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

(21) BR 112021008573-4 A2

(22) Data do Depósito: 04/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 26/10/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR EM UMA POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, PARA TRATAR UM SUJEITO COM CÂNCER E DE EXPANSÃO DE CÉLULAS T, POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, SACO DE INFUSÃO ESTÉRIL, PREPARAÇÃO CRIOPRESERVADA, E, USO DA COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR.

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

(30) Prioridade Unionista: 05/11/2018 US 62/755,954; 20/09/2019 US 62/903,585.

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

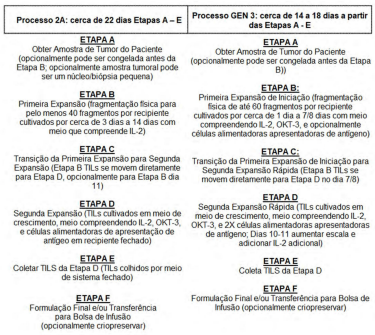
(72) Inventor(es): SETH WARDELL; MARITZA LIENLAF MORENO.

(86) Pedido PCT: PCT US2019059718 de 04/11/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/096988 de 14/05/2020

(85) Data da Fase Nacional: 03/05/2021

(57) Resumo: MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR EM UMA POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, PARA TRATAR UM SUJEITO COM CÂNCER E DE EXPANSÃO DE CÉLULAS T, POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, SACO DE INFUSÃO ESTÉRIL, PREPARAÇÃO CRIOPRESERVADA, E, USO DA COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR A presente invenção refere-se a métodos melhorados e/ou encurtados para expandir TILs e produzir populações terapêuticas de TILs, incluindo métodos inovadores para expandir populações de TILs em um sistema fechado que leva à eficácia melhorada, fenótipo melhorado e saúde metabólica aumentada dos TILs em um período mais curto de tempo, enquanto permite a contaminação microbiana reduzida, bem como custos reduzidos. Tais TILs encontram uso em regimes de tratamento terapêutico.



Processo 2A: cerca de 22 dias Etapas A – E	Processo GEN 3: cerca de 14 a 18 dias a partir das Etapas A - E
ETAPA A Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B, opcionalmente amostra tumoral pode ser um núcleo/biópsia pequena)	**ETAPA A** Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B))
ETAPA B Primeira Expansão (fragmentação física para pelo menos 40 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 3 dias a 14 dias com meio que compreende IL-2)	**ETAPA B:** Primeira Expansão de Iniciação (fragmentação física de até 60 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 1 dia a 7/8 dias com meio compreendendo IL-2, OKT-3, e opcionalmente células alimentadoras apresentadoras de antígeno)
ETAPA C Transição da Primeira Expansão para Segunda Expansão (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D, opcionalmente para Etapa B dia 11)	**ETAPA C:** Transição da Primeira Expansão de Iniciação para Segunda Expansão Rápida (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D no dia 7/8)
ETAPA D Segunda Expansão (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e células alimentadoras de apresentação de antígeo em recipiente fechado)	**ETAPA D** Segunda Expansão Rápida (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e 2X células alimentadoras apresentadoras de antígeno; Dias 10-11 aumentar escala e adicionar IL-2 adicional)
ETAPA E Coletar TILS da Etapa D (TILs colhidos por meio de sistema fechado)	**ETAPA E** Coleta TILS da Etapa D
ETAPA F Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)	**ETAPA F** Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)

MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR EM UMA POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, PARA TRATAR UM SUJEITO COM CÂNCER E DE EXPANSÃO DE CÉLULAS T, POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, SACO DE INFUSÃO ESTÉRIL, PREPARAÇÃO CRIOPRESERVADA, E, USO DA COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica a prioridade do Pedido de Patente Provisório nº US 62/775.954, depositado em 5 de novembro de 2018, e do Pedido de Patente Provisório nº US 62/903.585, depositado em 20 de setembro de 2019, que são incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O tratamento de cânceres volumosos e refratários usando a transferência adotiva de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) representa uma abordagem poderosa para a terapia de pacientes com prognóstico desfavorável. Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* **2006,** *6,* 383-393. Um grande número de TILs é necessário para a imunoterapia bem-sucedida e um processo robusto e confiável é necessário para a comercialização. Isso tem sido um desafio devido a questões técnicas, logísticas e regulatórias com a expansão das células. A expansão de TIL baseada em IL-2 seguida por um "processo de expansão rápida" (REP) tornou-se o método preferencial para a expansão de TIL por causa de 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. REP pode resultar em uma expansão de 1000 vezes de TILs em um período de 14

dias, embora exija um grande excesso (por exemplo, 200 vezes) de células mononucleares de sangue periférico alogênico irradiadas (PBMCs, também conhecidas como células mononucleares (MNCs)), frequentemente de vários doadores, como células alimentadoras, bem como anticorpo anti-CD3 (OKT3) e altas doses de IL-2. Dudley, *et al., J. Immunother.* **2003,** *26,* 332-42. TILs que foram submetidos a um procedimento REP produziram uma terapia celular adotiva bem-sucedida após a imunossupressão do hospedeiro em pacientes com melanoma. Os parâmetros de aceitação da infusão atuais dependem de leituras da composição de TILs (por exemplo, positividade de CD28, CD8 ou CD4) e na expansão e viabilidade do produto REP.

[003] Os processos de fabricação de TIL atuais são limitados por questões de comprimento, custo, esterilidade e outros fatores aqui descritos. Há uma necessidade urgente de fornecer processos de fabricação de TIL e terapias com base em tais processos que são caracterizados por melhor custo-benefício e escalabilidade na fabricação e fenótipos anticâncer mais potentes de preparações de TIL produzidas para o tratamento de pacientes humanos em vários centros clínicos. A presente invenção atende a essa necessidade ao fornecer um novo processo de expansão de TIL que inclui células alimentadoras de apresentação de antígeno desde o início da expansão, a fim de iniciar os TILs para expansão, em vez de uma etapa de expansão pré-REP tradicional, permitindo assim uma etapa substancial redução do tempo total do processo de expansão.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] A presente invenção fornece métodos melhorados e/ou reduzidos para expandir TILs e produzir populações terapêuticas de TILs.

