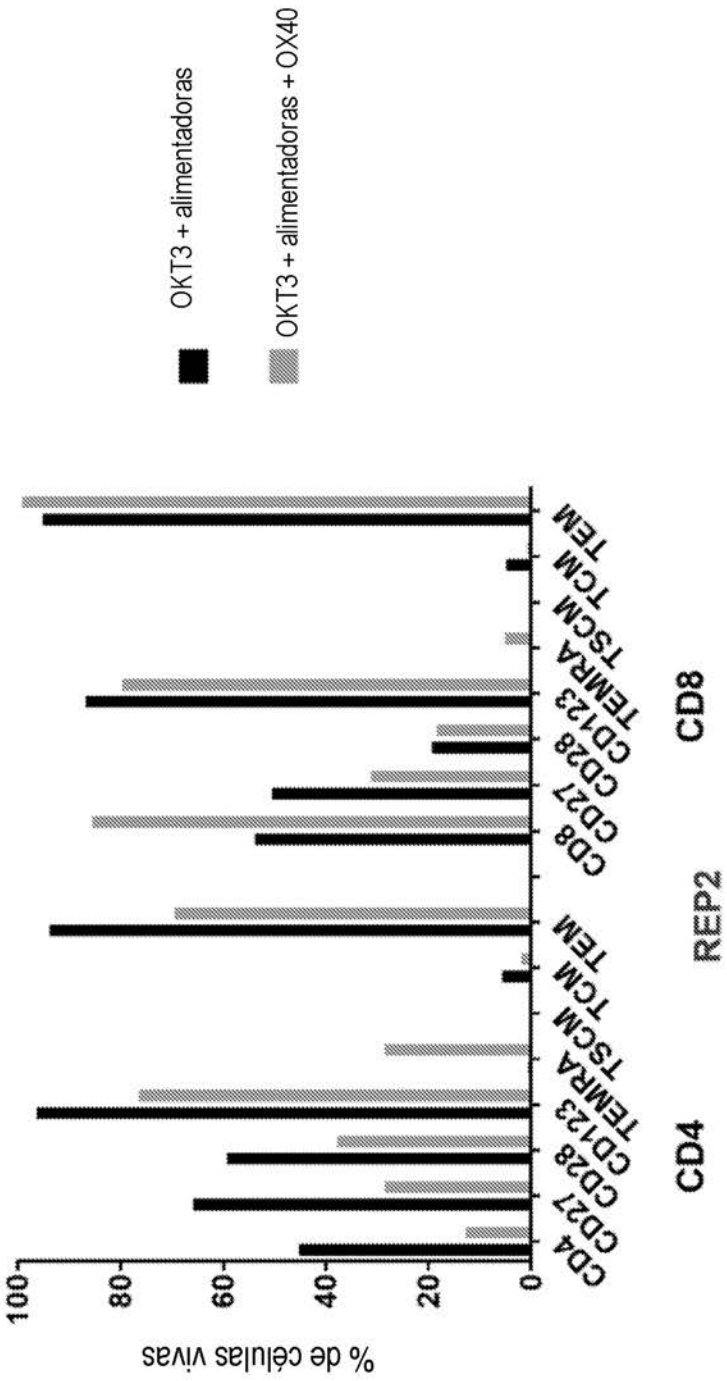

OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
% de células vivas
100
80
60
40
20
0
CD4
CD27
CD28
CD123
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
CD8
CD27
CD28
CD123
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
CD4
CD8
REP2

Figura 77

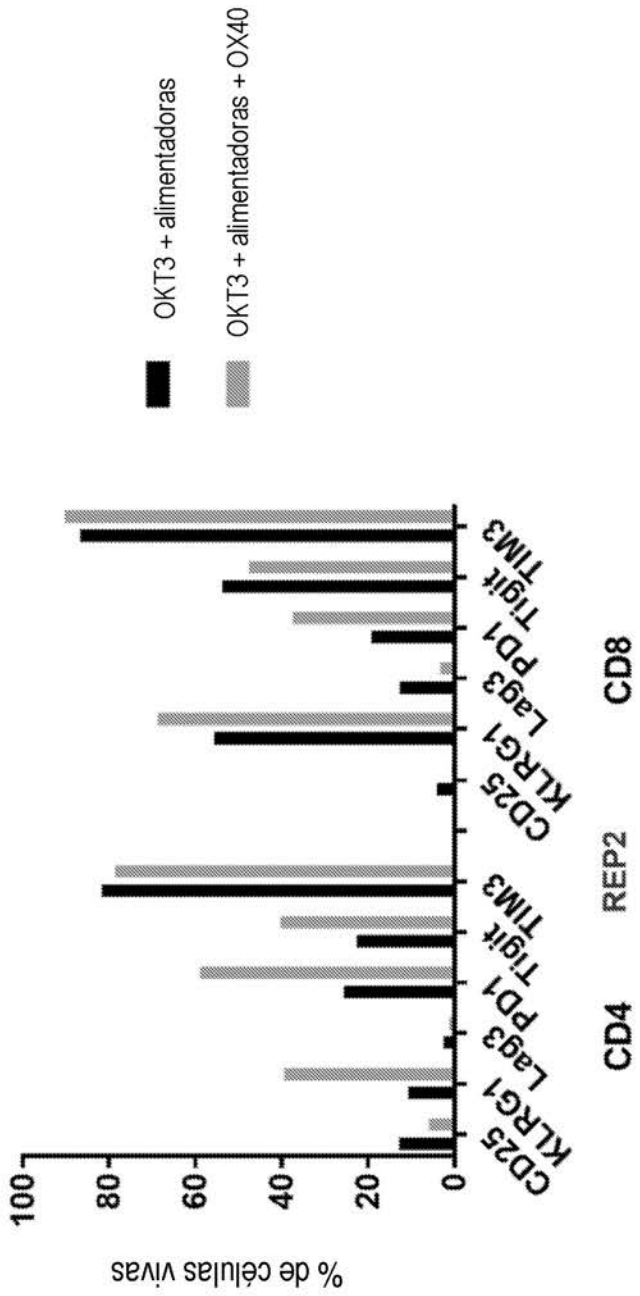

OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
% de células vivas
100
80
60
40
20
0
CD25
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
REP2
CD25
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD8

Figura 78

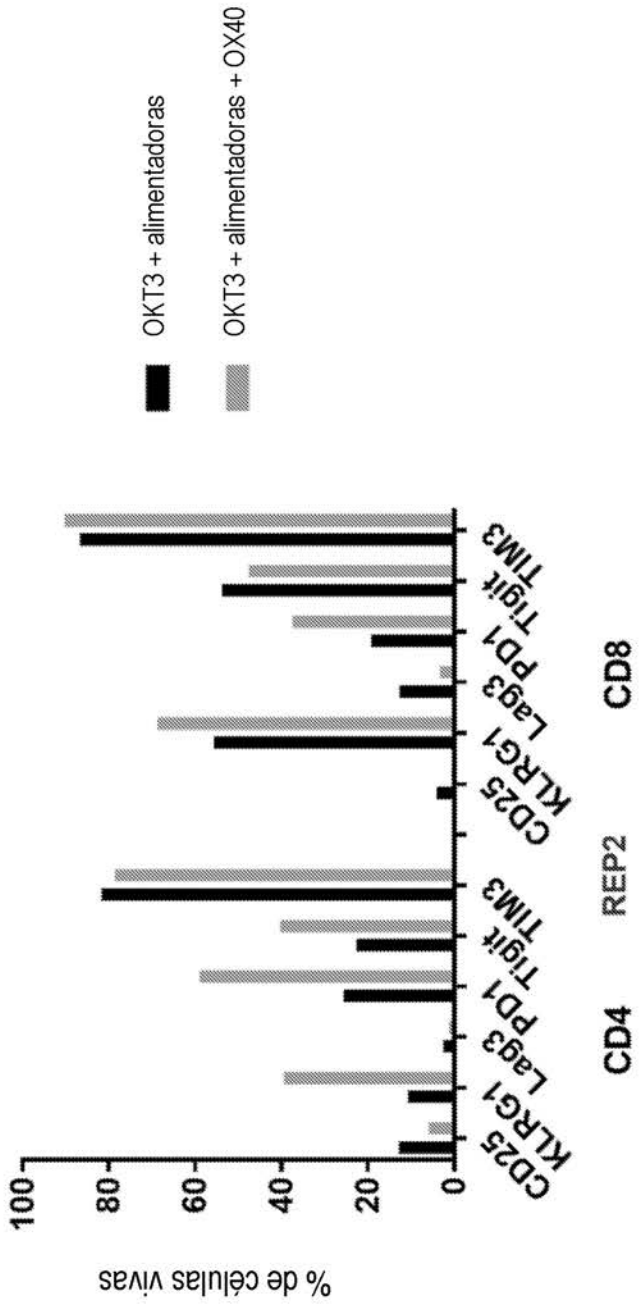

OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
% de células vivas
100
80
60
40
20
0
CD25
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
REP2
CD25
KLRG1
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD8

Figura 78

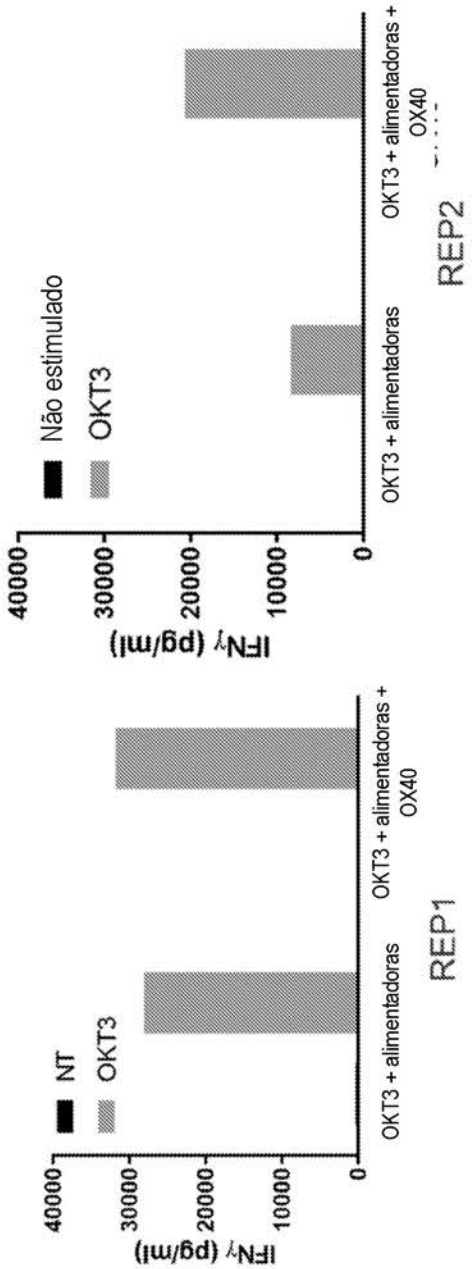

NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
REP1
Não estimulado
OKT3
IFNγ (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
REP2

Figura 79

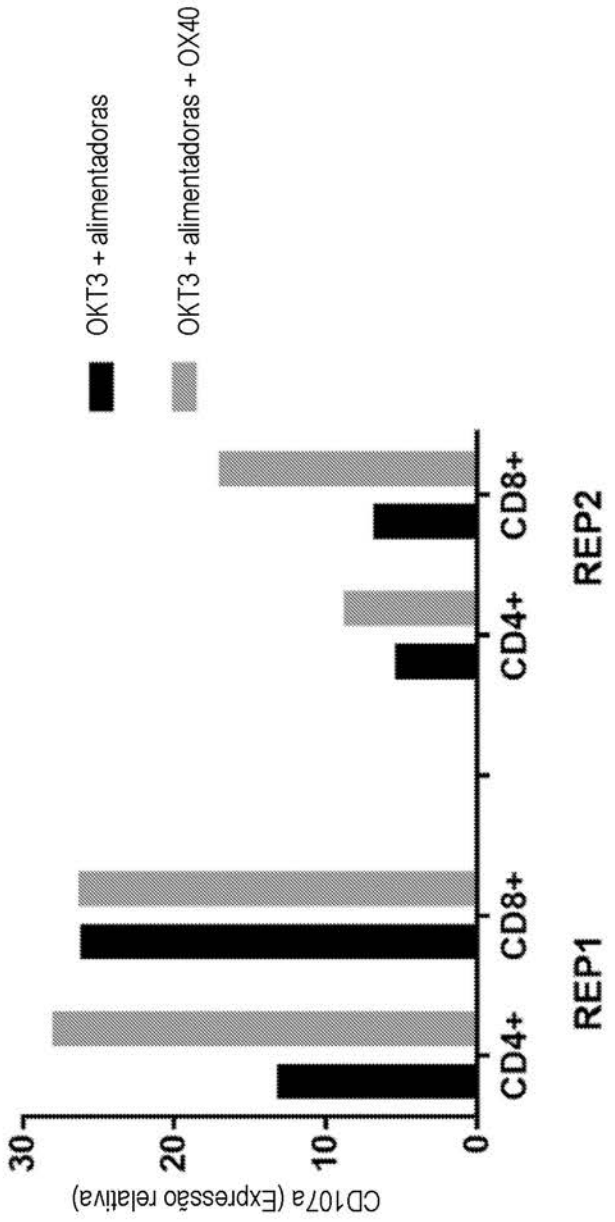

OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40
CD107a (Expressão relativa)
30
20
10
0
CD4+
CD8+
CD4+
CD8+
REP1
REP2

Figura 80

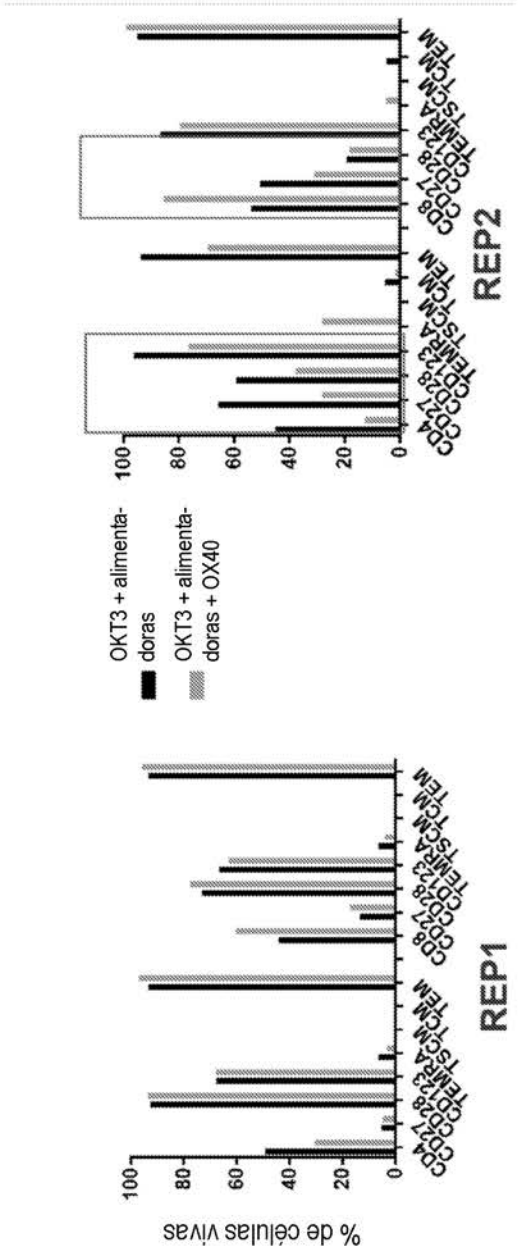

% de células vivas
100
80
60
40
20
0
CD4
CD27
CD28
CD127
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
CD8
CD27
CD28
CD127
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
REP1
REP2
OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40

Figura 81

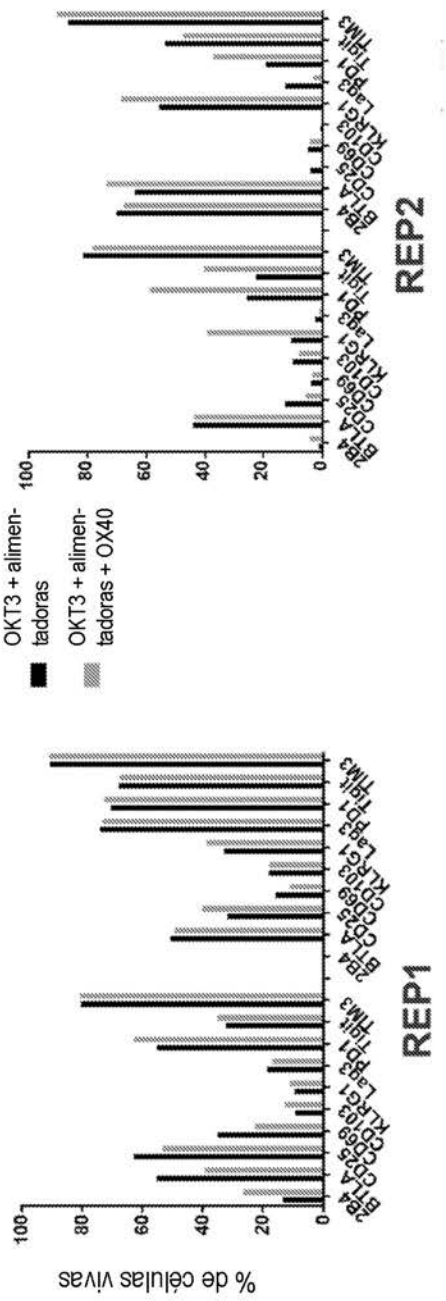

% de células vivas
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3
REP1
REP2
OKT3 + alimentadoras
OKT3 + alimentadoras + OX40

Figura 82

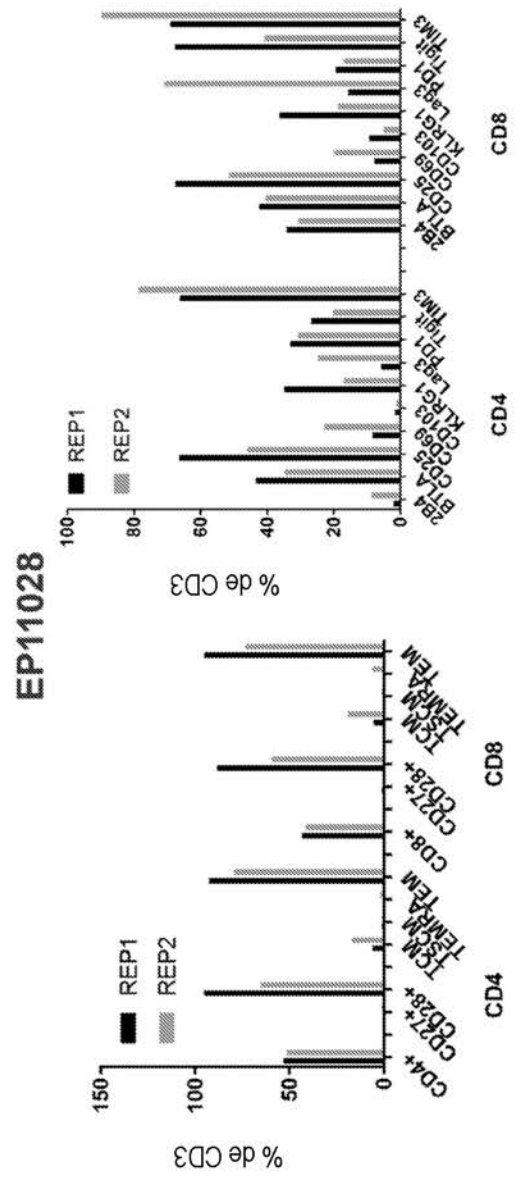

EP11028
% de CD3
REP1
REP2
150
100
50
0
CD4+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4
CD8
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3
CD4
CD8