[005] A presente invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende:

(a) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de um

tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor;

(b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira a expansão é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida suplementando-se o meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de APCs adicionado na etapa (b), em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 1 a 11 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 rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás;

(d) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (c); e

(e) transferir a população de TIL colhida da etapa (d) para um saco de infusão.

[006] A presente invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende:

(a) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de um

tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor;

(b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente compreendendo células de apresentação de antígeno (APCs), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e APCs, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 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) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (c).

[007] Em algumas modalidades, "obter" indica que os TILs empregados no método e/ou processo podem ser derivados diretamente da amostra (incluindo a partir de uma ressecção cirúrgica, biópsia por agulha, biópsia central, biópsia pequena ou outra amostra) como parte do método e/ou etapas do processo. Em algumas modalidades, “receber” indica que os TILs empregados no método e/ou processo podem ser derivados indiretamente da amostra (incluindo a partir de uma ressecção cirúrgica, biópsia por agulha, biópsia central, pequena biópsia ou outra amostra) e então empregados na método e/ou processo, (por exemplo, quando a etapa (a) começa serão TILs que já foram derivados da amostra por um processo separado não incluído na parte (a), tais TILs podem ser referidos como "recebidos").

[008] Em algumas modalidades do método, na etapa (b), o meio de

cultura de células compreende ainda células apresentadoras de antígeno (APCs), e em que o número de APCs no meio de cultura na etapa (c) é maior do que o número de APCs no meio de cultura na etapa (b).

[009] A presente invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende:

(a) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se uma primeira população de TILs, sendo que a dita primeira população de TILs obtida processando-se uma amostra de tumor de um tumor ressecado de um sujeito em múltiplos fragmentos de tumor, em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada para o primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(b) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs na segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de APCs na etapa (a), em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 1 a 11 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 rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás; e

(c) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (b).

[0010] A presente invenção também fornece um método para

expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende:

(a) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se uma primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente compreendendo células de apresentação de antígeno (APCs), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(b) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e APCs, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 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

(c) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (b).

[0011] Em algumas modalidades do método, na etapa (a), o meio de cultura de células compreende ainda células apresentadoras de antígeno (APCs), e em que o número de APCs no meio de cultura na etapa (c) é maior do que o número de APCs no meio de cultura na etapa (b).

[0012] Em algumas modalidades, a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação é selecionada a partir de uma faixa de cerca de 1,5:1 a cerca de 20:1.

[0013] Em algumas modalidades, a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de 1,5:1 a cerca de 10:1.

[0014] Em algumas modalidades, a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de

iniciação está em uma faixa de cerca de 2:1 a cerca de 5:1.

[0015] Em algumas modalidades, a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de 2:1 a cerca de 3:1.

[0016] Em algumas modalidades, a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação é de cerca de 2:1.

[0017] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação é selecionado a partir da faixa de cerca de $1,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida é selecionado a partir da faixa de cerca de $2,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[0018] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação é selecionado a partir da faixa de cerca de $1,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida é selecionado a partir da faixa de cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $6,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[0019] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação é selecionado a partir da faixa de cerca de $2,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $3,0 \times 10^6$ APCs/cm^2, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida é selecionado a partir da faixa de cerca de $4,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $5,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[0020] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação é selecionado a partir da faixa de cerca de 1×10^8 APCs a cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida é selecionado a partir da faixa de cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs a cerca de 1×10^9 APCs.

[0021] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação é selecionado a partir da faixa de cerca de $1,5 \times 10^8$

APCs a cerca de 3×10^8 APCs, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida é selecionado a partir da faixa de cerca de 4×10^8 APCs a cerca de $7,5 \times 10^8$ APCs.

[0022] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação é selecionado a partir da faixa de cerca de 2×10^8 APCs a cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida é selecionado a partir da faixa de cerca de $4,5 \times 10^8$ APCs a cerca de $5,5 \times 10^8$ APCs.

[0023] Em algumas modalidades, cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs são adicionadas à primeira expansão de iniciação e 5×10^8 APCs são adicionadas à segunda expansão rápida.

[0024] Em algumas modalidades, a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 1,5:1 a cerca de 100:1.

[0025] Em algumas modalidades, a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 50:1.

[0026] Em algumas modalidades, a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 25:1.

[0027] Em algumas modalidades, a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 20:1.

[0028] Em algumas modalidades, a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 10:1.

[0029] Em algumas modalidades, a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs.

[0030] Em algumas modalidades, o método compreende realizar, após

a etapa de colheita da população terapêutica de TILs, a etapa adicional de:

[0031] transferir a população terapêutica colhida de TILs para uma bolsa de infusão.

[0032] Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos de tumor são distribuídos em uma pluralidade de recipientes separados, em cada um dos recipientes separados, a segunda população de TILs é obtida a partir da primeira população de TILs na etapa da primeira expansão de iniciação, e a terceira população de TILs é obtida a partir da segunda população de TILs na etapa da segunda expansão rápida, e em que a população terapêutica de TILs obtida da terceira população de TILs é coletada de cada um dentre a pluralidade de recipientes e combinada para produzir a população de TIL colhida.

[0033] Em algumas modalidades, a pluralidade de recipientes separados compreende pelo menos dois recipientes separados.

[0034] Em algumas modalidades, a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a vinte recipientes separados.

[0035] Em algumas modalidades, a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a dez recipientes separados.

[0036] Em algumas modalidades, a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a cinco recipientes separados.

[0037] Em algumas modalidades, cada um dos recipientes separados compreende uma primeira área de superfície permeável a gás.

[0038] Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos de tumor são distribuídos em um único recipiente.

[0039] Em algumas modalidades, o único recipiente compreende uma primeira área de superfície permeável a gás.

[0040] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células apresentadoras de antígeno (APCs) e as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área

de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de uma camada de células a cerca de três camadas de células.

[0041] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 1,5 camada de células a cerca de 2,5 camadas de células.

[0042] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 2 camadas de células.

[0043] Em algumas modalidades, a etapa da segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura de cerca de 3 camadas de células a cerca de 5 camadas de células.

[0044] Em algumas modalidades, na segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura de cerca de 3,5 camadas de células a cerca de 4,5 camadas de células.

[0045] Em algumas modalidades, na segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura de cerca de 4 camadas de células.

[0046] Em algumas modalidades, na etapa da primeira expansão de iniciação, a primeira expansão de iniciação é realizada em um primeiro recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, e na etapa da segunda expansão rápida, a segunda expansão rápida é realizada em um segundo recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás.

[0047] Em algumas modalidades, o segundo recipiente é maior do que o primeiro recipiente.

[0048] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células apresentadoras de antígeno (APCs) e as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de uma camada de células a cerca de três camadas de células.

[0049] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 1,5 camada de células a cerca de 2,5 camadas de células.

[0050] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 2 camadas de células.

[0051] Em algumas modalidades, na segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 3 camadas de células a cerca de 5 camadas de células.

[0052] Em algumas modalidades, na segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás com uma espessura média de cerca de 3,5 camadas de células a cerca de 4,5 camadas de células.

[0053] Em algumas modalidades, a etapa da segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás com uma espessura média de cerca de 4 camadas de células.

[0054] Em algumas modalidades, para cada recipiente em que a primeira expansão de iniciação é realizada em uma primeira população de TILs, a segunda expansão rápida é realizada no mesmo recipiente na segunda população de TILs produzida a partir dessa primeira população de TILs.

[0055] Em algumas modalidades, cada recipiente compreende uma

primeira área de superfície permeável a gás.

[0056] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células apresentadoras de antígeno (APCs) e as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de uma camada celular a cerca de três células camadas.

[0057] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 1,5 camada de células a cerca de 2,5 camadas de células.

[0058] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 2 camadas de células.

[0059] Em algumas modalidades, a etapa da segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 3 camadas de células a cerca de 5 camadas de células.

[0060] Em algumas modalidades, a etapa da segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás com uma espessura média de cerca de 3,5 camadas de células a cerca de 4,5 camadas de células.

[0061] Em algumas modalidades, a etapa da segunda expansão rápida, as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás com uma espessura média de cerca de 4 camadas de células.

[0062] Em algumas modalidades, em que para cada recipiente em que a primeira expansão de iniciação é realizada em uma primeira população de TILs na etapa da primeira expansão de iniciação, o primeiro recipiente compreende uma primeira área de superfície, o meio de cultura de células

compreende células apresentadoras de antígeno (APCs), e as APCs são dispostas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás, e em que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é selecionada na faixa de cerca de 1:1,1 a cerca de 1:10.

[0063] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é selecionada a partir da faixa de cerca de 1:1,2 a cerca de 1:8.

[0064] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão de ataque é selecionada a partir da faixa de cerca de 1:1,3 a cerca de 1:7.

[0065] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é selecionada a partir da faixa de cerca de 1:1,4 a cerca de 1:6.

[0066] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é selecionada a partir da faixa de cerca de 1:1,5 a cerca de 1:5.

[0067] Em algumas modalidades, a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda

expansão rápida é selecionada na faixa de cerca de 1:1,6 a cerca de 1:4.

[0068] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é selecionada a partir da faixa de cerca de 1:1,7 a cerca de 1:3,5.

[0069] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é selecionada a partir da faixa de cerca de 1:1,8 a cerca de 1:3.

[0070] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é selecionada a partir da faixa de cerca de 1:1,9 a cerca de 1:2,5.

[0071] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é de cerca de 1:2.

[0072] Em algumas modalidades, após 2 a 3 dias na etapa da segunda expansão rápida, o meio de cultura de células é suplementado com IL-2 adicional.

[0073] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a criopreservação da população de TIL colhida na etapa de colheita da população terapêutica de TILs usando um processo de criopreservação.

[0074] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa de criopreservar a bolsa de infusão.

[0075] Em algumas modalidades, o processo de criopreservação é

realizado usando uma razão de 1:1 da população de TIL colhida para o meio de criopreservação.

[0076] Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

[0077] Em algumas modalidades, as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

[0078] Em algumas modalidades, a etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), e em que o número total de PBMCs adicionado ao meio de cultura de células na etapa da primeira expansão de iniciação é de cerca de $2,5 \times 10^8$.

[0079] Em algumas modalidades, a etapa da segunda expansão rápida das células apresentadoras de antígeno (APCs) no meio de cultura de células são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), e em que o número total de PBMCs adicionado ao meio de cultura de células na etapa de a segunda expansão rápida é cerca de 5×10^8.

[0080] Em algumas modalidades, as células apresentadoras de antígeno são células apresentadoras de antígeno artificiais.

[0081] Em algumas modalidades, a colheita na etapa de colheita da população terapêutica de TILs é realizada usando um sistema de processamento de células baseado em membrana.

[0082] Em algumas modalidades, a colheita na etapa de colheita da população terapêutica de TILs é realizada usando um sistema de processamento de células LOVO.

[0083] Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 60 fragmentos por recipiente na etapa da primeira expansão de iniciação, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm^3.

[0084] Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos

compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm^3 a cerca de 1500 mm^3.

[0085] Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1350 mm^3.

[0086] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama.

[0087] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células é fornecido em um recipiente selecionado do grupo que consiste em um recipiente G e um saco de células Xuri.

[0088] Em algumas modalidades, a concentração de IL-2 é de cerca de 10000 UI/ml a cerca de 5000 UI/ml.

[0089] Em algumas modalidades, a concentração de IL-2 é de cerca de 6000 UI/ml.

[0090] Em algumas modalidades, a bolsa de infusão na etapa de transferência da população terapêutica colhida de TILs para uma bolsa de infusão é uma bolsa de infusão contendo HypoThermosol.

[0091] Em algumas modalidades, o meio de criopreservação compreende dimetilsulfóxido (DMSO).

[0092] Em algumas modalidades, o meio de criopreservação compreende DMSO a 7% a 10%.