Figura 83

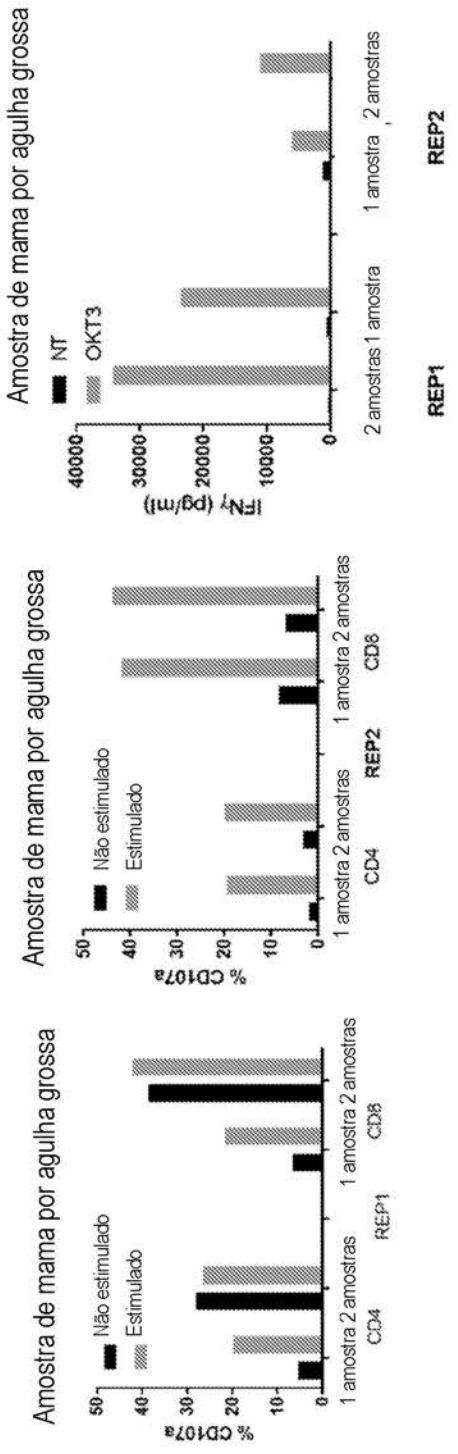

EP11028
Amostra de mama por agulha grossa
Não estimulado
Estimulado
% CD107a
1 amostra 2 amostras
1 amostra 2 amostras
CD4
CD8
REP1
Amostra de mama por agulha grossa
Não estimulado
Estimulado
% CD107a
1 amostra 2 amostras
1 amostra 2 amostras
CD4
CD8
REP2
Amostra de mama por agulha grossa
NT
OKT3
IFNγ (pg/ml)
2 amostras 1 amostra
1 amostra 2 amostras
REP1
REP2

Figura 84

Figura 85A

Processo 2A: aproximadamente 22 dias das Etapas A – E	Processo GEN 3: aproximadamente 14 dias das Etapas A – E
ETAPA A Obter amostra do tumor do paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B)	**ETAPA A** Obter amostra do tumor do paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B)
ETAPA B Primeira expansão (Fragmentação física em pelo menos 40 fragmentos por recipiente, cultivados por aproximadamente 3 dias a 14 dias com meio compreendendo IL-2)	**ETAPA B** Primeira expansão (Fragmentação física em até 40 fragmentos por recipiente, cultivados por aproximadamente 1 dia a 7 dias com meio compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno)
ETAPA C Transição da primeira expansão para segunda expansão (TILs da Etapa B encaminhados diretamente para Etapa D, opcionalmente no dia 11 da Etapa B)	**ETAPA C** Transição da primeira expansão para segunda expansão (TILs da Etapa B encaminhados diretamente para Etapa D no dia 7)
ETAPA D Segunda expansão (TILs cultivados em meio de crescimento compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno em um recipiente fechado)	**ETAPA D** Segunda expansão (TILs cultivados em meio de crescimento compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno; escalonamento vertical Dia 10-11 e adicionar mais IL-2)
ETAPA E Coleta de TILS da Etapa D (TILs coletados via sistema fechado	**ETAPA E** Coleta de TILS da Etapa D
ETAPA F Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)	**ETAPA F** Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)

Figura 85B

Processo GEN 3 para pequena biópsia: aproximadamente 17-24 dias das Etapas A – E

ETAPA A

Obter amostra do tumor do paciente
(opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B)

ETAPA B

Primeira expansão
(Fragmentação física em até 40 fragmentos por recipiente, cultivados por aproximadamente 1 dia a 7 dias com meio compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno)

ETAPA C

Transição da primeira expansão para segunda expansão
(TILs da Etapa B encaminhados diretamente para Etapa D no dia 7)

ETAPA D

Segunda expansão
(TILs cultivados em meio de crescimento compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno; escalonamento vertical Dia 10-11 e adicionar mais IL-2)

ETAPA E

Coleta de TILS da Etapa D

ETAPA F

Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão
(opcionalmente crioconservação)

Figura 85C

Processo para pequena biópsia: Versão 2 (Processo baseado em GEN3) **Aproximadamente 17-24 dias das Etapas A - E**
Etapa A Obter amostra de tumor do paciente
Etapa B Primeira expansão 3 dias a 12 dias (com OKT-33 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno em qualquer um dos dias 1-3
Etapa C Transição da primeira expansão para a segunda expansão Sem armazenamento e opcionalmente sistema fechado
Etapa D Segunda expansão IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno 3 a12 dias Opcionalmente sistema fechado
Etapa E Coleta de TILs da Etapa D Sistema fechado
Etapa F Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente crioconservação)

Figura 86

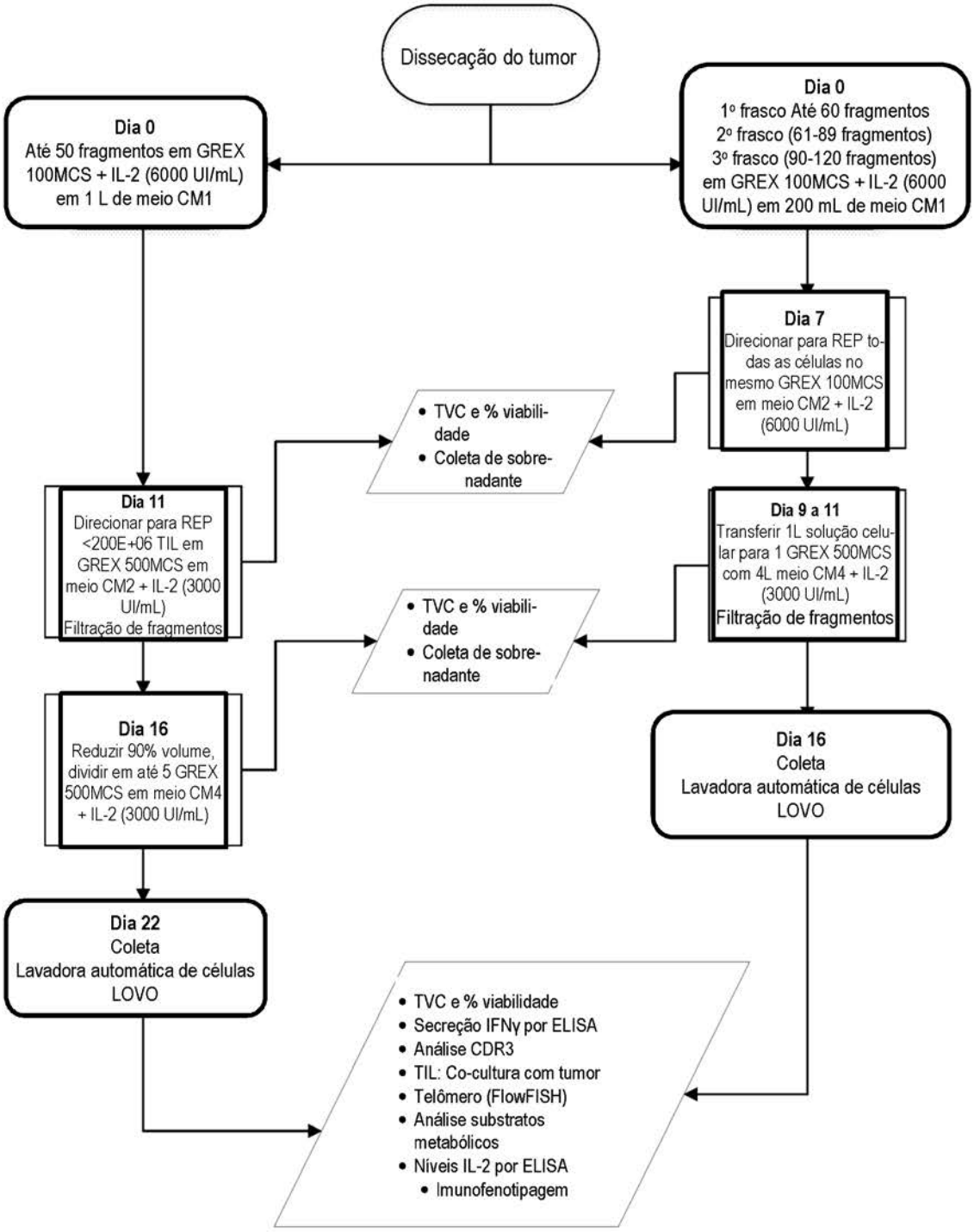
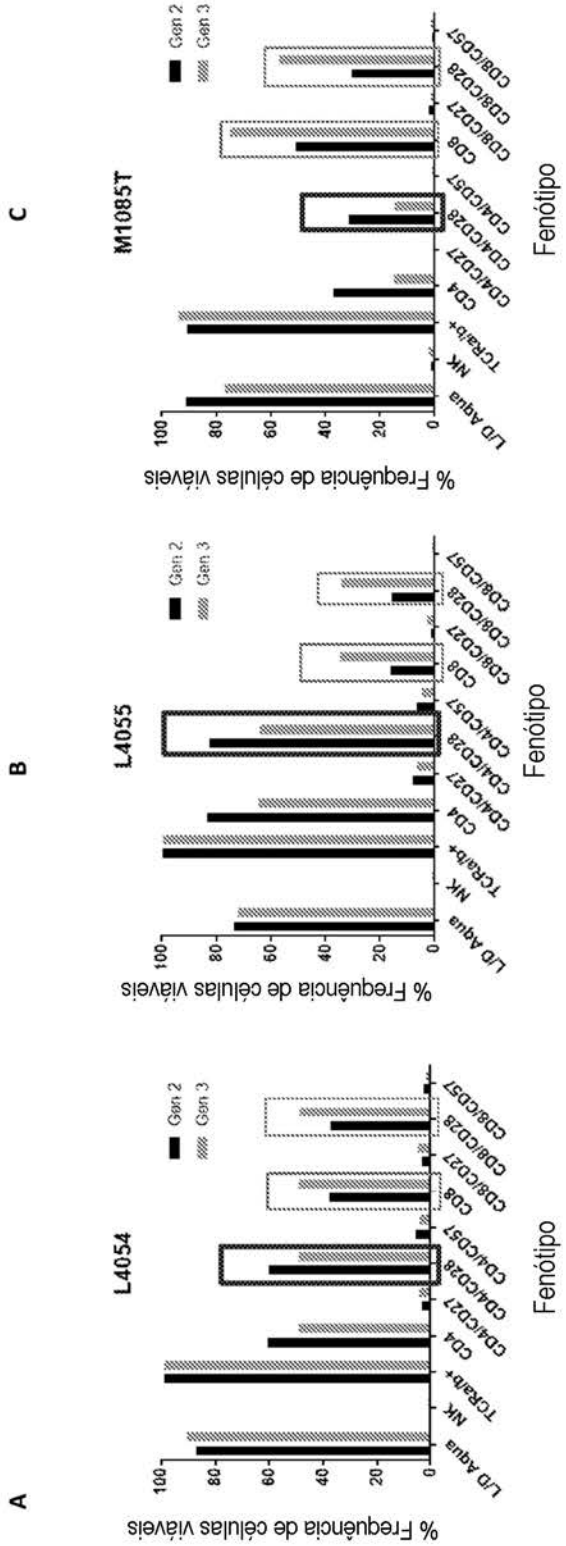

Dissecação do tumor
Dia 0
Até 50 fragmentos em GREX 100MCS + IL-2 (6000 UI/mL) em 1 L de meio CM1
Dia 0
1º frasco Até 60 fragmentos
2º frasco (61-89 fragmentos)
3º frasco (90-120 fragmentos)
em GREX 100MCS + IL-2 (6000 UI/mL) em 200 mL de meio CM1
Dia 7
Direcionar para REP todas as células no mesmo GREX 100MCS em meio CM2 + IL-2 (6000 UI/mL)
• TVC e % viabilidade
• Coleta de sobrenadante
Dia 11
Direcionar para REP <200E+06 TIL em GREX 500MCS em meio CM2 + IL-2 (3000 UI/mL)
Filtração de fragmentos
Dia 9 a 11
Transferir 1L solução celular para 1 GREX 500MCS com 4L meio CM4 + IL-2 (3000 UI/mL)
Filtração de fragmentos
• TVC e % viabilidade
• Coleta de sobrenadante
Dia 16
Reduzir 90% volume, dividir em até 5 GREX 500MCS em meio CM4 + IL-2 (3000 UI/mL)
Dia 16
Coleta
Lavadora automática de células LOVO
Dia 22
Coleta
Lavadora automática de células LOVO
• TVC e % viabilidade
• Secreção IFNγ por ELISA
• Análise CDR3
• TIL: Co-cultura com tumor
• Telômero (FlowFISH)
• Análise substratos metabólicos
• Níveis IL-2 por ELISA
• Imunofenotipagem

Figura 87



ID do tumor	L4054		L4055		M1085T	
Processo	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Nº de fragmentos	21	21	24	24	16	16

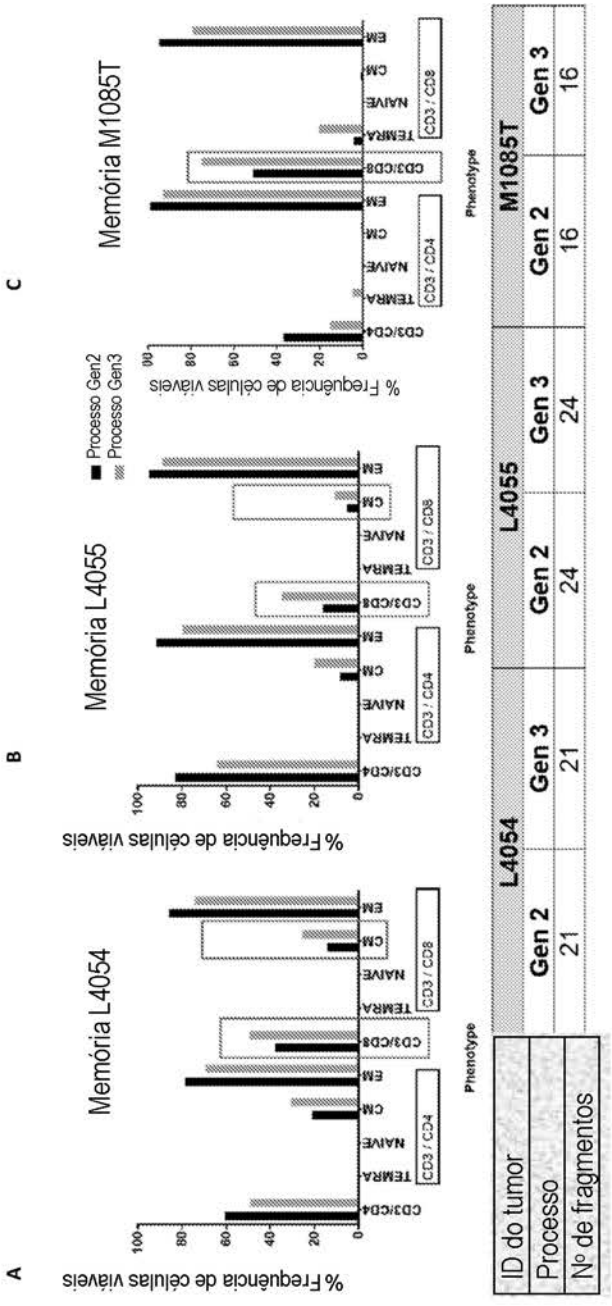
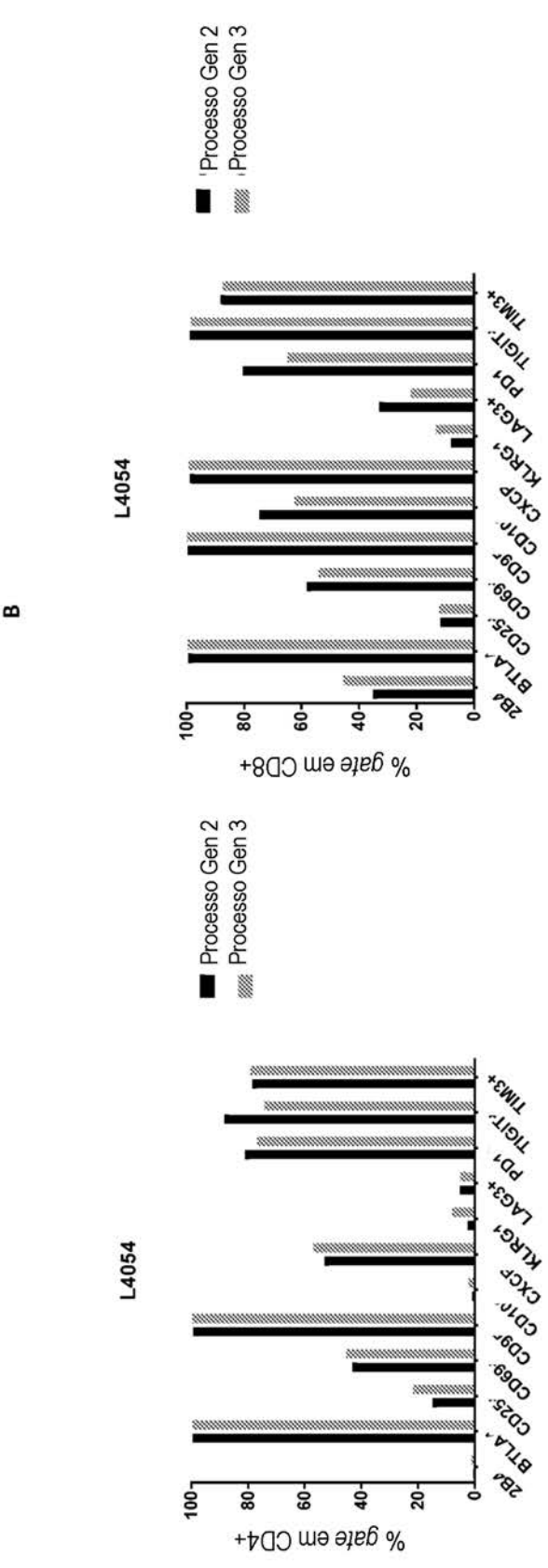

A
Memória L4054
% Frequência de células viáveis
CD3/CD4
TEMRA
NAIVE
CM
EM
CD3/CD8
CD3 / CD4
CD3 / CD8
Phenotype
B
Memória L4055
Processo Gen2
Processo Gen3
C
Memória M1085T
ID do tumor
Processo
Nº de fragmentos
L4054
L4055
M1085T
Gen 2
Gen 3
21
24
16

Figura 88

Figura 89


A
L4054
% gate em CD4+
100
80
60
40
20
0
2Bα
BTLA+
CD25+
CD69+
CD9r
CD1r
CXCP
KLRG1
LAG3+
PD1
TIGIT+
TIM3+
Processo Gen 2
Processo Gen 3
B
L4054
% gate em CD8+
100
80
60
40
20
0
2Bα
BTLA+
CD25+
CD69+
CD9r
CD1r
CXCP
KLRG1
LAG3+
PD1
TIGIT+
TIM3+
Processo Gen 2
Processo Gen 3

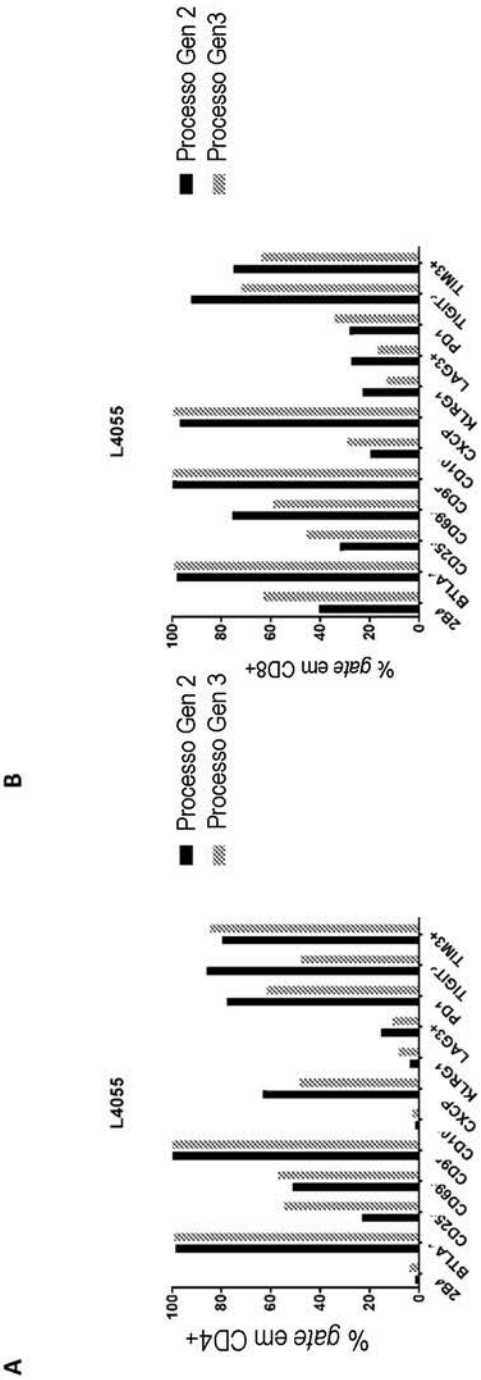

A
L4055
% gate em CD4+
100
80
60
40
20
0
2Bd
BTLA-
CD25-
CD69-
CD9r
CD1r
CXCP
KLRG1
LAG3+
PD1
TIGIT-
TIM3+
B
L4055
% gate em CD8+
Processo Gen 2
Processo Gen3
Processo Gen 2
Processo Gen 3

Figura 90

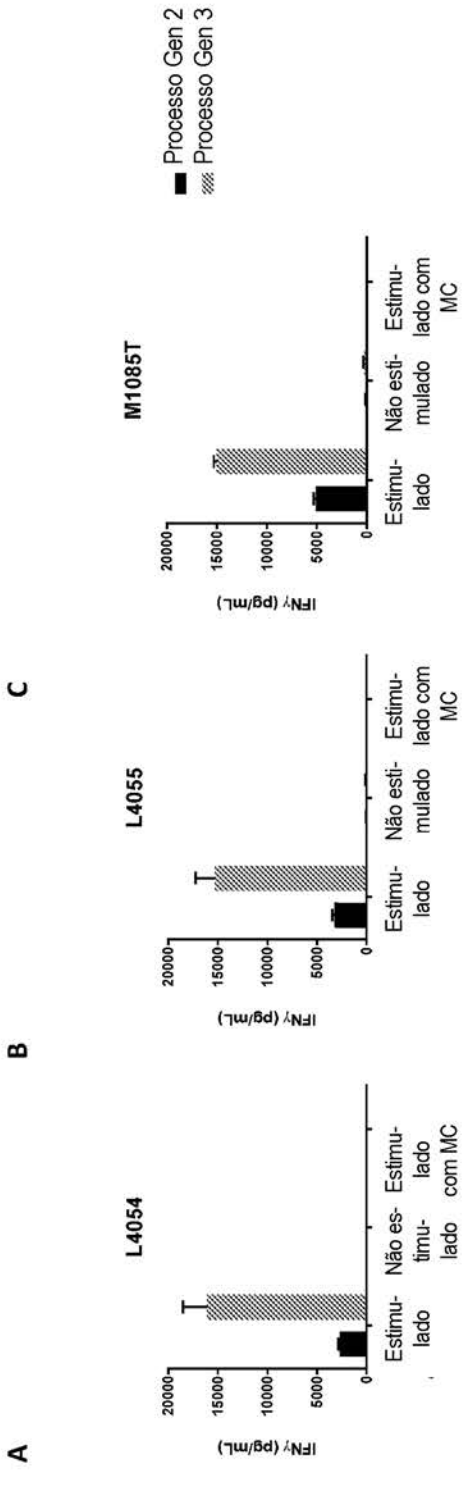

A
L4054
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Estimu-lado
Não es-timu-lado
Estimu-lado com MC
B
L4055
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Estimu-lado
Não esti-mulado
Estimu-lado com MC
C
M1085T
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Estimu-lado
Não esti-mulado
Estimu-lado com MC
Processo Gen 2
Processo Gen 3

Figura 91

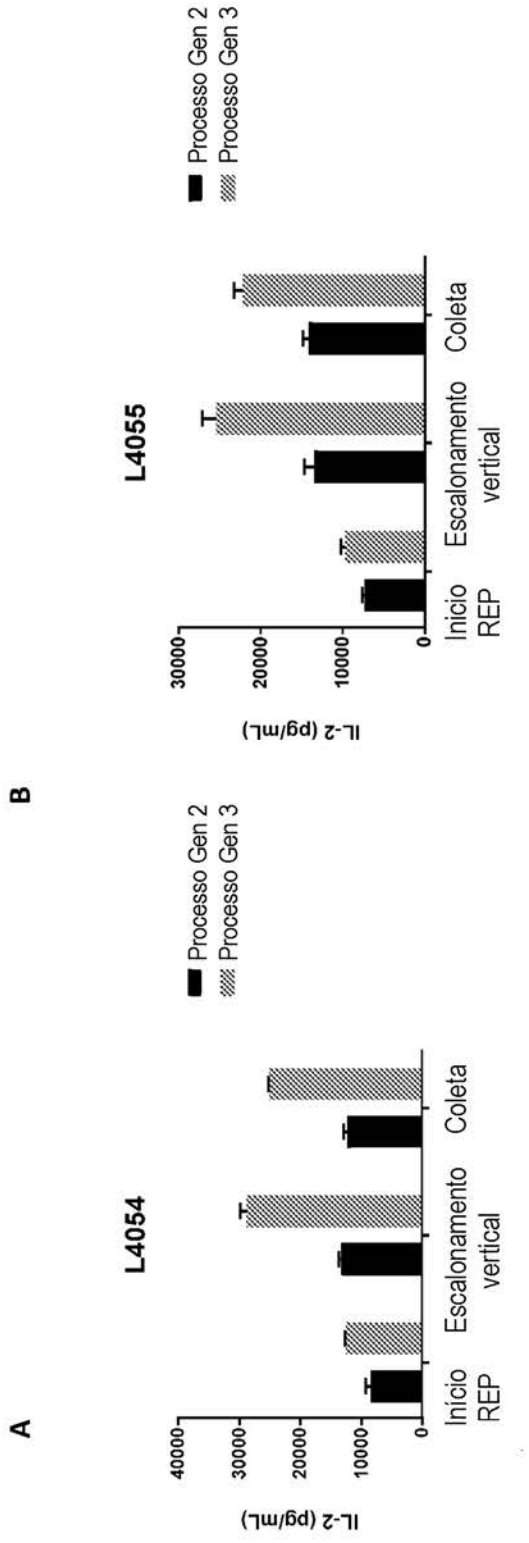

A
L4054
IL-2 (pg/mL)
40000
30000
20000
10000
0
Início REP
Escalonamento vertical
Coleta
Processo Gen 2
Processo Gen 3
B
L4055
IL-2 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
Início REP
Escalonamento vertical
Coleta
Processo Gen 2
Processo Gen 3

Figura 92

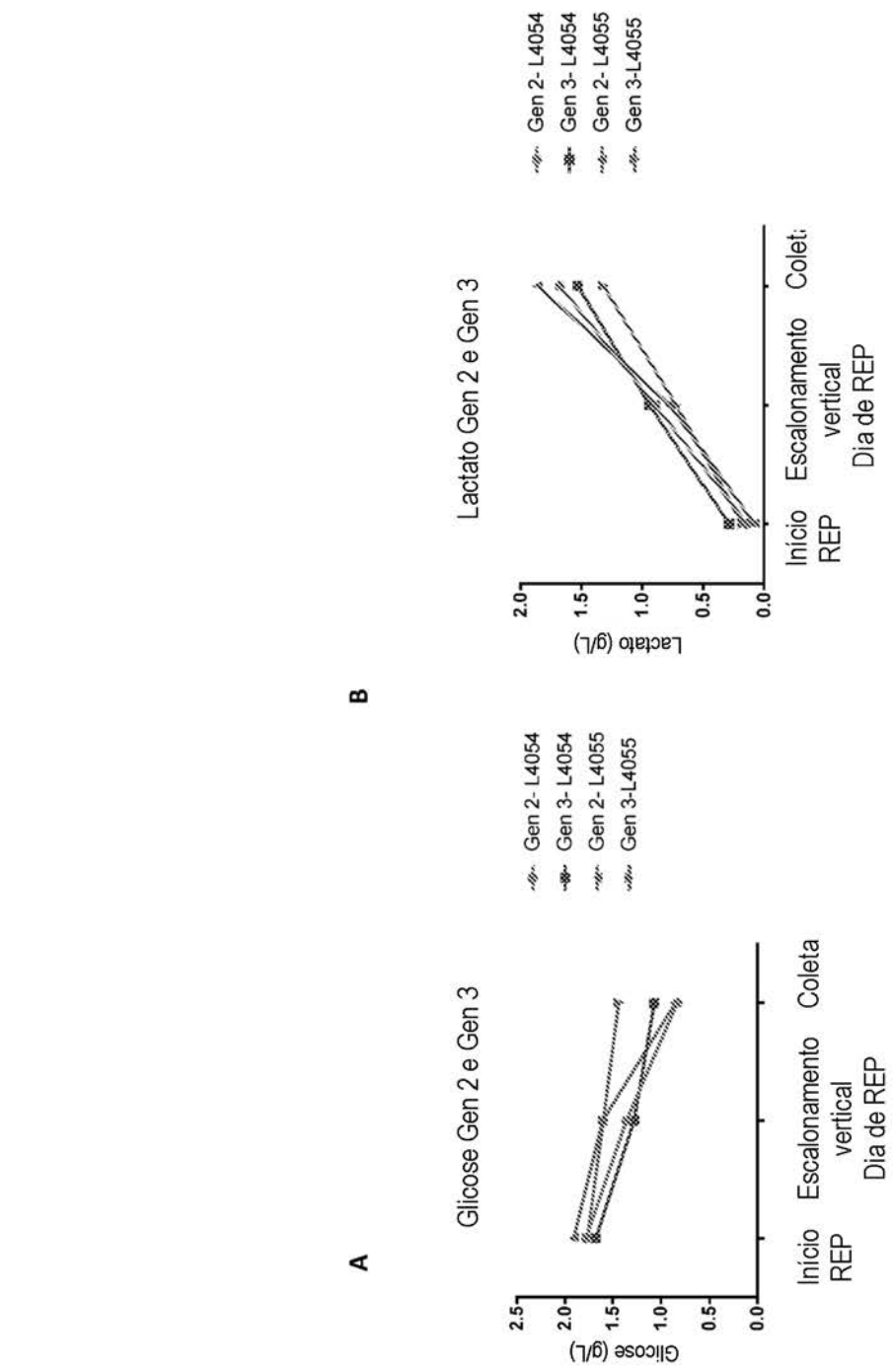
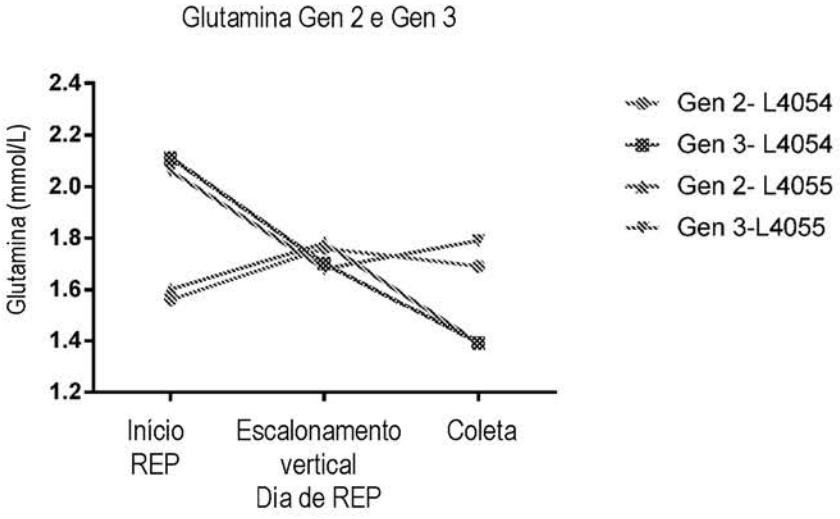
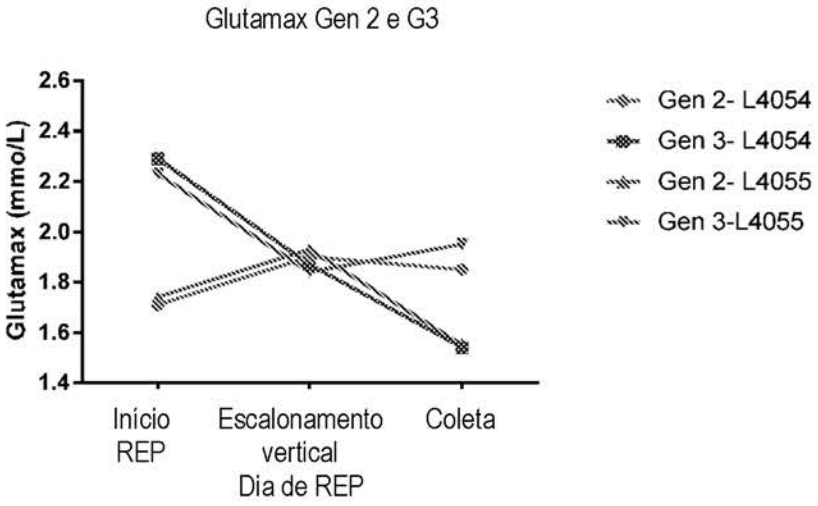

A
Glicose Gen 2 e Gen 3
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055
Glicose (g/L)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Início REP
Escalonamento vertical
Coleta
Dia de REP
B
Lactato Gen 2 e Gen 3
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055
Lactato (g/L)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Início REP
Escalonamento vertical
Coleta
Dia de REP

Figura 93

Figura 94

A


Glutamina Gen 2 e Gen 3
Glutamina (mmol/L)
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
Início REP
Escalonamento vertical
Coleta
Dia de REP
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055


Glutamax Gen 2 e G3
Glutamax (mmo/L)
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
Início REP
Escalonamento vertical
Coleta
Dia de REP
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055

B

Figura 94

C

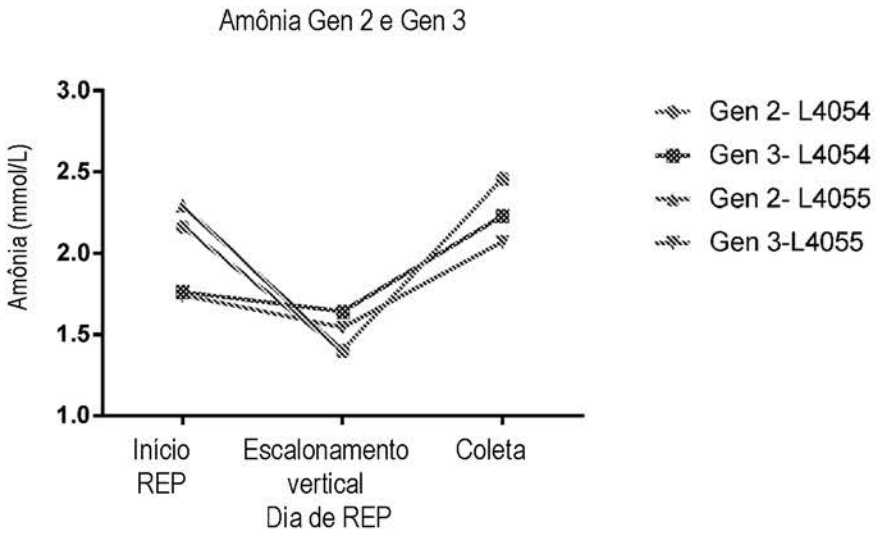

Amônia Gen 2 e Gen 3
Amônia (mmol/L)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
Início REP
Escalonamento vertical
Coleta
Dia de REP
Gen 2- L4054
Gen 3- L4054
Gen 2- L4055
Gen 3-L4055

Figura 95

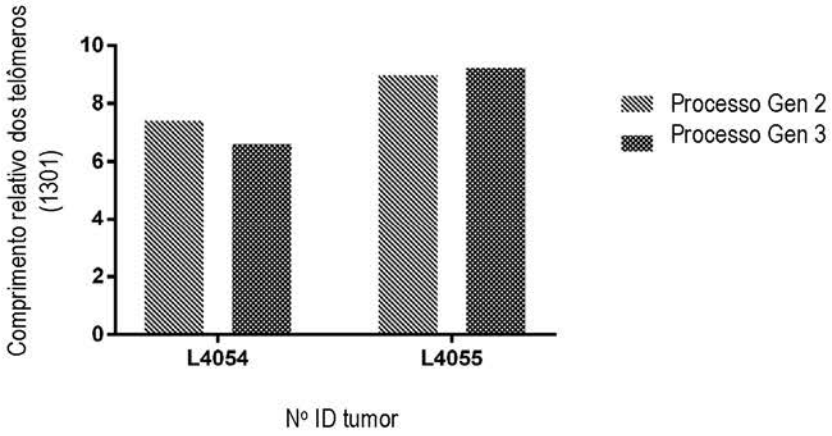

Comprimento relativo dos telômeros (1301)
10
8
6
4
2
0
L4054
L4055
Nº ID tumor
Processo Gen 2
Processo Gen 3