[0093] Em algumas modalidades, o primeiro período na etapa da primeira expansão de iniciação e o segundo período na etapa da segunda expansão rápida são realizados cada um individualmente dentro de um período de 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

[0094] Em algumas modalidades, o primeiro período na etapa da primeira expansão de iniciação é realizado dentro de um período de 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

[0095] Em algumas modalidades, o segundo período na etapa da segunda expansão rápida é realizado dentro de um período de 7 dias, 8 dias ou 9 dias.

[0096] Em algumas modalidades, o primeiro período na etapa da primeira expansão de iniciação e o segundo período na etapa da segunda expansão rápida são, cada um, realizados individualmente dentro de um período de 7 dias.

[0097] Em algumas modalidades, as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 14 dias a cerca de 16 dias.

[0098] Em algumas modalidades, as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 15 dias a cerca de 16 dias.

[0099] Em algumas modalidades, as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 14 dias.

[00100] Em algumas modalidades, as etapas da primeira expansão de iniciação por meio da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 15 dias.

[00101] Em algumas modalidades, as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 16 dias.

[00102] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa de criopreservação da população terapêutica colhida de TILs usando um processo de criopreservação, em que as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs e criopreservação são realizadas em 16 dias ou menos.

[00103] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs colhida na etapa de colheita da população terapêutica de TILs compreende

TILs suficientes para uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs.

[00104] Em algumas modalidades, o número de TILs suficiente para uma dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

[00105] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa da segunda expansão rápida fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade.

[00106] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa da segunda expansão rápida fornece pelo menos uma a cinco vezes ou mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 18 dias.

[00107] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da terceira população de TILs na etapa da segunda expansão rápida exibem expressão aumentada de CD8 e CD28 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da segunda população de TILs na etapa da primeira expansão de iniciação.

[00108] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs da etapa de colheita da população terapêutica de TILs é infundida em um paciente.

[00109] A presente invenção também fornece um método para tratar um sujeito com câncer, sendo que o método compreende a administração de linfócitos infiltrantes de tumor expandido (TILs) compreendendo:

(a) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de um tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor;

(b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e, opcionalmente, células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de

TILs, em que a primeira a expansão é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida suplementando-se o meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs adicionado à segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de APCs adicionado na etapa (b), em que a segunda expansão rápida é realizada por cerca de 1 a 11 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 rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás;

(d) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (c);

(e) transferir a população de TIL colhida da etapa (d) para um saco de infusão; e

(f) administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs da etapa (e) ao sujeito.

[00110] Em algumas modalidades, o número de TILs suficiente para administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz na etapa (f) é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

[00111] Em algumas modalidades, as células de apresentação de antígeno (APCs) são PBMCs.

[00112] Em algumas modalidades, antes da administração de uma dosagem terapeuticamente eficaz de células TIL na etapa (f), um regime de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao paciente.

[00113] Em algumas modalidades, o regime de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a

uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias seguidas pela administração de fludarabina a uma dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[00114] Em algumas modalidades, o método compreende ainda a etapa de tratar o paciente com um regime de IL-2 de alta dose começando no dia após a administração das células TIL ao paciente na etapa (f).

[00115] Em algumas modalidades, o regime de IL-2 de alta dose compreende 600000 ou 720000 UI/kg administrados como uma infusão intravenosa em bolus de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

[00116] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa (b) fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade.

[00117] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa (c) fornece pelo menos uma a cinco vezes ou mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[00118] Em algumas modalidades, 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).

[00119] Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido.

[00120] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

[00121] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo

que consiste em melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[00122] Em algumas modalidades, o câncer é melanoma.

[00123] Em algumas modalidades, o câncer é HNSCC.

[00124] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer cervical.

[00125] Em algumas modalidades, o câncer é NSCLC.

[00126] Em algumas modalidades, o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

[00127] Em algumas modalidades, o câncer é câncer gastrointestinal.

[00128] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer hipermutado.

[00129] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

[00130] Em algumas modalidades, o recipiente é um recipiente fechado.

[00131] Em algumas modalidades, o recipiente é um recipiente G.

[00132] Em algumas modalidades, o recipiente é um GREX-10.

[00133] Em algumas modalidades, o recipiente fechado compreende um GREX-100.

[00134] Em algumas modalidades, o recipiente fechado compreende um GREX-500.

[00135] A presente invenção também fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) feitos pelo método como aqui divulgado.

[00136] A presente invenção também fornece população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade.

[00137] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme divulgado neste documento, proporciona uma produção aumentada

de interferon-gama.

[00138] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme divulgado neste documento, fornece policlonalidade aumentada.

[00139] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme divulgado neste documento, fornece maior eficácia.

[00140] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[00141] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[00142] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[00143] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), em que a população terapêutica de TILs é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem adição de células apresentadoras de antígeno (APCs).

[00144] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas.

[00145] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs,

conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas.

[00146] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), em que a população terapêutica de TILs é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[00147] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[00148] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[00149] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), em que a população terapêutica de TILs é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem adição de células apresentadoras de antígeno (APCs) e sem adição de OKT3.

[00150] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem adição de

células apresentadoras de antígeno (APCs) e nenhum OKT3 adicionado.

[00151] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem adição de células apresentadoras de antígeno (APCs) e nenhum OKT3 adicionado.

[00152] A presente invenção também fornece uma composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) compreendendo a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

[00153] A presente invenção também fornece um saco de infusão estéril compreendendo a composição de TIL como aqui descrito.

[00154] A presente invenção também fornece uma preparação criopreservada da população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento.

[00155] A presente invenção também fornece uma composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) compreendendo a população terapêutica de TILs, conforme descrito neste documento, e um meio de criopreservação.

[00156] Em algumas modalidades, o meio de criopreservação contém DMSO.

[00157] Em algumas modalidades, o meio de criopreservação contém DMSO a 7% a 10%.

[00158] A presente invenção também fornece uma preparação criopreservada da composição de TIL como aqui descrito.

[00159] Em algumas modalidades, a composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), conforme descrito neste documento, é para uso como um medicamento.

[00160] Em algumas modalidades, a composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), conforme descrito neste documento, é para uso no

tratamento de um câncer.

[00161] Em algumas modalidades, a composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), conforme descrito neste documento, é para uso no tratamento de um câncer de tumor sólido.

[00162] Em algumas modalidades, a composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) como aqui descrito para uso no tratamento de um câncer selecionado de melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

[00163] Em algumas modalidades, a composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), conforme descrito neste documento, é para uso no tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, cânceres cervicais, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[00164] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é melanoma.

[00165] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é HNSCC.

[00166] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é para uso no tratamento de um câncer em que um câncer cervical.

[00167] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é NSCLC.

[00168] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

[00169] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é

para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é câncer gastrointestinal.

[00170] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é um câncer hipermutado.

[00171] Em algumas modalidades, a composição de TIL aqui descrita é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

[00172] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece o uso da composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) como descrito neste documento em um método de tratamento de câncer em um sujeito, compreendendo a administração de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL ao sujeito. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, cânceres cervicais, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal. Em algumas modalidades, o câncer é melanoma. Em algumas modalidades, o câncer é HNSCC. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer cervical. Em algumas modalidades, o câncer é NSCLC. Em algumas modalidades, o câncer é glioblastoma (incluindo GBM). Em algumas modalidades, o câncer é câncer gastrointestinal. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer hipermutado. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

[00173] Em algumas modalidades, a composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), conforme descrito neste documento, é para uso em um método de tratamento de câncer em um sujeito, compreendendo a administração de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL ao sujeito. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[00174] A presente invenção também fornece um método de tratamento de câncer em um sujeito compreendendo a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) como aqui descrito.

[00175] Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido.

[00176] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

[00177] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal. Em algumas modalidades, o

câncer é melanoma. Em algumas modalidades, o câncer é HNSCC. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer cervical. Em algumas modalidades, o câncer é NSCLC. Em algumas modalidades, o câncer é glioblastoma (incluindo GBM). Em algumas modalidades, o câncer é câncer gastrointestinal. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer hipermutado. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

[00178] A presente invenção também fornece um método de expansão de células T que compreende:

(a) realizar uma primeira expansão de iniciação de uma primeira população de células T obtida de um doador cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e para iniciar uma ativação da primeira população de células T;

(b) após a ativação da primeira população de células T iniciadas na etapa (a) começar a decair, realizar uma segunda expansão rápida da primeira população de células T cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e aumentar a ativação da primeira população de células T para obter uma segunda população de células T; e

(c) colher a segunda população de células T.

[00179] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de até 7 dias.

[00180] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 11 dias.

[00181] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 9 dias.

[00182] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de 7 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de 9 dias.

[00183] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de até 8 dias.

[00184] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 8 dias.

[00185] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de 8 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de 8 dias.

[00186] Em algumas modalidades do método, na etapa (a), a primeira população de células T é cultivada em um primeiro meio de cultura compreendendo OKT-3 e IL-2.

[00187] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura compreende OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

[00188] Em algumas modalidades do método, 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).

[00189] Em algumas modalidades do método, na etapa (a) a primeira população de células T é cultivada em um primeiro meio de cultura em um recipiente que compreende uma primeira superfície permeável a gás, em que o primeiro meio de cultura compreende opcionalmente OKT-3, IL-2 e opcionalmente uma primeira população de células apresentadoras de antígeno (APCs), em que a primeira população de APCs é exógena ao doador da primeira população de células T e a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás, em que em 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 ao doador da primeira população de células T e a segunda população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás, e em que a segunda população de APCs é maior do que a primeira população de APCs.

[00190] Em algumas modalidades, a razão entre o número de APCs na

segunda população de APCs e o número de APCs na primeira população de APCs é de cerca de 2:1.

[00191] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira população de APCs é de cerca de 2,5 x 10^8 e o número de APCs na segunda população de APCs é de cerca de 5 x 10^8.

[00192] Em algumas modalidades do método, na etapa (a) a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás com uma espessura média de 2 camadas de APCs.

[00193] Em algumas modalidades do método, na etapa (b) a segunda população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás em uma espessura média selecionada na faixa de 4 a 8 camadas de APCs.

[00194] Em algumas modalidades, a razão do número médio de camadas de APCs em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás na etapa (a) é 2:1.

[00195] Em algumas modalidades, as APCs são células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[00196] Em algumas modalidades, as APCs compreendem PBMCs, em que as PBMCs são irradiadas e exógenas ao doador da primeira população de células T.

[00197] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

[00198] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos infiltrantes de medula (MILs).

[00199] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos do sangue periférico (PBLs).

[00200] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células é um meio definido e/ou um meio sem soro.

[00201] Em algumas modalidades, o meio definido compreende transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) e albumina (opcionalmente recombinante).

[00202] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro.

[00203] Em algumas modalidades, o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, meio CTS™ AIM-V, SFM CTS™ AIM-V, meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), meio mínimo essencial (MEM), meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, meio mínimo essencial (αMEM), meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[00204] Em algumas modalidades, o suplemento de soro ou substituição de soro é selecionado a partir do grupo que consiste em suplemento sérico de expansão de células T CTS™ OpTmizer e substituição de soro celular imune CTS™.

[00205] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina.

[00206] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende um ou mais aminoácidos.

[00207] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina.

[00208] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina.

[00209] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos traço.

[00210] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende albumina.

[00211] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções químicas de elemento-traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}.

[00212] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

[00213] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende uma concentração total de substituição de soro (% em volume) de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio de cultura de células.

[00214] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende uma concentração total de substituição de soro de cerca de 3%, cerca de 5% ou cerca de 10% do volume total do meio de cultura de células.

[00215] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende ainda glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM, ou 4 mM a cerca de 5 mM.

[00216] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células

compreende ainda glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

[00217] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM, ou cerca de 65 mM.

[00218] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

[00219] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende os meios definidos descritos na Publicação Internacional PCT nº WO/1998/030679.