Figura 96

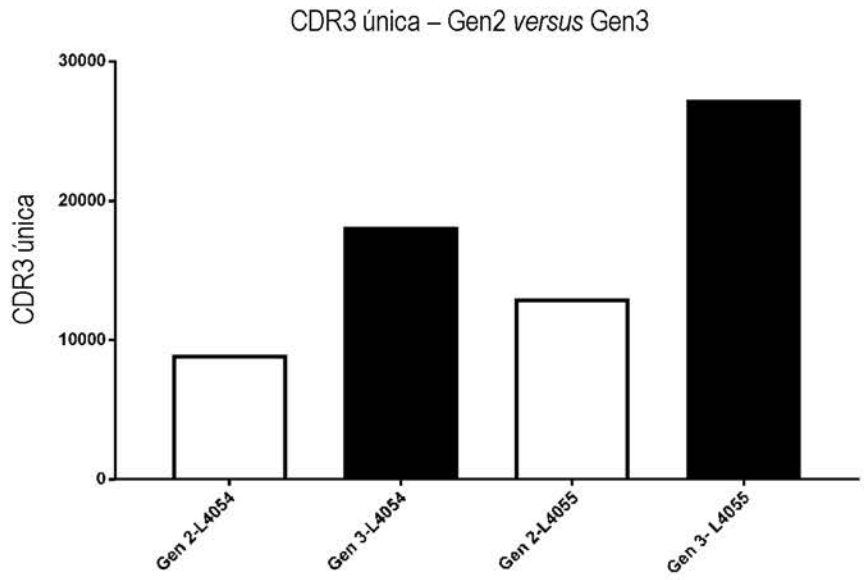
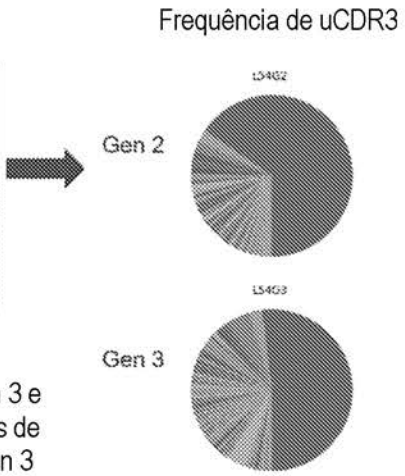

CDR3 única – Gen2 *versus* Gen3
CDR3 única
30000
20000
10000
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3- L4055

Figura 97

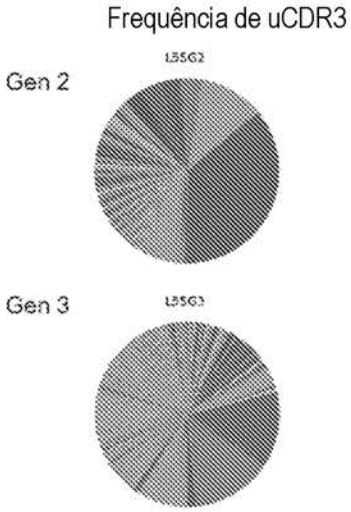
No uCDR3 (% sobreposição)	Todas as sequências uCDR3		80% das melhores uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 **(48.85%)**	205	199 **(97.07%)**
Gen 3-L4054	-	18130	-	223



- 199 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 97,07% das 80% melhores sequências de CDR3 única de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3

Figura 98

No uCDR3 (% sobreposição)	Todas as sequências uCDR3		80% das melhores uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 **(50.77%)**	1843	1833 **(99.45%)**
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616



- 1833 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 99,45% das 80% melhores sequências de CDR3 única de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3

Figura 99

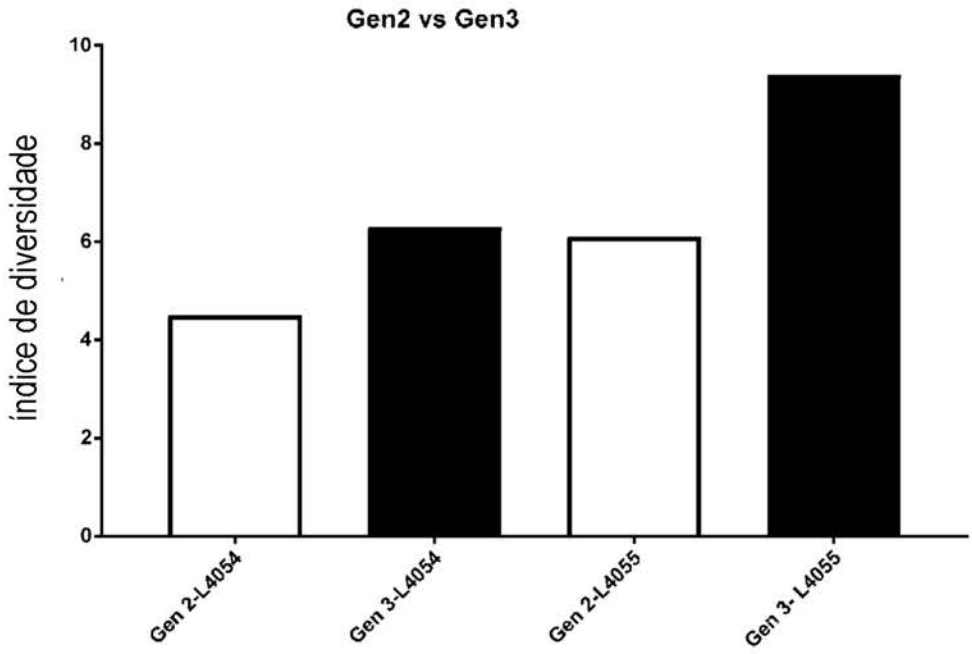

Gen2 vs Gen3
índice de diversidade
10
8
6
4
2
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3- L4055

Figura 100

Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
188	Total	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	Vivas	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	Mortas	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	% viabilidade	96.20%	99.70%	98.00%	97.97%	
188	Total	8.26E+04	8.00E+04	7.66E+04	7.97E+04	1.50E+07
	Vivas	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	Mortas	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	% viabilidade	92.00%	94.20%	89.90%	92.03%	
200	Total	2.44E+04	4.20E+04	1.05E+04	2.56E+04	5.13E+06
	Vivas	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	Mortas	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	% viabilidade	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

Figura 101

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 3 nº L4054 Primeira rodada	1000	Total	9.11E+05	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		Vivas	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	9.35E+05	9.35E+08
		Mortas	5.09E+04	7.49E+04	6.74E+04	6.44E+04	6.44E+07
		% viabilidade	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Gen 3 nº L4055 Segunda rodada	1000	Total	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		Vivas	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		Mortas	3.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		% viabilidade	96.30%	95.90%	95.60%	95.93%	
Gen 3 nº M1085T	200	Total	2.32E+06	2.25E+06		2.29E+06	4.57E+08
		Vivas	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		Mortas	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		% viabilidade	72.40%	69.90%		71.15%	
Gen 2 nº L4054 Primeira rodada	142	Total	1.08E+06	9.84E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.45E+08
		Vivas	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		Mortas	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		% viabilidade	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Gen 2 nº L4055 Segunda rodada	96	Total	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		Vivas	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		Mortas	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		% viabilidade	98.40%	97.00%	96.90%	97.43%	
Gen 2 nº M1085T	200	Total	9.10E+04	5.60E+04		7.35E+04	1.47E+07
		Vivas	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		Mortas	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		% viabilidade	88.50%	75.20%		81.85%	

Figura 102

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 3 nº L4054 Primeira rodada – pré-LOVO	1243.1	Total	1.40E+07	1.46E+07		1.43E+07	1.78E+10
		Vivas	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		Mortas	8.47E+05	1.12E+06		9.84E+05	1.22E+09
		% viabilidade	94.00%	92.40%		93.20%	
Gen 3 nº L4054 Primeira rodada – pós-LOVO	330	Total	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		Vivas	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		Mortas	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		% viabilidade	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 3 nº L4055 Segunda rodada – pré-LOVO	1032.6	Total	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		Vivas	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		Mortas	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		% viabilidade	93.80%	93.60%		93.70%	
Gen 3 nº L4055 Segunda rodada – pós-LOVO	330	Total	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		Vivas	2.85E+07	2.46E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.76E+09
		Mortas	4.56E+06	3.61E+06	4.12E+06	4.09E+06	1.35E+09
		% viabilidade	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 3 nº M1085T pré-LOVO	5000	Total	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		Vivas	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		Mortas	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		% viabilidade	87.40%	87.50%		87.45%	
Gen 3 nº M1085T pós-LOVO pré-adição de CS10	150	Total	6.27E+07	5.44E+07		5.86E+07	8.78E+09
		Vivas	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
			7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		Mortas	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 2 nº L4054 Primeira rodada	913	Total	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		Vivas	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		Mortas	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		% viabilidade	95.00%	93.00%		94.00%	
Gen 2 nº L4055 Segunda rodada	292	Total	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		Vivas	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		Mortas	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		% viabilidade	90.10%	90.90%		90.50%	
Gen 2 nº M1085T	369	Total	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		Vivas	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		Mortas	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		% viabilidade	77.20%	79.90%		78.55%	

Figura 103

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 2 nº L4054 Primeira rodada – pré-LOVO	1385.7	Total	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		Vivas	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		Mortas	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		% viabilidade	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Gen 2 nº L4054 Primeira rodada – : pós-LOVO	330	Total	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		Vivas	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		Mortas	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		% viabilidade	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 2 nº L4055 Primeira rodada – pré-LOVO	1968.2	Total	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		Vivas	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		Mortas	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		% viabilidade	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Gen 2 nº L4055 Primeira rodada – : pós-LOVO	330	Total	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		Vivas	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		Mortas	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		% viabilidade	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

ID	Volume (mL)		Contagem 1 (cél./mL)	Contagem 2 (cél/mL)	Contagem 3 (cél./mL)	Média (cél./mL)	Células totais Média*volume
Gen 2 nº M108ST – pré-LOVO	N/A	Total				#DIV/0!	#DIV/0!
		Vivas				#DIV/0!	#DIV/0!
		Mortas				#DIV/0!	#DIV/0!
		% viabilidade				#DIV/0!	
Gen 2 nº M1085T – pós-LOVO pré-adição de CS10	150	Total	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		Vivas	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		Mortas	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		% viabilidade	86.10%	86.10%		86.10%	

Para L4054 Gen 2, a contagem pós-LOVO foi extrapolada para 4 frascos, porque este era o número total do estudo. 1 frasco foi contaminado, e a extrapolação foi realizada para o total = 6,67E+10

Figura 104

	S1/S2/All/Live | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14+ | freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/CD3-/NK | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/CD19 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4 |freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/CD27 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/CD28 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/CD56 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/CD57 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q3: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q5: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q6: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q7: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/Q8: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)
											TEMRA	NAÏVE	CM	EM	TEMRA	NAÏVE	CM	EM
A1 gen2 1st.fcs	87.2	1.77E-03	0.66	0	98.9	60.6	3.35	60.1	0.06	5.34	0.25	0.073	3.37	96.3	0.056	0.032	21.1	78.8
A2 gen2 2nd.fcs	73.5	0	0.12	0	99.7	83.1	7.94	82.6	0.14	6.18	0.16	0.047	2.39	97.4	0.036	0.014	8.3	91.6
A3 gen3 1st.fcs	90.4	0	0.97	1.72E-03	98.8	49.1	4.5	48.9	0.18	4.02	0.2	0.059	2.29	97.5	0.059	0.049	30.7	69.2
A4 gen3 2nd.fcs	72.1	2.56E-03	0.44	0.018	99.3	64.4	6.27	64	0.26	4.3	0.25	0.18	7.12	92.5	0.12	0.072	20.1	79.7
A5 PBMC.fcs	93.7	6.07	11.6	6.12	70.9	41.1	35.6	40.4	0.041	0.31	0.91	36.1	16.2	46.9	11.4	23.1	16.4	49.1

Incluída mais 1 área para construir o gráfico
TCRab + são DD3+

S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8 | Freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/CD27 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/CD28 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/CD56 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/CD57 | freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q3: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q5: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q6: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q7: CD62L-BV421-A+, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD8/Q8: CD62L-BV421-A-, CD45RA-AF700-A- | Freq. de parental (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRgd | freq. de nulo (%)
					TEMRA	NAÏVE	CM	EM	TEMRA	NAÏVE	CM	EM	
37.9	3.25	37.3	0.41	2.31	0.028	0	4.24	95.7	0.033	9.37E-03	14.1	85.9	0
16.1	1.08	15.8	0.67	0.17	0.042	0.014	4.76	95.2	0.071	0.014	5.24	94.7	0
49.2	4.83	48.5	0.71	1.53	0.056	6.97E-03	3.11	96.8	0.077	0.017	25.5	74.4	0
34.6	2.46	34	1.57	0.5	0.18	0.13	10.2	89.5	0.29	0.044	10.6	89.1	0
29.6	25.8	27.4	0.75	2.81	8.05	40.9	3.02	48	22.3	27.1	6.23	44.3	0

Figura 105

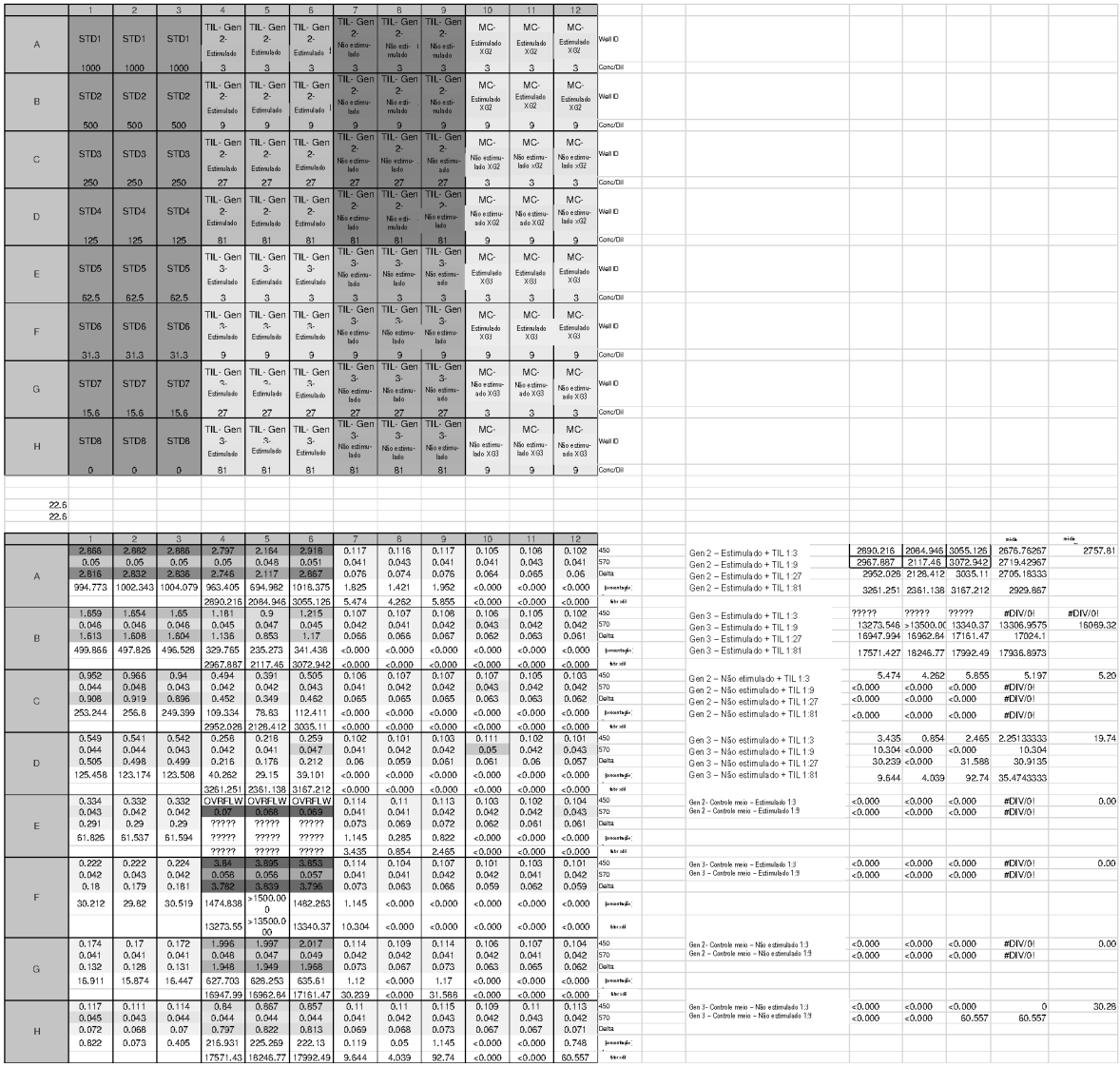
	CD3/CD4 CD38	HLA-DR	CCR7- CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+ CD45RA-	CCR7-CD45RA-	
Gen 3 – Dia 16 – Coleta	42.4		95.2	4.96	0.7	1.22	93.1
Gen 2 – D22 - Coleta	50.4		98	0.61	0.13	0.3	99

CD3	CD3/CD8 CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-	
CD8	77.6	83.2	90.3	20.5	0.013	0.06	79.5
	54.3	88	83.2	4.24	0.026	1.05	94.7

Figura 106

		CD4										
CD3+	CD4+	2B4+	BTLA+	CD103+	CD25+	CD69+	CD95+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 2-L4054		0.61	99.50	1.05	14.80	43.20	99.40	52.90	2.65	5.36	81.20	88.40	78.60
Gen 3-L4054		1.11	99.50	2.28	21.70	45.40	99.70	56.90	8.06	5.07	76.70	74.10	79.30
Gen 2-L4055		1.61	98.60	1.56	23.10	51.10	99.80	63.30	3.86	15.30	77.60	86.00	79.50
Gen 3- L4055		3.57	99.30	2.61	54.40	57.00	99.90	48.00	8.02	10.80	61.40	47.50	84.60
		CD8											
Gen 2-L4054	CD8+	2B4+	BTLA4+	CD103+	CD25+	CD95+	CD69+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 3-L4054		35.20	99.50	74.90	11.80	99.80	58.30	99.10	8.03	33.10	80.60	99.10	88.30
Gen 2-L4055		45.50	99.60	62.40	12.10	99.90	54.00	99.30	13.40	22.10	84.90	98.50	87.50
Gen 3- L4055		40.60	98.20	19.50	32.00	99.70	75.50	96.80	22.80	27.40	28.10	92.30	75.10
		62.80	99.20	29.20	45.50	99.70	58.80	99.60	13.10	16.60	34.10	71.70	63.60