[00220] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende glicina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-histidina na faixa de cerca de 5 a 250 mg/l, L-isoleucina em na faixa de cerca de 5 a 300 mg/l, L-metionina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-fenilalanina na faixa de cerca de 5 a 400 mg/l, L-prolina na faixa de cerca de 1 a 1000 mg/l, L-hidroxiprolina na faixa de cerca de 1 a 45 mg/l, L-serina na faixa de cerca de 1 a 250 mg/l, L-treonina na faixa de cerca de 10 a 500 mg/l, L-triptofano na faixa de cerca de 2 a 110 mg/l, L-tirosina na faixa de cerca de 3 a 175 mg/l, L-valina na faixa de cerca de 5 a 500 mg/l, tiamina na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, glutationa reduzida na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, ácido L-ascórbico-2-fosfato na faixa de cerca de 1 a 200 mg/l, transferrina saturada de ferro na faixa de cerca de 1 a 50 mg/l, insulina na faixa de cerca de 1 a 100 mg/l, selenita de sódio na faixa de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e/ou albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) na faixa de cerca de 5000 a 50000 mg/l.

[00221] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende um ou mais dos ingredientes da porção química de elemento não-traço nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração em 1X meio" na Tabela A fornecida neste documento.

[00222] Em algumas modalidades, a osmolaridade do meio de cultura de células está entre cerca de 260 e 350 mOsmol.

[00223] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende ainda cerca de 3,7 g/l ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio.

[00224] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende ainda L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM) e/ou 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

[00225] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células no primeiro e/ou no segundo recipiente permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

[00226] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende SFM de expansão de células T CTS OpTmizer, substituição de soro celular imune CTS a 3%, BME a 55 mM e, opcionalmente, glutamina.

[00227] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende o meio basal de expansão de células T CTS™OpTmizer™ suplementado com o suplemento de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/l) e SR de células imune CTS™ a 3% e Glutamax a 2 mM, opcionalmente compreendendo ainda 6000 UI/ml de IL-2.

[00228] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende o meio basal de expansão de células T CTS™OpTmizer™ suplementado com o suplemento de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/l) e SR de células imune CTS™ a 3% e Glutamax a 2

mM, opcionalmente compreendendo ainda 3000 UI/ml de IL-2.

[00229] A presente invenção também fornece uma composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) que compreende:

i) uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), e

ii) meio definido ou meio sem soro opcionalmente compreendendo transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) e albumina (opcionalmente recombinante).

[00230] A presente invenção também fornece uma composição expandida de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) que compreende:

i) uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), e

ii) meio definido ou meio sem soro opcionalmente compreendendo transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) e albumina (opcionalmente recombinante).

[00231] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) e albumina (opcionalmente recombinante).

[00232] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro.

[00233] Em algumas modalidades, o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, meio CTS™ AIM-V, SFM CTS™ AIM-V, meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), meio mínimo essencial (MEM), meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, meio mínimo essencial (αMEM), meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), meio de crescimento RPMI e meio de Dulbecco

modificado por Iscove.

[00234] Em algumas modalidades, o suplemento de soro ou substituição de soro é selecionado a partir do grupo que consiste em suplemento sérico de expansão de células T CTS™ OpTmizer e substituição de soro celular imune CTS™.

[00235] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina.

[00236] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende um ou mais aminoácidos.

[00237] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina.

[00238] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina.

[00239] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos traço.

[00240] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende albumina.

[00241] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções químicas de elemento-traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}.

[00242] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro

compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

[00243] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende uma concentração de substituição de soro total (% em volume) de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio de cultura de células.

[00244] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende uma concentração de substituição de soro total de cerca de 3%, cerca de 5% ou cerca de 10% do volume total do meio de cultura de células.

[00245] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende ainda glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM, ou 4 mM a cerca de 5 mM.

[00246] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende ainda glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

[00247] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM, ou cerca de 65 mM.

[00248] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

[00249] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende os meios definidos descritos na Publicação Internacional PCT nº WO/1998/030679.

[00250] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende glicina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-histidina na faixa de cerca de 5 a 250 mg/l, L-isoleucina na faixa de desde cerca de 5 a 300 mg/l, L-metionina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-fenilalanina na faixa de cerca de 5 a 400 mg/l, L-prolina na faixa de cerca de 1 a 1000 mg/l, L-hidroxiprolina na faixa de cerca de 1 a 45 mg/l, L-serina na faixa de cerca de 1 a 250 mg/l, L-treonina na faixa de cerca de 10 a 500 mg/l, L-triptofano na faixa de cerca de 2 a 110 mg/l, L-tirosina na faixa de cerca de 3 a 175 mg/l, L-valina na faixa de cerca de 5 a 500 mg/l, tiamina na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, glutationa reduzida na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, ácido L-ascórbico-2-fosfato na faixa de cerca de 1 a 200 mg/l, transferrina saturada de ferro na faixa de cerca de 1 a 50 mg/l, insulina na faixa de cerca de 1 a 100 mg/l, selenita de sódio na faixa de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e/ou albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) na faixa de cerca de 5000 a 50000 mg/l.

[00251] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende um ou mais dos ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido que estão presentes nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração em 1X meio" na Tabela A fornecido aqui.

[00252] Em algumas modalidades, a osmolaridade do meio definido ou meio sem soro está entre cerca de 260 e 350 mOsmol.

[00253] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende ainda cerca de 3,7 g/l ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio.

[00254] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro compreende ainda L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM) e/ou 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

[00255] Em algumas modalidades, o meio definido ou meio sem soro

no primeiro e/ou no segundo recipiente permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

[00256] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende SFM de expansão de células T CTS OpTmizer, substituição de soro celular imune CTS a 3%, BME a 55 mM e, opcionalmente, glutamina.

[00257] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende o meio basal de expansão de células T CTS™OpTmizer™ suplementado com o suplemento de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/l) e SR de células imune CTS™ a 3% e Glutamax a 2 mM, opcionalmente compreendendo ainda 6000 UI/ml de IL-2.