Figura 107



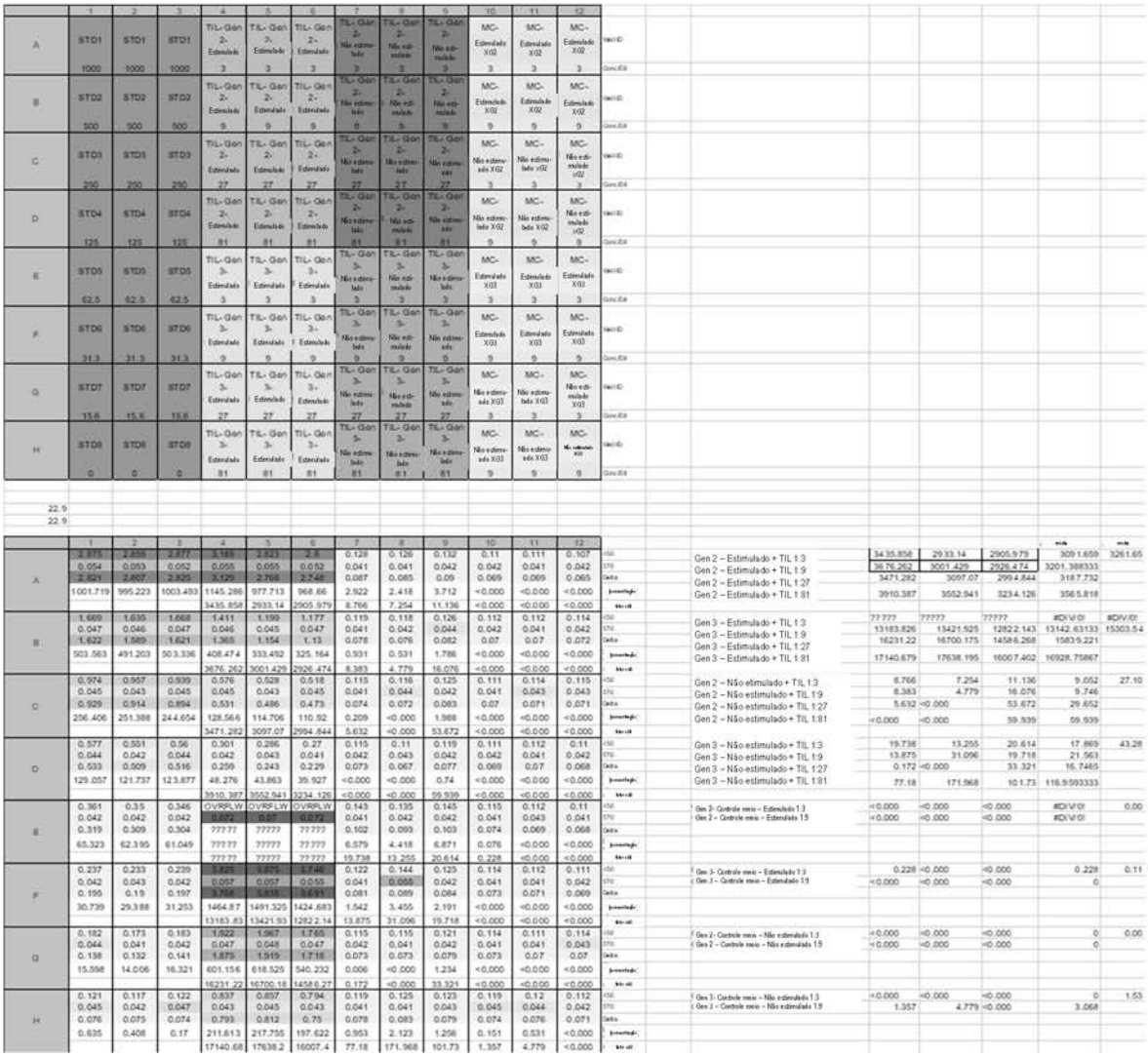
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	STD1	STD1	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	MC- Estimulado XG2	MC- Estimulado XG2	MC- Estimulado XG2	Well ID
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Conc/Dil
B	STD2	STD2	STD2	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	MC- Estimulado XG2	MC- Estimulado XG2	MC- Estimulado XG2	Well ID
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Conc/Dil
C	STD3	STD3	STD3	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	MC- Não estimulado XG2	MC- Não estimulado XG2	MC- Não estimulado XG2	Well ID
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	3	3	3	Conc/Dil
D	STD4	STD4	STD4	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	TIL- Gen 2- Não estimulado	MC- Não estimulado XG2	MC- Não estimulado XG2	MC- Não estimulado XG2	Well ID
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	9	9	9	Conc/Dil
E	STD5	STD5	STD5	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	MC- Estimulado XG3	MC- Estimulado XG3	MC- Estimulado XG3	Well ID
	62.5	62.5	62.5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Conc/Dil
F	STD6	STD6	STD6	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	MC- Estimulado XG3	MC- Estimulado XG3	MC- Estimulado XG3	Well ID
	31.3	31.3	31.3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Conc/Dil
G	STD7	STD7	STD7	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	MC- Não estimulado XG3	MC- Não estimulado XG3	MC- Não estimulado XG3	Well ID
	15.6	15.6	15.6	27	27	27	27	27	27	3	3	3	Conc/Dil
H	STD8	STD8	STD8	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	TIL- Gen 3- Não estimulado	MC- Não estimulado XG3	MC- Não estimulado XG3	MC- Não estimulado XG3	Well ID
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	9	9	9	Conc/Dil

22.6
22.6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	2.866	2.882	2.886	2.797	2.164	2.918	0.117	0.116	0.117	0.105	0.106	0.102	450
	0.05	0.05	0.05	0.05	0.048	0.051	0.041	0.043	0.041	0.041	0.043	0.041	570
	2.816	2.832	2.836	2.746	2.117	2.867	0.076	0.074	0.076	0.064	0.065	0.06	Delta
	994.773	1002.343	1004.079	963.405	694.962	1018.375	1.825	1.421	1.952	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
				2890.216	2084.946	3055.126	5.474	4.262	5.855	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
B	1.659	1.654	1.65	1.181	0.9	1.215	0.107	0.107	0.106	0.106	0.105	0.102	450
	0.046	0.046	0.046	0.045	0.047	0.045	0.042	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	570
	1.613	1.608	1.604	1.136	0.853	1.17	0.065	0.066	0.067	0.062	0.063	0.061	Delta
	499.866	497.826	496.528	329.765	235.273	341.438	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
				2967.887	2117.46	3072.942	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
C	0.952	0.966	0.94	0.494	0.391	0.505	0.106	0.107	0.107	0.107	0.105	0.103	450
	0.044	0.048	0.043	0.042	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.042	570
	0.908	0.919	0.896	0.452	0.349	0.462	0.065	0.065	0.065	0.063	0.063	0.062	Delta
	253.244	256.8	249.399	109.334	78.83	112.411	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
				2952.026	2126.412	3035.11	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
D	0.549	0.541	0.542	0.256	0.216	0.259	0.102	0.101	0.103	0.111	0.102	0.101	450
	0.044	0.044	0.043	0.042	0.041	0.047	0.041	0.042	0.042	0.05	0.042	0.043	570
	0.505	0.498	0.499	0.215	0.176	0.212	0.06	0.059	0.061	0.061	0.06	0.057	Delta
	125.458	123.174	123.508	40.262	29.15	39.101	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
				3261.251	2361.138	3167.212	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
E	0.334	0.332	0.332	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.114	0.11	0.113	0.103	0.102	0.104	450
	0.043	0.042	0.042	0.07	0.068	0.069	0.041	0.041	0.042	0.042	0.042	0.043	570
	0.291	0.29	0.29	?????	?????	?????	0.073	0.069	0.072	0.062	0.061	0.061	Delta
	51.826	51.537	51.594	?????	?????	?????	1.145	0.285	0.822	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
				?????	?????	?????	3.435	0.854	2.465	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
F	0.222	0.222	0.224	3.84	3.895	3.853	0.114	0.104	0.107	0.101	0.103	0.101	450
	0.042	0.043	0.042	0.056	0.056	0.057	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	570
	0.18	0.179	0.181	3.782	3.839	3.796	0.073	0.063	0.068	0.059	0.062	0.059	Delta
	30.212	29.82	30.519	1474.838	>1500.000	1482.263	1.145	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
				13273.55	>13500.000	13340.37	10.304	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
G	0.174	0.17	0.172	1.996	1.997	2.017	0.114	0.109	0.114	0.106	0.107	0.104	450
	0.041	0.041	0.041	0.048	0.047	0.049	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	570
	0.132	0.128	0.131	1.948	1.949	1.968	0.073	0.067	0.073	0.063	0.065	0.062	Delta
	16.911	15.874	16.447	627.703	628.253	635.61	1.12	<0.000	1.17	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
				16947.99	16962.84	17161.47	30.239	<0.000	31.588	<0.000	<0.000	<0.000	[illegible]
H	0.117	0.111	0.114	0.84	0.857	0.857	0.11	0.11	0.115	0.109	0.11	0.113	450
	0.045	0.043	0.044	0.044	0.044	0.044	0.041	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	570
	0.072	0.068	0.07	0.797	0.822	0.813	0.069	0.068	0.073	0.067	0.067	0.071	Delta
	0.822	0.073	0.405	216.931	225.269	222.13	0.119	0.05	1.145	<0.000	<0.000	0.748	[illegible]
				17571.43	18246.77	17992.49	9.644	4.039	92.74	<0.000	<0.000	60.557	[illegible]

				mdk	mdk	
Gen 2 – Estimulado + TIL 1:3	2890.216	2084.946	3055.126	2676.76267		2757.81
Gen 2 – Estimulado + TIL 1:9	2967.887	2117.46	3072.942	2719.42967		
Gen 2 – Estimulado + TIL 1:27	2952.026	2126.412	3035.11	2705.18333		
Gen 2 – Estimulado + TIL 1:81	3261.251	2361.138	3167.212	2929.867		
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	#DIV/0!	
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:9	13273.546	>13500.00	13340.37	13306.9575		16089.32
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:27	16947.994	16962.84	17161.47	17024.1		
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:81	17571.427	18246.77	17992.49	17936.8973		
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:3	5.474	4.262	5.855	5.197		5.20
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:27	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:81	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:3	3.435	0.854	2.465	2.25133333		19.74
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:9	10.304	<0.000	<0.000	10.304		
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:27	30.239	<0.000	31.588	30.9135		
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:81	9.644	4.039	92.74	35.4743333		
Gen 2- Controle meio – Estimulado 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		0.00
Gen 2 – Controle meio – Estimulado 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
Gen 3- Controle meio – Estimulado 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		0.00
Gen 3 – Controle meio – Estimulado 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
Gen 2- Controle meio – Não estimulado 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		0.00
Gen 2 – Controle meio – Não estimulado 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
Gen 3- Controle meio – Não estimulado 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0		30.28
Gen 3 – Controle meio – Não estimulado 1:9	<0.000	<0.000	60.557	60.557		

Figura 108



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1 1000	STD1 1000	STD1 1000	TIL- Gen 2- Estimulado 3	TIL- Gen 2- Estimulado 3	TIL- Gen 2- Estimulado 3	TIL- Gen 2- Não estimulado 3	TIL- Gen 2- Não estimulado 3	TIL- Gen 2- Não estimulado 3	MC- Estimulado X02 3	MC- Estimulado X02 3	MC- Estimulado X02 3
B	STD2 500	STD2 500	STD2 500	TIL- Gen 2- Estimulado 9	TIL- Gen 2- Estimulado 9	TIL- Gen 2- Estimulado 9	TIL- Gen 2- Não estimulado 9	TIL- Gen 2- Não estimulado 9	TIL- Gen 2- Não estimulado 9	MC- Estimulado X02 9	MC- Estimulado X02 9	MC- Estimulado X02 9
C	STD3 250	STD3 250	STD3 250	TIL- Gen 2- Estimulado 27	TIL- Gen 2- Estimulado 27	TIL- Gen 2- Estimulado 27	TIL- Gen 2- Não estimulado 27	TIL- Gen 2- Não estimulado 27	TIL- Gen 2- Não estimulado 27	MC- Não estimulado X02 3	MC- Não estimulado X02 3	MC- Não estimulado X02 3
D	STD4 125	STD4 125	STD4 125	TIL- Gen 2- Estimulado 81	TIL- Gen 2- Estimulado 81	TIL- Gen 2- Estimulado 81	TIL- Gen 2- Não estimulado 81	TIL- Gen 2- Não estimulado 81	TIL- Gen 2- Não estimulado 81	MC- Não estimulado X02 9	MC- Não estimulado X02 9	MC- Não estimulado X02 9
E	STD5 62.5	STD5 62.5	STD5 62.5	TIL- Gen 3- Estimulado 3	TIL- Gen 3- Estimulado 3	TIL- Gen 3- Estimulado 3	TIL- Gen 3- Não estimulado 3	TIL- Gen 3- Não estimulado 3	TIL- Gen 3- Não estimulado 3	MC- Estimulado X03 3	MC- Estimulado X03 3	MC- Estimulado X03 3
F	STD6 31.3	STD6 31.3	STD6 31.3	TIL- Gen 3- Estimulado 9	TIL- Gen 3- Estimulado 9	TIL- Gen 3- Estimulado 9	TIL- Gen 3- Não estimulado 9	TIL- Gen 3- Não estimulado 9	TIL- Gen 3- Não estimulado 9	MC- Estimulado X03 9	MC- Estimulado X03 9	MC- Estimulado X03 9
G	STD7 15.6	STD7 15.6	STD7 15.6	TIL- Gen 3- Estimulado 27	TIL- Gen 3- Estimulado 27	TIL- Gen 3- Estimulado 27	TIL- Gen 3- Não estimulado 27	TIL- Gen 3- Não estimulado 27	TIL- Gen 3- Não estimulado 27	MC- Não estimulado X03 3	MC- Não estimulado X03 3	MC- Não estimulado X03 3
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	TIL- Gen 3- Estimulado 81	TIL- Gen 3- Estimulado 81	TIL- Gen 3- Estimulado 81	TIL- Gen 3- Não estimulado 81	TIL- Gen 3- Não estimulado 81	TIL- Gen 3- Não estimulado 81	MC- Não estimulado X03 9	MC- Não estimulado X03 9	MC- Não estimulado X03 9

22.9
22.9

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.875	2.855	2.877	3.185	2.823	2.8	0.128	0.126	0.132	0.11	0.111	0.107
	0.054	0.053	0.052	0.055	0.055	0.052	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042
	2.821	2.807	2.825	3.129	2.768	2.748	0.087	0.085	0.09	0.069	0.069	0.065
	1001.719	995.223	1003.493	1145.286	977.713	968.66	2.922	2.418	3.712	<0.000	<0.000	<0.000
				3435.858	2933.14	2905.979	8.766	7.254	11.136	<0.000	<0.000	<0.000
B	1.669	1.635	1.668	1.411	1.199	1.177	0.119	0.118	0.126	0.112	0.112	0.114
	0.047	0.046	0.047	0.046	0.045	0.047	0.041	0.042	0.044	0.042	0.041	0.042
	1.622	1.589	1.621	1.365	1.154	1.13	0.078	0.076	0.082	0.07	0.07	0.072
	503.563	491.203	503.336	408.474	333.492	325.164	0.931	0.531	1.786	<0.000	<0.000	<0.000
				3676.262	3001.429	2926.474	8.383	4.779	16.076	<0.000	<0.000	<0.000
C	0.974	0.957	0.939	0.576	0.528	0.518	0.115	0.116	0.125	0.111	0.114	0.115
	0.045	0.043	0.045	0.045	0.043	0.045	0.041	0.044	0.042	0.041	0.043	0.043
	0.929	0.914	0.894	0.531	0.486	0.473	0.074	0.072	0.083	0.07	0.071	0.071
	256.406	251.388	244.654	128.566	114.706	110.92	0.209	<0.000	1.988	<0.000	<0.000	<0.000
				3471.282	3097.07	2994.844	5.632	<0.000	53.672	<0.000	<0.000	<0.000
D	0.577	0.551	0.56	0.301	0.286	0.27	0.115	0.11	0.119	0.111	0.112	0.11
	0.044	0.042	0.044	0.042	0.043	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042
	0.533	0.509	0.516	0.259	0.243	0.229	0.073	0.067	0.077	0.069	0.07	0.068
	129.057	121.737	123.877	48.276	43.863	35.927	<0.000	<0.000	0.74	<0.000	<0.000	<0.000
				3910.387	3552.941	3234.126	<0.000	<0.000	59.939	<0.000	<0.000	<0.000
E	0.361	0.35	0.346	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.143	0.135	0.145	0.115	0.112	0.11
	0.042	0.042	0.042	0.072	0.07	0.072	0.041	0.042	0.042	0.041	0.043	0.041
	0.319	0.309	0.304	?????	?????	?????	0.102	0.093	0.103	0.074	0.069	0.068
	65.323	62.395	61.049	?????	?????	?????	6.579	4.418	6.871	0.076	<0.000	<0.000
				?????	?????	?????	19.738	13.255	20.614	0.228	<0.000	<0.000
F	0.237	0.233	0.239	3.667	3.675	3.748	0.122	0.144	0.125	0.114	0.112	0.111
	0.042	0.043	0.042	0.057	0.057	0.055	0.041	0.055	0.042	0.041	0.041	0.042
	0.195	0.19	0.197	3.756	3.818	3.691	0.081	0.089	0.084	0.073	0.071	0.069
	30.739	29.388	31.253	1464.87	1491.325	1424.683	1.542	3.455	2.191	<0.000	<0.000	<0.000
				13183.83	13421.93	12822.14	13.875	31.096	19.718	<0.000	<0.000	<0.000
G	0.182	0.173	0.183	1.922	1.967	1.765	0.115	0.115	0.121	0.114	0.111	0.114
	0.044	0.041	0.042	0.047	0.048	0.047	0.042	0.041	0.042	0.041	0.041	0.043
	0.138	0.132	0.141	1.875	1.919	1.718	0.073	0.073	0.079	0.073	0.07	0.07
	15.598	14.006	16.321	601.156	618.525	540.232	0.006	<0.000	1.234	<0.000	<0.000	<0.000
				16231.22	16700.18	14586.27	0.172	<0.000	33.321	<0.000	<0.000	<0.000
H	0.121	0.117	0.122	0.837	0.857	0.794	0.119	0.125	0.123	0.119	0.12	0.112
	0.045	0.042	0.047	0.043	0.045	0.043	0.041	0.041	0.043	0.045	0.044	0.042
	0.076	0.075	0.074	0.793	0.812	0.75	0.078	0.083	0.079	0.074	0.076	0.071
	0.635	0.408	0.17	211.613	217.755	197.622	0.953	2.123	1.256	0.151	0.531	<0.000
				17140.68	17638.2	16007.4	77.18	171.968	101.73	1.357	4.779	<0.000