[00258] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende o meio basal de expansão de células T CTS™OpTmizer™ suplementado com o suplemento de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ (26 ml/l) e SR de células imune CTS™ a 3% e Glutamax a 2 mM, opcionalmente compreendendo ainda 3000 UI/ml de IL-2.

[00259] Em algumas modalidades, a população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

[00260] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs exibe um aumento no IFN-γ sérico, em que o aumento no IFN-γ é maior que 200 pg/ml, maior que 250 pg/ml, maior que 300 pg/ml, maior que 350 pg/ml, maior que 400 pg/ml, maior que 450 pg/ml, maior que 500 pg/ml, maior que 550 pg/ml, maior que 600 pg/ml, maior que 650 pg/ml, maior que 700 pg/ml, maior que 750 pg/ml, maior que 800 pg/ml, maior que 850 pg/ml, maior que 900 pg/ml, maior que 950 pg/ml ou maior que 1000 pg/ml.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00261] **Figuras 1A a 1C: A)** Mostra uma comparação entre o processo 2A (processo de aproximadamente 22 dias) e uma modalidade do processo Gen 3 para a fabricação de TIL (processo de aproximadamente 14

dias a 16 dias). **B)** Gráfico exemplificativo do processo Gen3 que fornece uma visão geral das etapas de A a F (processo de aproximadamente 14 a 16 dias). **C)** Gráfico que fornece três processos Gen 3 exemplificativos com uma visão geral das etapas de A a F (processo de aproximadamente 14 a 16 dias) para cada uma das três variações de processo.

[00262] **Figura 2:** Fornece um fluxograma experimental para comparabilidade entre GEN 2 (processo 2A) versus GEN 3.

[00263] **Figuras 3A a 3C: A)** L4054 - Caracterização fenotípica no produto TIL no processo Gen 2 e Gen 3. **B)** Caracterização fenotípica de L4055 no produto TIL no processo Gen 2 e Gen 3. **C)** Caracterização fenotípica de M1085T no produto TIL no processo Gen 2 e Gen 3.

[00264] **Figuras 4A a 4C**: **A)** L4054 - Análise de marcadores de memória no produto TIL dos processos Gen 2 e Gen 3. **B)** L4055 - Análise de marcadores de memória no produto TIL dos processos Gen 2 e Gen 3. **C)** M1085T- Análise de marcadores de memória no produto TIL dos processos Gen 2 e Gen 3.

[00265] **Figura 5:** Marcadores de ativação e exaustão de L4054 **(A)** bloqueados em CD4+, **(B)** bloqueados em CD8+.

[00266] **Figura 6:** Marcadores de ativação e exaustão de L4055 **(A)** bloqueados em CD4+, **(B)** bloqueados em CD8+.

[00267] **Figura 7:** Produção de IFNγ (pg/ml): (A) L4054, (B) L4055, e (C) M1085T para os processos Gen 2 e Gen 3: Cada barra representada aqui é média + SEM para níveis de IFNγ de estimulado, não estimulado e controle de meio. Densidade óptica medida a 450 nm.

[00268] **Figura 8:** Análise de ELISA da concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura de células: **(A) L4054** e **(B) L4055**. Cada barra representada aqui é a média + SEM para os níveis de IL-2 no meio gasto. Densidade óptica medida a 450 nm.

[00269] **Figura 9:** Quantificação de glicose e lactato (g/l) em meio

gasto: (A) Glicose e (B) Lactato: Nas duas linhas de tumor, e em ambos os processos, foi observada uma diminuição na glicose ao longo da expansão REP. Por outro lado, como esperado, um aumento no lactato foi observado. Tanto a diminuição da glicose quanto o aumento do lactato foram comparáveis entre os processos Gen 2 e Gen 3.

[00270] **Figura 10: A)** Quantificação de L-glutamina em meio gasto para L4054 e L4055. **B)** Quantificação de Glutamax em meio gasto para L4054 e L4055. C) Quantificação de amônia em meio gasto para L4054 e L4055.

[00271] **Figura 11:** Análise do comprimento do telômero. O valor do comprimento relativo do telômero (RTL) indica que a fluorescência média do telômero por cromossomo/genoma no processo Gen 2 e Gen 3 da fluorescência do telômero por cromossomo/genoma na linha de células de controle (linha de células de leucemia 1301) usando o kit DAKO.

[00272] **Figura 12:** Análise de sequência CDR3 única para o produto final TIL em L4054 e L4055 sob o processo Gen 2 e Gen 3. As colunas mostram o número de clonotipos TCR B únicos identificados a partir de 1×10^6 células coletadas no Dia da Colheita Gen 2 (por exemplo, dia 22) e processo Gen 3 (por exemplo, dias 14 a 16). Gen 3 mostra maior diversidade clonal em comparação com Gen 2 com base no número de CDRs de peptídeos únicos na amostra.

[00273] **Figura 13:** Frequência de sequências CDR3 únicas no produto celular final colhido por L4054 IL (Gen 2 (por exemplo, dia 22) e processo Gen 3 (por exemplo, dias 14 a 16)).

[00274] **Figura 14:** Frequência de sequências CDR3 únicas no produto celular final colhido L4055 TIL (Gen 2 (por exemplo, dia 22) e processo Gen 3 (por exemplo, dias 14 a 16)).

[00275] **Figura 15:** 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

entropia de Shanon é uma métrica mais confiável e comum para comparação. Gen 3 L4054 e L4055 mostraram uma diversidade ligeiramente maior do que Gen 2.

[00276] **Figura 16:** Dados brutos para as contagens de células da iniciação do REP do Dia 7 - Gen 3 apresentados na Tabela 22 (consultar Exemplo 5 abaixo).

[00277] **Figura 17:** Dados brutos para contagens de células Dia 11 - iniciação de REP Gen 2 e aumento de escala de Gen 3 apresentados na Tabela 22 (consultar Exemplo 5 abaixo).

[00278] **Figura 18:** Dados brutos para contagens de células Dia 16 - aumento de escala Gen 2 e colheita de Gen 3 (por exemplo, dia 16) apresentados na Tabela 23 (consultar Exemplo 5 abaixo).