Gen 2 – Estimulado + TIL 1:3	3435.858	2933.14	2905.979	309.1659	3261.65	
Gen 2 – Estimulado + TIL 1:9	3676.262	3001.429	2926.474	3201.388333		
Gen 2 – Estimulado + TIL 1:27	3471.282	3097.07	2994.844	3187.732		
Gen 2 – Estimulado + TIL 1:81	3910.387	3552.941	3234.126	3565.818		
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	#DIV/0!	
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:9	13183.826	13421.925	12822.143	13142.63133	15303.54	
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:27	16231.22	16700.175	14586.268	15839.221		
Gen 3 – Estimulado + TIL 1:81	17140.679	17638.195	16007.402	16928.75867		
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:3	8.766	7.254	11.136	9.052	27.10	
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:9	8.383	4.779	16.076	9.746		
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:27	5.632	<0.000	53.672	29.652		
Gen 2 – Não estimulado + TIL 1:81	<0.000	<0.000	59.939	59.939		
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:3	19.738	13.255	20.614	17.869	43.28	
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:9	13.875	31.096	19.718	21.563		
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:27	0.172	<0.000	33.321	16.7465		
Gen 3 – Não estimulado + TIL 1:81	77.18	171.968	101.73	116.9593333		
Gen 2- Controle meio – Estimulado 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00	
Gen 2 – Controle meio – Estimulado 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!		
Gen 3- Controle meio – Estimulado 1:3	0.228	<0.000	<0.000	0.228	0.11	
Gen 3 – Controle meio – Estimulado 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0		
Gen 2- Controle meio – Não estimulado 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	0.00	
Gen 2 – Controle meio – Não estimulado 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0		
Gen 3- Controle meio – Não estimulado 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	1.53	
Gen 3 – Controle meio – Não estimulado 1:9	1.357	4.779	<0.000	3.068		

Figura 109

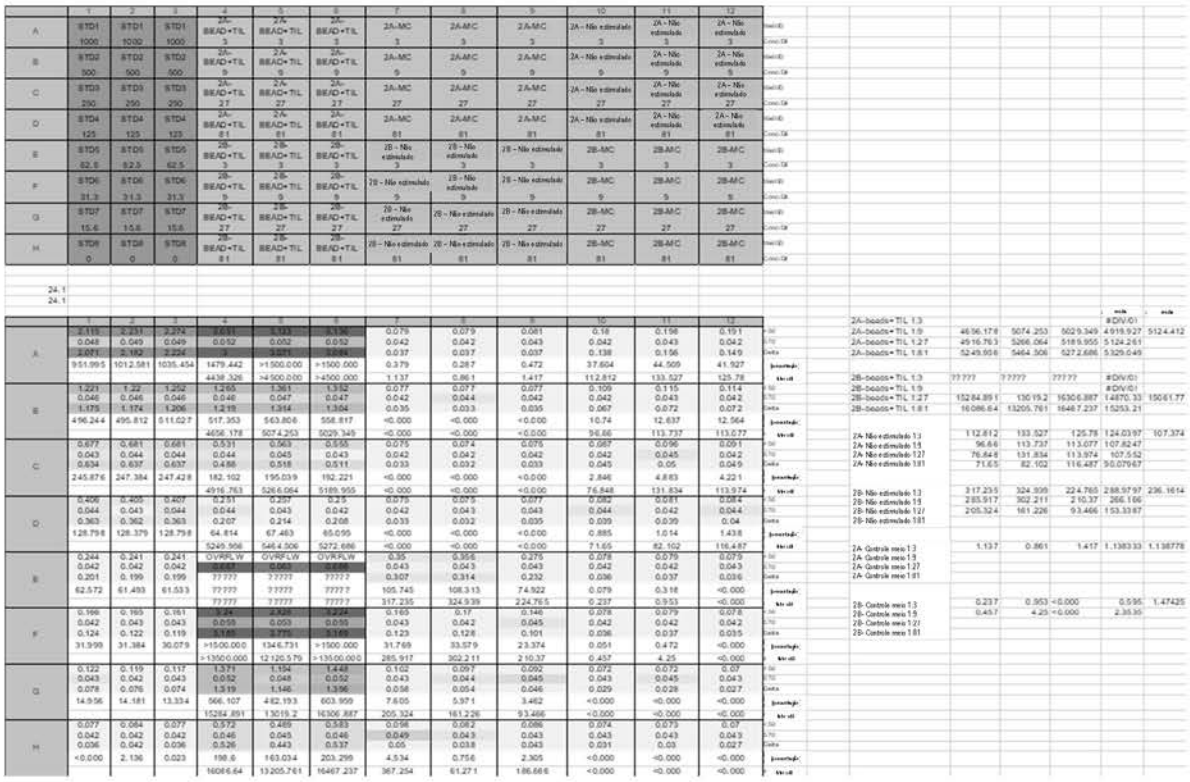
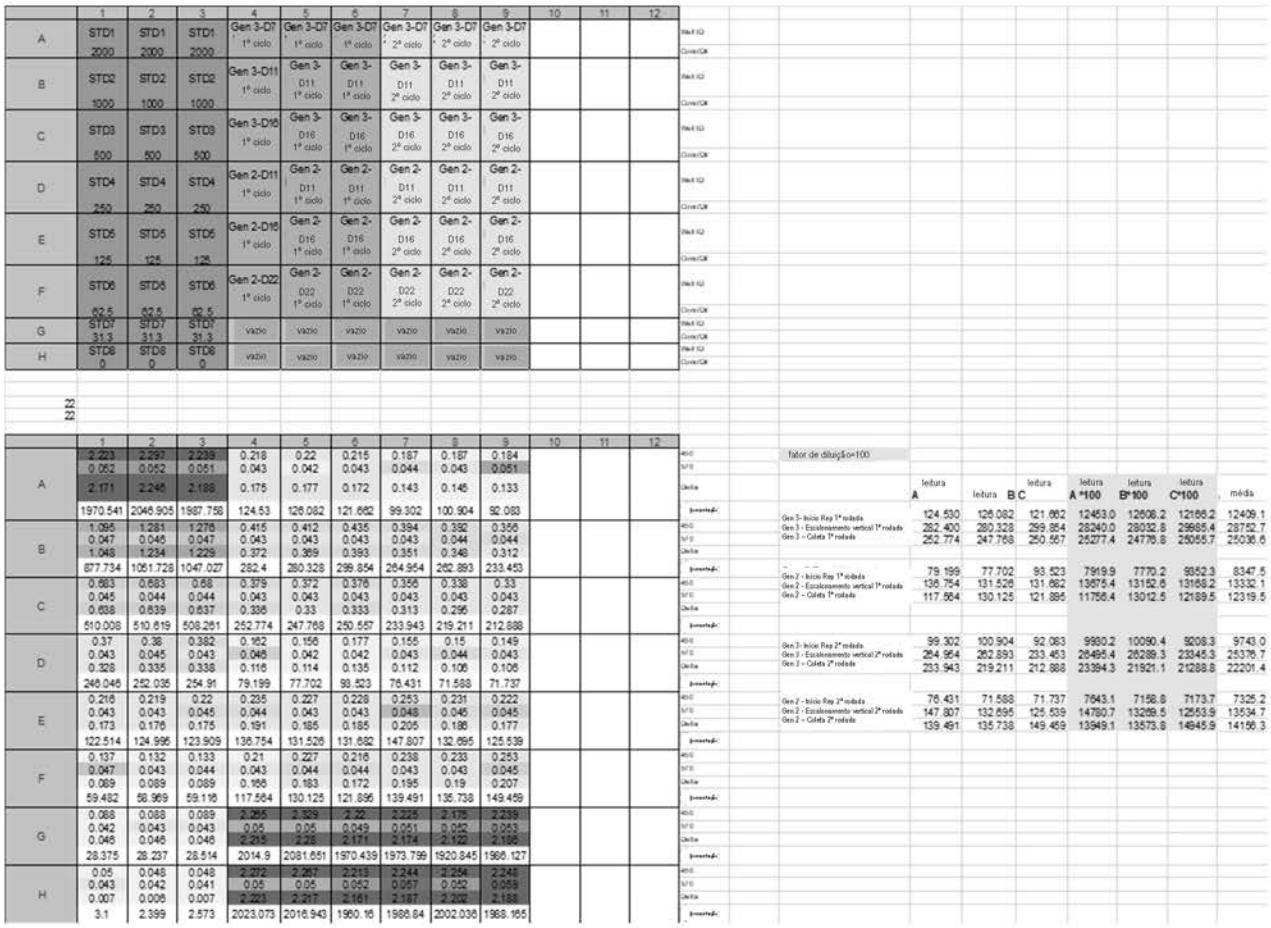


Figura 110



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1 2000	STD1 2000	STD1 2000	Gen 3-D7 1º ciclo	Gen 3-D7 1º ciclo	Gen 3-D7 1º ciclo	Gen 3-D7 2º ciclo	Gen 3-D7 2º ciclo	Gen 3-D7 2º ciclo			
B	STD2 1000	STD2 1000	STD2 1000	Gen 3-D11 1º ciclo	Gen 3-D11 1º ciclo	Gen 3-D11 1º ciclo	Gen 3-D11 2º ciclo	Gen 3-D11 2º ciclo	Gen 3-D11 2º ciclo			
C	STD3 500	STD3 500	STD3 500	Gen 3-D16 1º ciclo	Gen 3-D16 1º ciclo	Gen 3-D16 1º ciclo	Gen 3-D16 2º ciclo	Gen 3-D16 2º ciclo	Gen 3-D16 2º ciclo			
D	STD4 250	STD4 250	STD4 250	Gen 2-D11 1º ciclo	Gen 2-D11 1º ciclo	Gen 2-D11 1º ciclo	Gen 2-D11 2º ciclo	Gen 2-D11 2º ciclo	Gen 2-D11 2º ciclo			
E	STD5 125	STD5 125	STD5 125	Gen 2-D16 1º ciclo	Gen 2-D16 1º ciclo	Gen 2-D16 1º ciclo	Gen 2-D16 2º ciclo	Gen 2-D16 2º ciclo	Gen 2-D16 2º ciclo			
F	STD6 62,5	STD6 62,5	STD6 62,5	Gen 2-D22 1º ciclo	Gen 2-D22 1º ciclo	Gen 2-D22 1º ciclo	Gen 2-D22 2º ciclo	Gen 2-D22 2º ciclo	Gen 2-D22 2º ciclo			
G	STD7 31,3	STD7 31,3	STD7 31,3	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio			
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.223	2.297	2.239	0.218	0.22	0.215	0.187	0.187	0.184			
	0.052	0.052	0.051	0.043	0.042	0.043	0.044	0.043	0.051			
	2.171	2.246	2.188	0.175	0.177	0.172	0.143	0.145	0.133			
	1970.541	2046.905	1987.758	124.53	126.082	121.662	99.302	100.904	92.083			
B	1.095	1.281	1.276	0.415	0.412	0.435	0.394	0.392	0.356			
	0.047	0.046	0.047	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044			
	1.048	1.234	1.229	0.372	0.369	0.393	0.351	0.348	0.312			
	877.734	1051.728	1047.027	282.4	280.328	299.854	264.954	262.893	233.453			
C	0.683	0.683	0.68	0.379	0.372	0.376	0.356	0.338	0.33			
	0.045	0.044	0.044	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043			
	0.638	0.639	0.637	0.336	0.33	0.333	0.313	0.295	0.287			
	510.008	510.619	508.261	252.774	247.768	250.557	233.943	219.211	212.888			
D	0.37	0.38	0.382	0.162	0.156	0.177	0.155	0.15	0.149			
	0.043	0.045	0.043	0.045	0.042	0.042	0.043	0.044	0.043			
	0.328	0.335	0.338	0.116	0.114	0.135	0.112	0.106	0.106			
	246.046	252.035	254.91	79.199	77.702	93.523	76.431	71.588	71.737			
E	0.216	0.219	0.22	0.235	0.227	0.228	0.253	0.231	0.222			
	0.043	0.043	0.045	0.044	0.043	0.043	0.048	0.045	0.045			
	0.173	0.176	0.175	0.191	0.185	0.185	0.205	0.186	0.177			
	122.514	124.996	123.909	136.754	131.526	131.682	147.807	132.695	125.539			
F	0.137	0.132	0.133	0.21	0.227	0.216	0.238	0.233	0.253			
	0.047	0.043	0.044	0.043	0.044	0.044	0.043	0.043	0.045			
	0.089	0.089	0.089	0.166	0.183	0.172	0.195	0.19	0.207			
	59.482	58.969	59.116	117.564	130.125	121.896	139.491	135.738	149.459			
G	0.088	0.088	0.089	2.265	2.329	2.22	2.225	2.175	2.239			
	0.042	0.043	0.043	0.05	0.05	0.049	0.051	0.052	0.053			
	0.046	0.046	0.046	2.215	2.28	2.171	2.174	2.122	2.186			
	28.375	28.237	28.514	2014.9	2081.651	1970.439	1973.799	1920.845	1966.127			
H	0.05	0.048	0.048	2.272	2.267	2.213	2.244	2.254	2.246			
	0.043	0.042	0.041	0.05	0.05	0.052	0.057	0.052	0.058			
	0.007	0.006	0.007	2.223	2.217	2.161	2.187	2.202	2.188			
	3.1	2.399	2.573	2023.073	2016.943	1960.16	1986.84	2002.036	1968.165			

fator de diluição=100

	leitura A	leitura B	leitura C	leitura A *100	leitura B*100	leitura C*100	média
Gen 3- Início Rep 1ª rodada	124.530	126.082	121.662	12453.0	12608.2	12166.2	12409.1
Gen 3 - Escalonamento vertical 1ª rodada	282.400	280.328	299.854	28240.0	28032.8	29985.4	28752.7
Gen 3 – Coleta 1ª rodada	252.774	247.768	250.557	25277.4	24776.8	25055.7	25036.6
Gen 2 - Início Rep 1ª rodada	79.199	77.702	93.523	7919.9	7770.2	9352.3	8347.5
Gen 2 - Escalonamento vertical 1ª rodada	136.754	131.526	131.682	13675.4	13152.6	13168.2	13332.1
Gen 2 – Coleta 1ª rodada	117.564	130.125	121.896	11756.4	13012.5	12189.5	12319.5
Gen 3- Início Rep 2ª rodada	99.302	100.904	92.083	9960.2	10090.4	9208.3	9743.0
Gen 3 - Escalonamento vertical 2ª rodada	264.954	262.893	233.453	26495.4	26289.3	23345.3	25376.7
Gen 3 – Coleta 2ª rodada	233.943	219.211	212.888	23394.3	21921.1	21288.8	22201.4
Gen 2 - Início Rep 2ª rodada	76.431	71.588	71.737	7643.1	7158.8	7173.7	7325.2
Gen 2 - Escalonamento vertical 2ª rodada	147.807	132.695	125.539	14780.7	13269.5	12553.9	13534.7
Gen 2 – Coleta 2ª rodada	139.491	135.738	149.459	13949.1	13573.8	14945.9	14156.3

Figura 111

Número da amostra	Descrição	Glicose (g/L)	Lactato (g/L)	Amônia (mmol/L)	Glutamina (mmol/L)	Glutamax (mmol/L)	Glutamax-Glutamina (mmol/L)
1	Gen 2- Início Rep Primeira rodada n° L4054	1.78	0.14	2.16	1.56	1.71	0.16
2	Gen 2 - Escalonamento vertical Primeira rodada n° L4054	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen 2 – Coleta Primeira rodada n° L4054	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen 3 – REP início Primeira rodada n° L4054	1.68	0.29	1.76	2.11	2.29	0.18
5	Gen 3 - Escalonamento vertical Primeira rodada n° L4054	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen 3 – Coleta Primeira rodada n° L405	1.07	1.53	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen 2- Início Rep Segunda rodada n° L4055	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen 2 - Escalonamento vertical Segunda rodada n° L4055	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen 2 – Coleta Segunda rodada n° L4055	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen 3 – REP início Segunda rodada n° L4055	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen 3 - Escalonamento vertical Segunda rodada n° L4055	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.15
12	Gen 3 – Coleta Primeira rodada n° L405	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

Figura 112

	$FIL	S/L/1301 | Geometr	S/L/Pt | Média geométrica (FL03-A)
A1 gen2L4054 ne	A1 gen2L4054 neg.fcs	34.5	3.24
A2 gen2L4054 ne	A2 gen2L4054 neg.fcs	34	3.19
A3 gen2L4054 po	A3 gen2L4054 pos.fcs	1834	70.6
A4 gen2L4054 po	A4 gen2L4054 pos.fcs	1872	70.3
A5 gen2L4055 ne	A5 gen2L4055 neg.fcs	31.9	4.23
A6 gen2L4055 ne	A6 gen2L4055 neg.fcs	32.4	4.87
A7 gen2L4055 po	A7 gen2L4055 pos.fcs	1941	88.7
A8 gen2L4055 po	A8 gen2L4055 pos.fcs	1933	91.1
B1 gen3L4054 ne	B1 gen3L4054 neg.fcs	31.2	3.45
B2 gen3L4054 ne	B2 gen3L4054 neg.fcs	31.9	3.39
B3 gen3L4054 po	B3 gen3L4054 pos.fcs	2016	61.3
B4 gen3L4054 po	B4 gen3L4054 pos.fcs	2014	76.2
B5 gen3L4055 ne	B5 gen3L4055 neg.fcs	33.7	6.76
B6 gen3L4055 ne	B6 gen3L4055 neg.fcs	35.4	6.7
B7 gen3L4055 po	B7 gen3L4055 pos.fcs	2158	99.4
B8 gen3L4055 po	B8 gen3L4055 pos.fcs	1938	99.5
Média	-	998	43.3
DP	-	999	41.3

Figura 113

Estudo	Amostra	ID amostra	Espécie	Cadeia	Leituras	CDR3	CDR3 única	D50
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0.1
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0.9

Figura 114

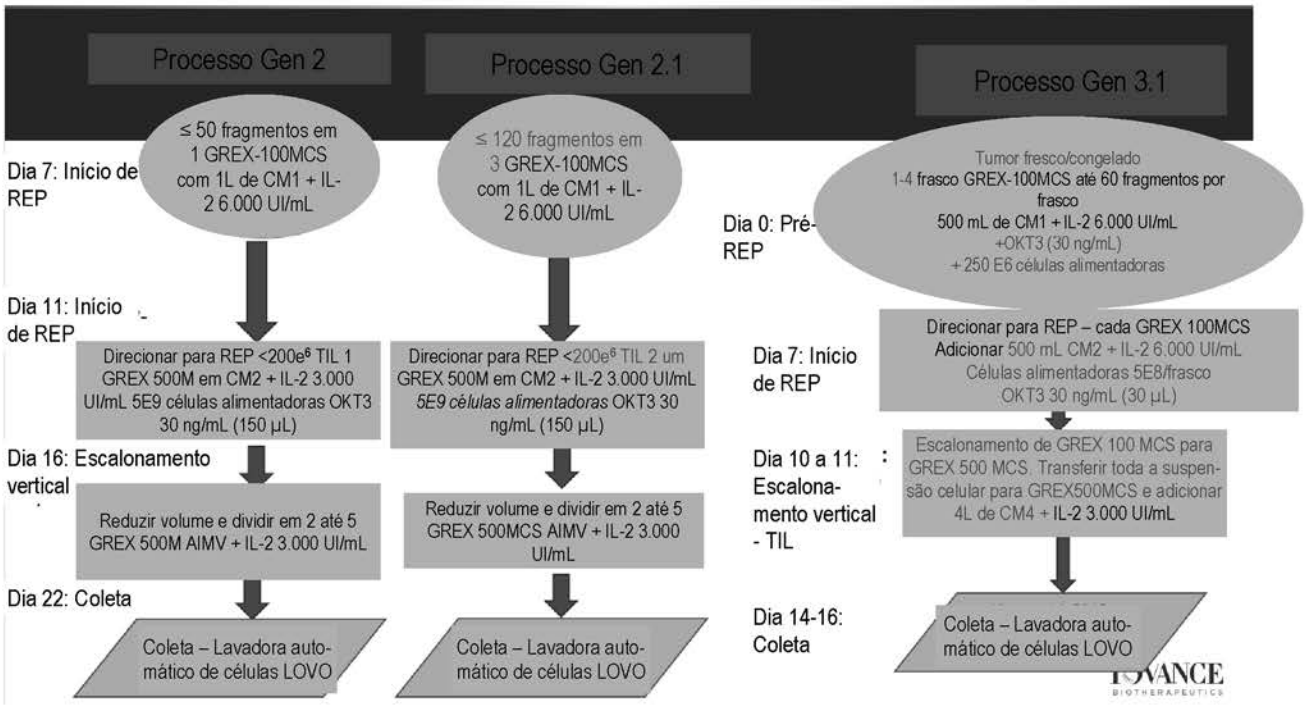

Processo Gen 2
Processo Gen 2.1
Processo Gen 3.1
≤ 50 fragmentos em 1 GREX-100MCS com 1L de CM1 + IL-2 6.000 UI/mL
≤ 120 fragmentos em 3 GREX-100MCS com 1L de CM1 + IL-2 6.000 UI/mL
Tumor fresco/congelado
1-4 frasco GREX-100MCS até 60 fragmentos por frasco
500 mL de CM1 + IL-2 6.000 UI/mL
+OKT3 (30 ng/mL)
+ 250 E6 células alimentadoras
Dia 7: Início de REP
Dia 11: Início de REP
Direcionar para REP <200e6 TIL 1 GREX 500M em CM2 + IL-2 3.000 UI/mL 5E9 células alimentadoras OKT3 30 ng/mL (150 µL)
Direcionar para REP <200e6 TIL 2 um GREX 500M em CM2 + IL-2 3.000 UI/mL 5E9 células alimentadoras OKT3 30 ng/mL (150 µL)
Dia 16: Escalonamento vertical
Reduzir volume e dividir em 2 até 5 GREX 500M AIMV + IL-2 3.000 UI/mL
Reduzir volume e dividir em 2 até 5 GREX 500MCS AIMV + IL-2 3.000 UI/mL
Dia 22: Coleta
Coleta – Lavadora automático de células LOVO
Coleta – Lavadora automático de células LOVO
Dia 0: Pré-REP
Dia 7: Início de REP
Direcionar para REP – cada GREX 100MCS
Adicionar 500 mL CM2 + IL-2 6.000 UI/mL
Células alimentadoras 5E8/frasco
OKT3 30 ng/mL (30 µL)
Dia 10 a 11: Escalonamento vertical - TIL
Escalonamento de GREX 100 MCS para GREX 500 MCS. Transferir toda a suspensão celular para GREX500MCS e adicionar 4L de CM4 + IL-2 3.000 UI/mL
Dia 14-16: Coleta
Coleta – Lavadora automático de células LOVO

Figura 115

ETAPA	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
Pré-REP Dia 0	≤50 fragmentos/ 1 G-Rex 100MCS – 11 dias	≤180 fragmentos/ 3 G-Rex, meio CM1 pré-formulado, aquecido 100MCS - 11 dias	Tumor fresco ou congelado Todo o tumor com ≤30 fragmentos até 60 fragmento por 1 G-Rex 100MCS (até 4 G-Rex), Meio pré-formulado, aquecido – 7 dias, Pré-REP, Células alimentadoras 2,5E8 + OKT-3 (30 ng/mL)
Início de REP	Direcionar para REP – Dia 11 <200 E6 TIL 1 G-Rex 500MCS	Direcionar para REP – Dia 11 <200 E6 TIL Meio CM2 pré-formulado, aquecido em um 1 G-Rex 500MCS	Direcionar para REP – Dia 7 – todas as células TIL – mesmo 1 G-Rex 100MCS (100MCS até 4 GREX), Meio padrão ou Meio Definido (sem soro). Adição de 5E8 células alimentadoras + OKT-3 (30 ng/mL)
Propagação de TIL ou escalonamento vertical	1 para 5 G-REX 500 MCS Dividir – dia 16	2 para 5 G-REX 500 MCS Meio CM4 pré-formulado, aquecido Dividir – dia 16	De G-REX 100MCS transferir suspensão de TIL para G-REX 500MCS, até 4 GREX 500MCS - Meio padrão ou Meio Definido (sem soro) Escalonamento vertical no dia 10 ou 11
Coleta	Coleta dia 22, Lavadora automática de células LOVO	Coleta dia 22, Lavadora automática de células LOVO (Ciclo de 5 de lavagens)	Coleta dia 14 ou 16, Lavadora automática de células LOVO (Ciclo de 5 de lavagens)
Formulação final	Produto crioconservado IL-2 300 UI/mL, CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto crioconservado IL-2 300 UI/mL, CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto crioconservado IL-2 300 UI/mL, CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas
Tempo do processo	22 dias	22 dias	16 dias

Figura 116

Dia do processo	Condições	Gen 3.1
Dia 0 – Início de REP	Meio CM1	500 mL
	IL-2 (6000 UI/mL)	+
	OKT-30 (30 ng/mL)	+
	Alimentadoras (250 e+06)	+

Dia do processo	Condições	Gen 3.1
Dia 7 – Início de REP	Meio CM2	500 mL
	IL-2 (6000 UI/mL)	+
	OKT-30 (30 ng/mL) adicionado no Dia 7	+
	Alimentadoras (250 e+06) adicionadas no Dia 7	500 E06
	Alimentadoras totais no dia	750 E+06

Dia do processo	Condições	Gen 3.1
Dia 9-11 – Escalonamento Vertical	De G-REX 100MCS transferir suspensão de TIL para 1 G-REX 500MCS (até 3 GREX 500MCS)	Sim
Dia 16 – Coleta	Lavadora automática de células LOVO	Sim

Figura 117

Comparação entre processos	Principais alterações no processo	Benefício
Gen 2 : Gen 2.1	• O processo inicia com dois frascos em vez de um frasco • A camada de alimentadoras é dividida no início de REP entre 2 frascos G-Rex500MCS • O meio é pré-formulado e aquecido antes do uso	• Potencial para dobrar a contagem de células finais (dose) com repertório aumentado de TIL • Redundância do processo por todo o processo
Gen 2.1 : Gen 3.1	• Tumor fresco ou congelado • 14-16 dias de processo (de 22 dias) • A camada de alimentadores totais é redudiza no processo • Camada de alimentadoras e OKT-3 presentes no Dia 0 • REP iniciado com fragmentos • Escalonamento de 100MCS para 500MCS • Escalonamento de múltiplos frascos pré-REP • Meio Padrão e Meio Definido (sem soro)	• Aumento da potência • Melhoria do fenótipo • Diminuição do tempo do processo • Redução de testes dos reagentes • Diminuição da variabilidade do processo • Reagentes definidos • Aumento do repertório • Redução de impurezas (alimentadora) • Dose comparável ou maior

Figura 118

Comparação entre processo	Principais alterações no processo	Melhoria desejada	Critérios para sucesso	Resultado
Gen 2 : Gen 3.0	• 14-16 dias • Inicia REP com fragmentos para até 4 frascos • Escalonamento de 100MCS para 500 MCS	• Aumento da potência • Melhoria do fenótipo • Diminuição do tempo do proceso	• Aumento da potência, conforme medida por IFN-g √ • Fenótipo comparável √ • Dose comparável √ • Pureza comparável √ (célula alimentadora) • Diversidade clonal mantida √	• Potência aumentada em relação a Gen2 • Expressão melhorada de células CD28 em CD8 • Capacidade máxima do frasco atingida no dia 16 no Gen 3.1 • Uso reduzido de células alimentadoras • Diversidade aumentada

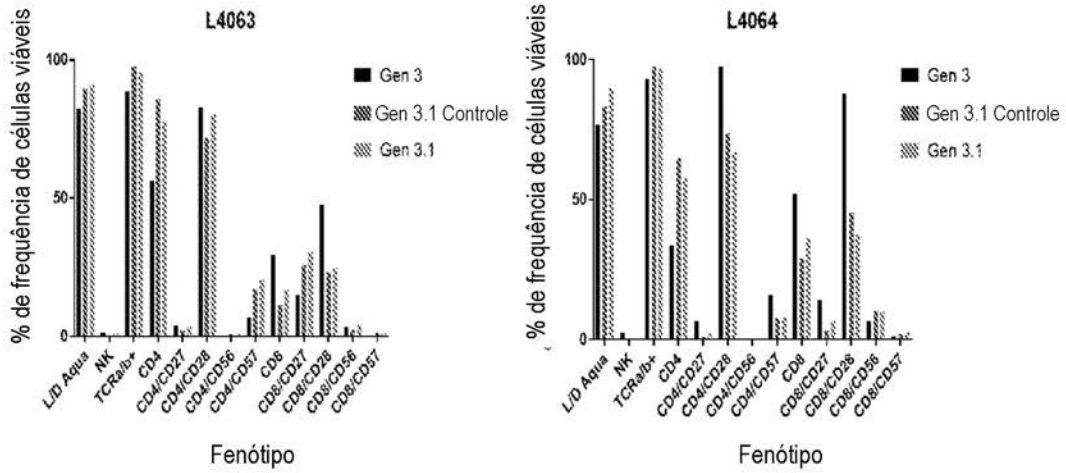
Figura 119

Processo	Gen 2	Gen 3		Processo	Gen 3	Gen 3.1 Controle	Gen 3.1
L4054	Meio padrão	Meio padrão		L4063	Meio padrão	Meio padrão	Meio padrão
L4055	Meio padrão	Meio padrão		L4064	Meio definido	Meio definido	Meio definido
M1085T	Meio padrão	Meio padrão					

Meio padrão:
Pré-REP: CM1
Inídio de REP: CM2
Divisão ou escalonamento vertical: CM4

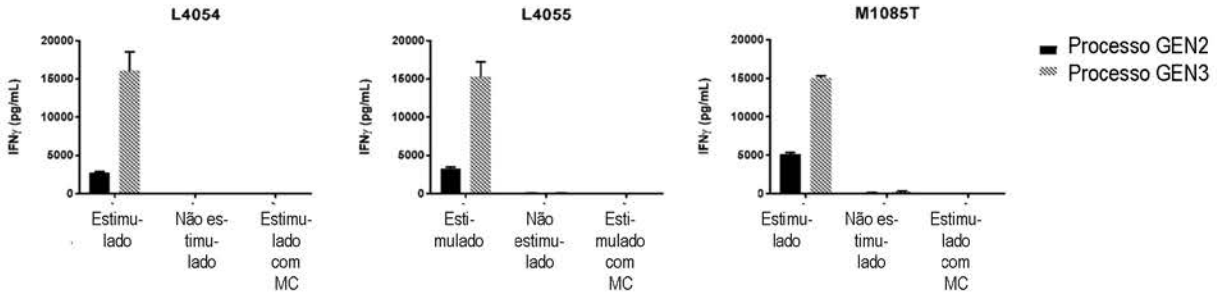
Meio definido:
CTS Optimizer (Meio sem soro) em cada dia do processo

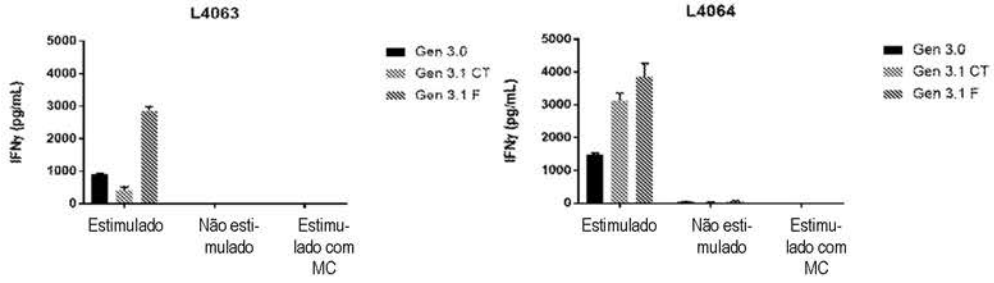
Figura 120



ID do tumor	Meio padrão L4063			Meio definido – L4064		
Processo	Gen 3.0	Gen 3.1 controle	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 controle	Gen 3.1
Nº fragmentos	53	53	53	21	21	21

Figura 121



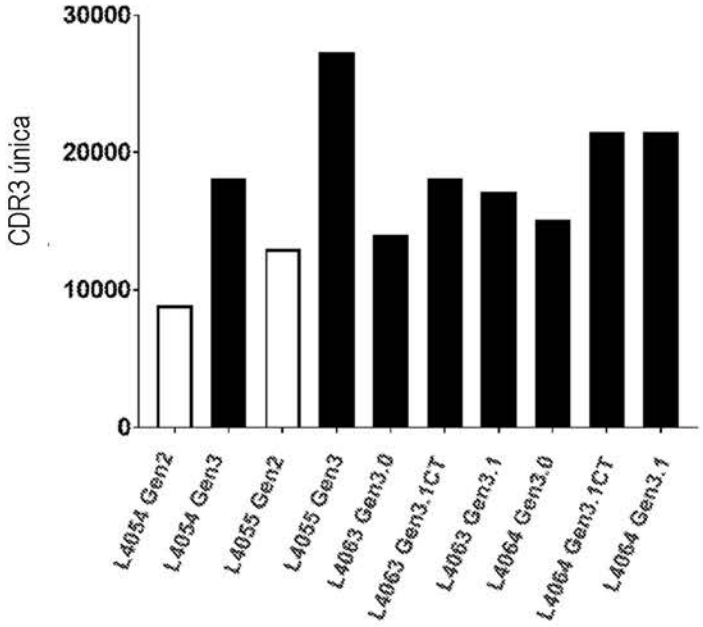


L4063 – Meio padrão

L4064 – Meio definido

Dia do processo	Condições	Gen 3.1	Gen 3.1 (CT) (controle)	Gen 3.1 F
Dia 0 – Pré-Início de REP	Meio CM1	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2 (6000 UI/mL)	+	+	+
	OKT-30 (30 ng/mL)	+	+	+
	Alimentadoras (250 e+06)	+	+	+

Figura 122


30000
20000
10000
0
CDR3 única
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1

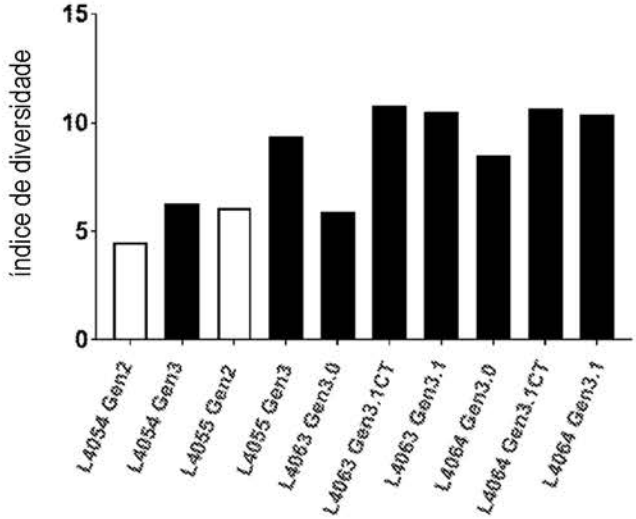
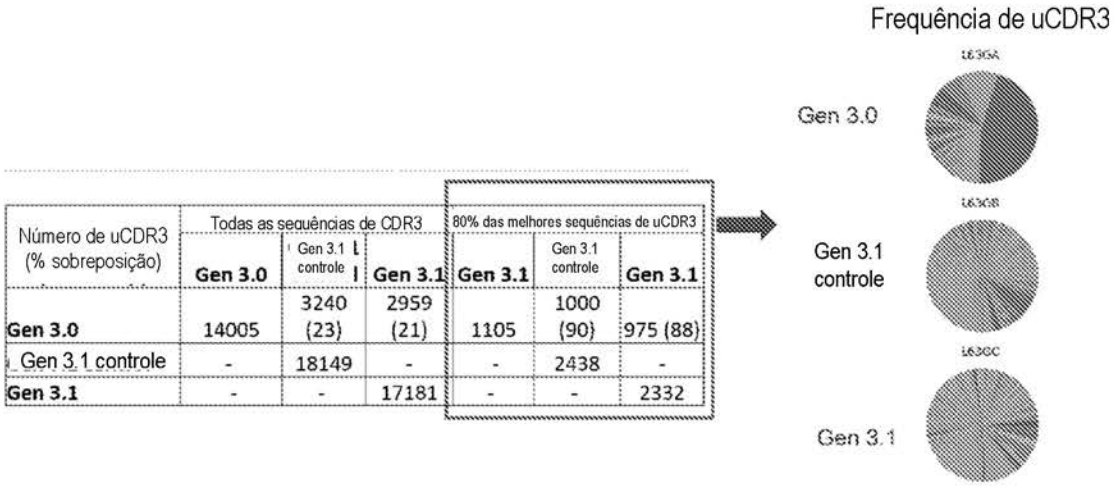

15
10
5
0
índice de diversidade
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1

Figura 123

Condições	Gen 3.0	Gen 3.1 (controle)	Gen 3.1
Meio CM1	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06 UI/mL)	+	+	+
OKT-30 (30 ng/mL)	+	+	+
Alimentadoras (250 e+06)	+	+	+



Número de uCDR3 (% sobreposição)	Todas as sequências de CDR3			80% das melhores sequências de uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 controle	**Gen 3.1**	**Gen 3.1**	Gen 3.1 controle	**Gen 3.1**
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen 3.1 controle	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

Figura 124

Condições	Gen 3.0	Gen 3.1 (controle)	Gen 3.1
Meio CM1	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-30 (30 ng/mL)	+	+	+
Alimentadoras (250 e+06)	+	+	+

Número de uCDR3 (% sobreposição)	Todas as sequências de CDR3			80% das melhores sequências de uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 controle	Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.1 controle	Gen. 3.1
Gen 3.0	15107	5486 **(36)**	5541 **(37)**	2479	2186 **(88)**	2163 **(87)**
Gen 3.1 controle	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3264

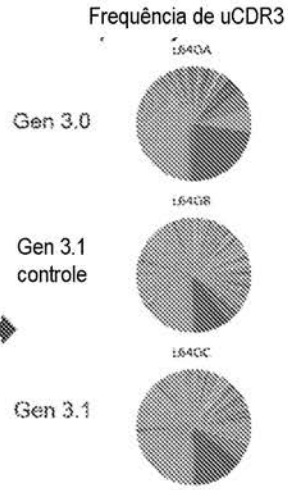


Figura 125

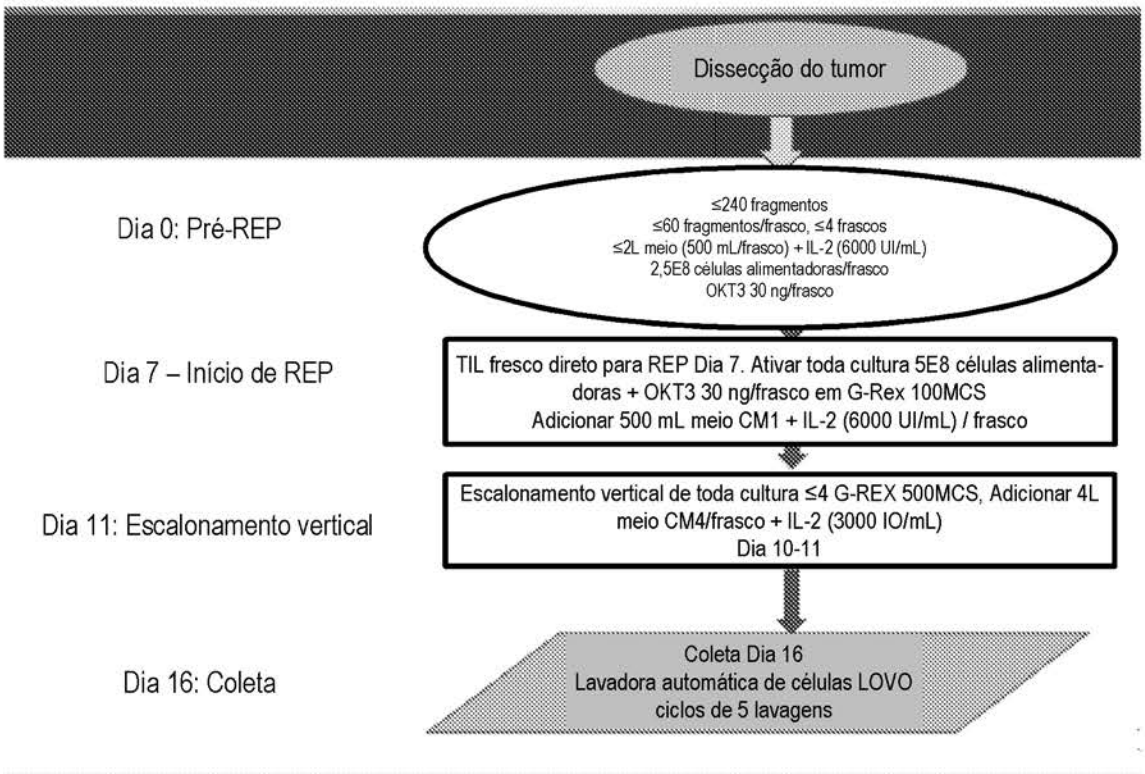

Dissecção do tumor
Dia 0: Pré-REP
≤240 fragmentos
≤60 fragmentos/frasco, ≤4 frascos
≤2L meio (500 mL/frasco) + IL-2 (6000 UI/mL)
2,5E8 células alimentadoras/frasco
OKT3 30 ng/frasco
Dia 7 – Início de REP
TIL fresco direto para REP Dia 7. Ativar toda cultura 5E8 células alimentadoras + OKT3 30 ng/frasco em G-Rex 100MCS
Adicionar 500 mL meio CM1 + IL-2 (6000 UI/mL) / frasco
Dia 11: Escalonamento vertical
Escalonamento vertical de toda cultura ≤4 G-REX 500MCS, Adicionar 4L meio CM4/frasco + IL-2 (3000 IO/mL)
Dia 10-11
Dia 16: Coleta
Coleta Dia 16
Lavadora automática de células LOVO
ciclos de 5 lavagens

Figura 126

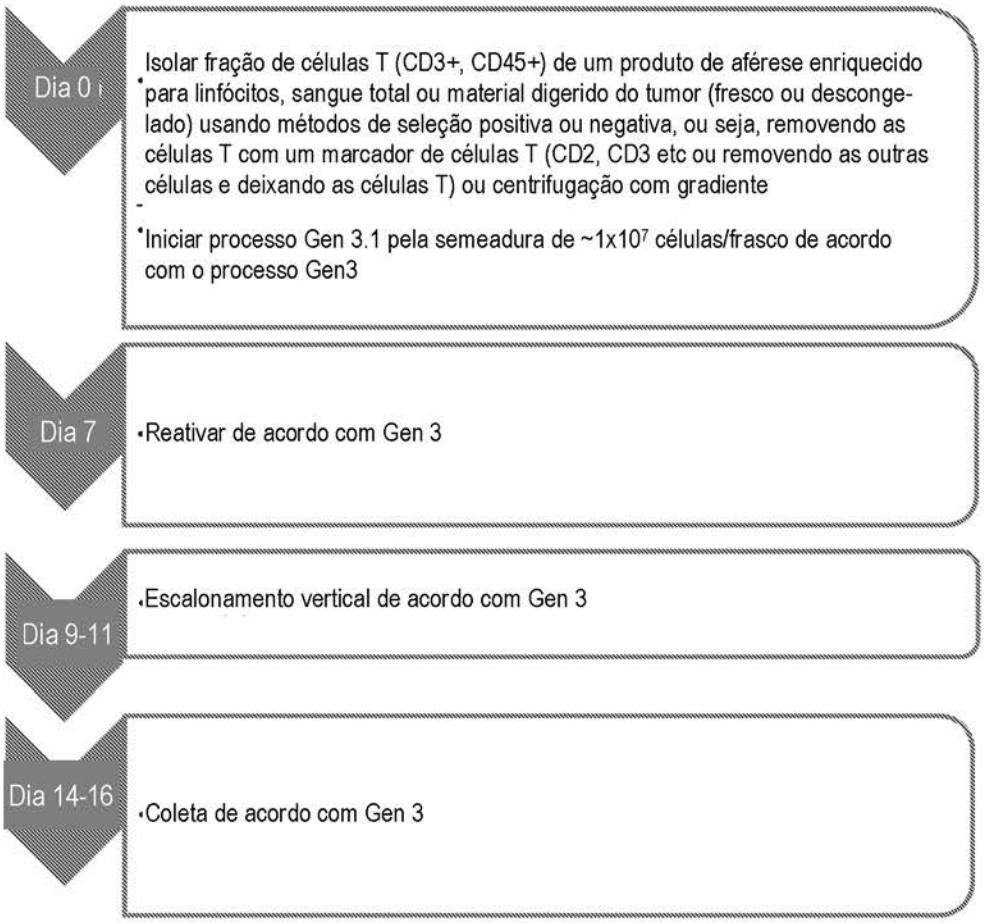

Dia 0
Isolar fração de células T (CD3+, CD45+) de um produto de aférese enriquecido para linfócitos, sangue total ou material digerido do tumor (fresco ou descongelado) usando métodos de seleção positiva ou negativa, ou seja, removendo as células T com um marcador de células T (CD2, CD3 etc ou removendo as outras células e deixando as células T) ou centrifugação com gradiente
Iniciar processo Gen 3.1 pela semeadura de ~1x10^7 células/frasco de acordo com o processo Gen3
Dia 7
Reativar de acordo com Gen 3
Dia 9-11
Escalonamento vertical de acordo com Gen 3
Dia 14-16
Coleta de acordo com Gen 3

Figura 127

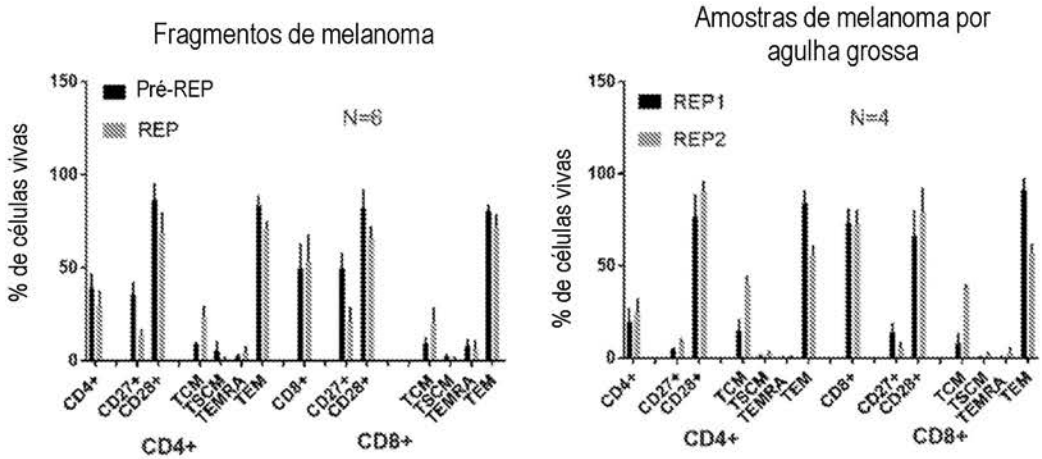

Fragmentos de melanoma
Pré-REP
REP
N=6
% de células vivas
150
100
50
0
CD4+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4+
CD8+
Amostras de melanoma por agulha grossa
REP1
REP2
N=4
% de células vivas
150
100
50
0
CD4+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD8+
CD27+ CD28+
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD4+
CD8+

Figura 128

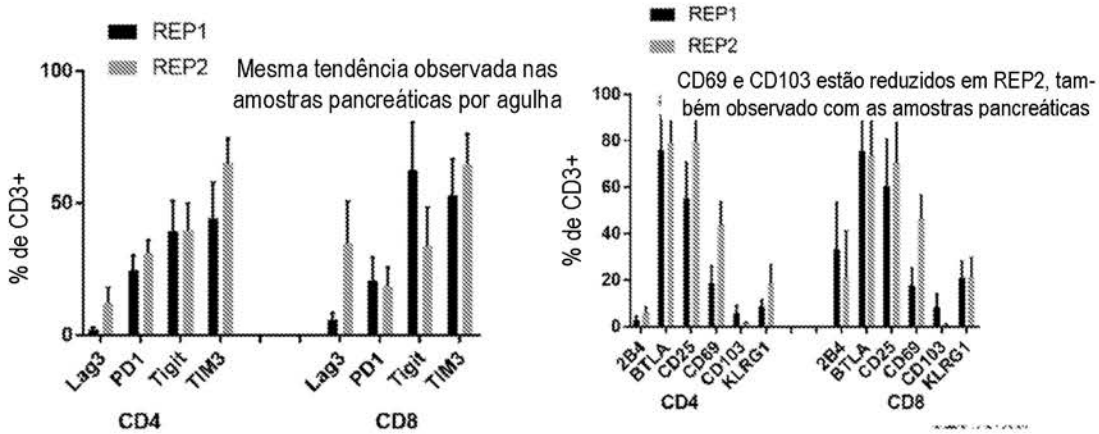
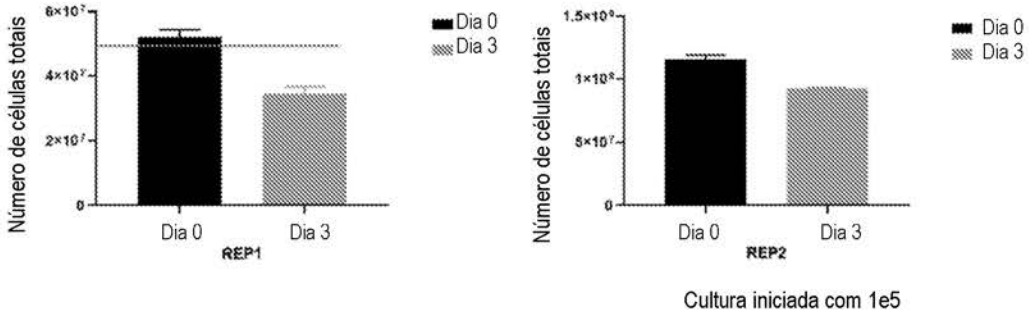

REP1
REP2
Mesma tendência observada nas amostras pancreáticas por agulha
% de CD3+
100
50
0
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD4
CD8
REP1
REP2
CD69 e CD103 estão reduzidos em REP2, também observado com as amostras pancreáticas
% de CD3+
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD103
KLRG1
CD4
CD8

Figura 129

	Condições de cultura	Amostras/cond. (nº)	REP1	REP2
Pulmão (L4083)	Dia 0: Adição de OKT3 + alimentadoras Dia 3: Adição de OKT3 + alimentadoras	1	>50E6 células no Dia 11 na condição do Dia 0	1157 vezes (Dia 0) e 925 vezes (1/2 amostras) de expansão IFN γ ~10.350 e 7.663 pg/mL (respectivamente)



Cultura iniciada com 1e5

Figura 130

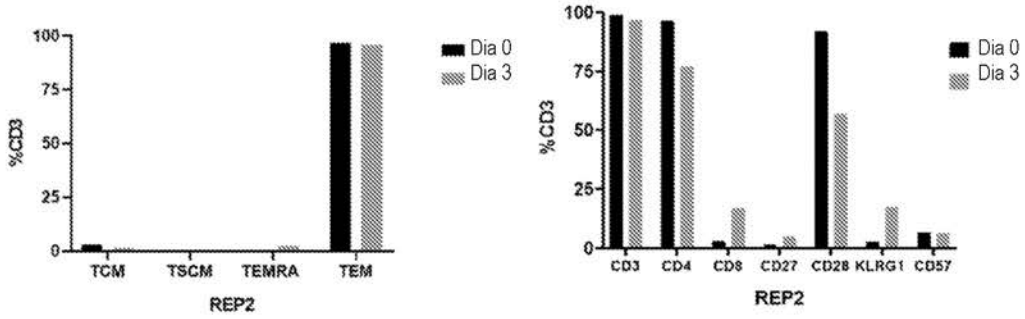

100
75
50
25
0
%CD3
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
REP2
Dia 0
Dia 3
100
75
50
25
0
%CD3
CD3
CD4
CD8
CD27
CD28
KLRG1
CD57
REP2
Dia 0
Dia 3

Figura 131

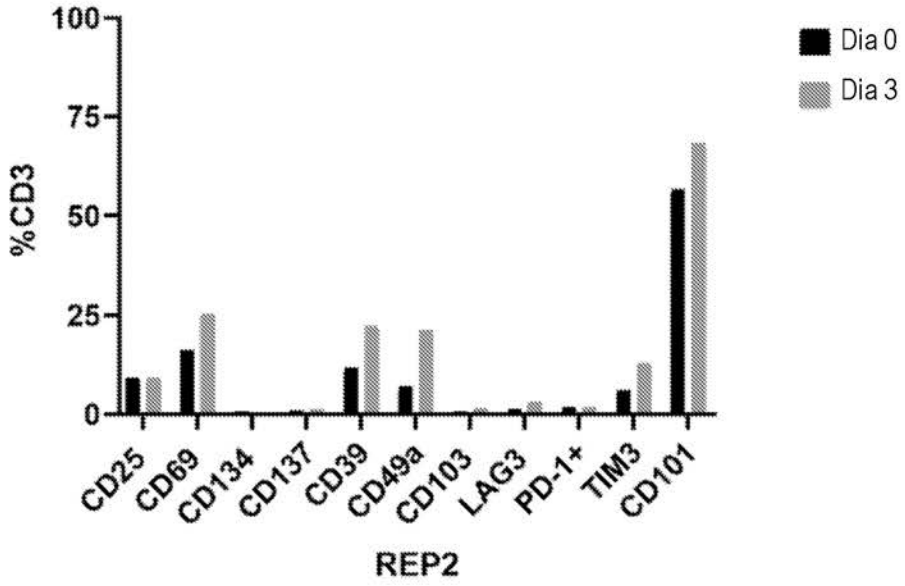

100
75
50
25
0
%CD3
Dia 0
Dia 3
CD25
CD69
CD134
CD137
CD39
CD49a
CD103
LAG3
PD-1+
TIM3
CD101
REP2

Figura 132

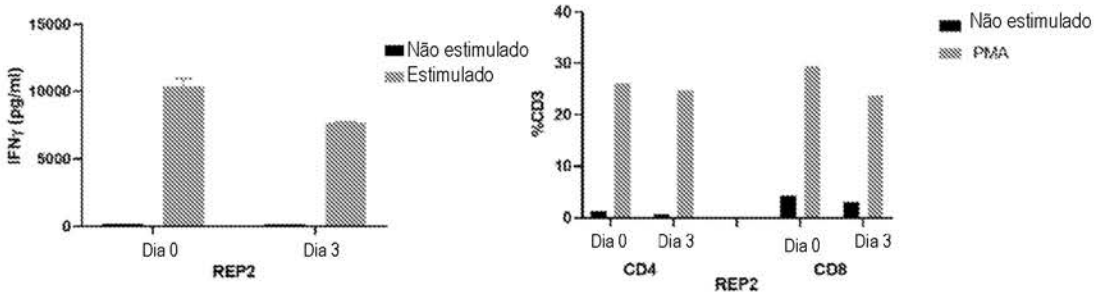
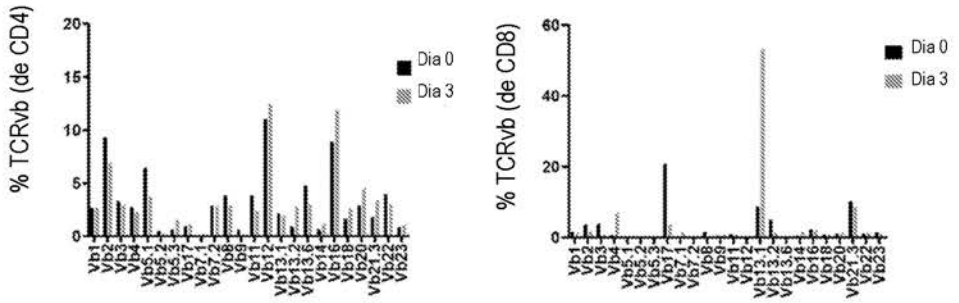

15000
10000
5000
0
IFNγ (pg/ml)
Não estimulado
Estimulado
Dia 0
Dia 3
REP2
40
30
20
10
0
%CD3
Não estimulado
PMA
Dia 0
Dia 3
Dia 0
Dia 3
CD4
CD8
REP2

Figura 133


% TCRvb (de CD4)
20
15
10
5
0
Dia 0
Dia 3
Vb1
Vb2
Vb3
Vb4
Vb5.1
Vb5.2
Vb5.3
Vb7
Vb7.1
Vb7.2
Vb8
Vb9
Vb11
Vb12
Vb13.1
Vb13.2
Vb13.6
Vb14
Vb16
Vb18
Vb20
Vb21.3
Vb22
Vb23
% TCRvb (de CD8)
60
40
20
0
Dia 0
Dia 3
Vb1
Vb2
Vb3
Vb4
Vb5.1
Vb5.2
Vb5.3
Vb7
Vb7.1
Vb7.2
Vb8
Vb9
Vb11
Vb12
Vb13.1
Vb13.2
Vb13.6
Vb14
Vb16
Vb18
Vb20
Vb21.3
Vb22
Vb23

RESUMO

MÉTODO PARA A EXPANSÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILS) EM UMA POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE TILS, MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, COMPOSIÇÃO

A presente invenção provê métodos para expandir populações de TILs presentes em aspirados por agulha fina (FNAs) ou pequenas biópsias, os quais contêm números reduzidos de TILs, utilizando os métodos aqui descritos em um sistema fechado que leva a fenótipo melhorado e aumento da saúde metabólica dos TILs em período mais curto de tempo.

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

Código de Controle

Campo 1

Campo 2

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 62113120.txt
- Data de Geração do Código: 03/07/2020
- Hora de Geração do Código: 16:07:16
- Código de Controle:
  - Campo 1: 15D0AA5A0E14036D
  - Campo 2: 0D73D9EFDA15C0E2