[00279] **Figura 19:** Dados brutos para contagens do Dia 22 - Colheita de Gen 2 (por exemplo, dia 22) apresentados na Tabela 23 (consultar Exemplo 5 abaixo). Para L4054 Gen 2, a contagem pós-LOVO foi extrapolada para 4 frascos, pois era o número total do estudo. 1 frasco estava contaminado e a extrapolação foi feita para o total = 6,67E + 10.

[00280] **Figura 20:** Dados brutos para resultados de citometria de fluxo representados nas Figuras 3A, 4A e 4B.

[00281] **Figura 21:** Dados brutos para resultados de citometria de fluxo representados nas Figuras 3C e 4C.

[00282] **Figura 22:** Dados brutos para resultados de citometria de fluxo representados nas Figuras 5 e 6.

[00283] **Figura 23:** Dados brutos para os resultados do ensaio de produção de IFNγ para as amostras L4054 representadas na Figura 7.

[00284] **Figura 24:** Dados brutos para os resultados do ensaio de produção de IFNγ para as amostras L4055 representadas na Figura 7.

[00285] **Figura 25:** Dados brutos para os resultados do ensaio de produção de IFNγ para as amostras M1085T representadas na Figura 7.

[00286] **Figura 26:** Dados brutos para os resultados do ensaio IL-2 ELISA representados na Figura 8.

[00287] **Figura 27:** Dados brutos para o substrato metabólico e resultados da análise metabólica apresentados nas Figuras 9 e 10.

[00288] **Figura 28:** Dados brutos para os resultados da análise do comprimento relativo dos telômeros apresentados na Figura 11.

[00289] **Figura 29:** Dados brutos para a sequência única de CD3 e resultados de análises de diversidade clonal apresentados nas Figuras 12 e 15.

[00290] **Figura 30:** Mostra uma comparação entre vários Gen 2 (processo 2A) e a modalidade do processo Gen 3.1.

[00291] **Figura 31:** Tabela que descreve vários recursos de modalidades do processo Gen 2, Gen 2.1 e Gen 3.0.

[00292] **Figura 32:** Visão geral das condições de meio para uma incorporação do processo Gen 3, referido como Gen 3.1.

[00293] **Figura 33:** Tabela que descreve vários recursos de modalidades do processo Gen 2, Gen 2.1 e Gen 3.0.

[00294] **Figura 34:** Tabela comparando vários recursos de modalidades dos processos Gen 2 e Gen 3.0.

[00295] **Figura 35:** Tabela que fornece os usos de meio nas várias modalidades dos processos de expansão descritos.

[00296] **Figura 36:** Comparação de fenótipos: as modalidades de Gen 3.0 e Gen 3.1 do processo mostraram expressão comparável de CD28, CD27 e CD57. O teste Gen 3.1 (que inclui a adição de OKT-3 e alimentadoras no dia 0) atingiu a capacidade máxima do frasco na colheita.

[00297] **Figura 37:** Maior produção de IFNγ no produto final Gen 3. A análise de IFNγ (por ELISA) foi avaliada no sobrenadante da cultura congelada para comparar os dois processos. Para cada estimulação do tumor durante a noite com placa anti-CD3 revestida, usando produto TIL fresco em cada Gen 2 (por exemplo, dia 22) e processo Gen 3 (por exemplo, dia 16).

Cada barra representa aqui os níveis de IFNγ de controle estimulado, não estimulado e de meio.

[00298] **Figura 38:** A) Análise de sequência CDR3 única para o produto final de TIL: As colunas mostram o número de clonotipos TCR B exclusivos identificados a partir de 1×10^6 células coletadas em Gen 2 (por exemplo, dia 22) e processo Gen 3 (por exemplo, dias 14 a 16). Gen 3 mostra maior diversidade clonal em comparação com Gen 2 com base no número de CDRs de peptídeos únicos na amostra. B) Índice de diversidade para o produto final TIL: o índice de diversidade de entropia de Shanon é uma métrica comum mais confiável para comparação. Gen 3 mostrou uma diversidade ligeiramente maior do que Gen 2. C) Análise de sequência única de CDR3 para o produto final de TIL em L4063 e L4064 sob Gen 3, controle de Gen 3.1 e processos de teste de Gen 3.1. As colunas mostram o número de clonotipos TCR B únicos identificados a partir de 1 x 10^6 células coletadas no dia 16 da colheita, para os processos Gen 3 e Gen 3.1. Gen 3.1 mostrou uma diversidade clonal ligeiramente maior em comparação com Gen 3 com base no número de CDRs de peptídeo único dentro da amostra. D) Índice de diversidade para o produto final TIL em L4063 e L4064 sob Gen 3. Processos de controle Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1. O índice de diversidade de entropia de Shannon é uma métrica mais confiável e comum para comparação. As condições Gen 3.1 em L4063 e L4064 mostraram uma diversidade ligeiramente maior do que o processo Gen 3.

[00299] **Figura 39**: 199 sequências são compartilhadas entre o produto final Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 97,07% dos 80% superiores das sequências CDR3 únicas de Gen 2 compartilhadas com o produto final Gen 3.

[00300] **Figura 40**: 1833 sequências são compartilhadas entre o produto final Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 99,45% dos 80% superiores das sequências CDR3 únicas de Gen 2 compartilhadas com o produto final Gen 3.

[00301] **Figura 41:** Esquema de uma modalidade exemplificativa do processo Gen 3 (um processo de 16 dias).

[00302] **Figura 42:** Esquema de uma modalidade exemplificativa para expandir TILs de doenças malignas hematopoiéticas usando o processo Gen 3. No Dia 0, uma fração de células T (CD3+, CD45+) é isolada de um produto de aférese enriquecido para linfócitos, sangue total ou digestão de tumor (fresco ou descongelado) usando métodos de seleção positiva ou negativa, ou seja, removendo as células T usando um Marcador de células T (CD2, CD3, etc., ou remoção de outras células que deixam células T) ou centrifugação em gradiente.

[00303] **Figura 43:** Esquema de uma modalidade exemplificativa do processo Gen 3 (um processo de 16 dias).

[00304] **Figura 44:** Fornece uma visão geral do processo para uma modalidade exemplificativa (Teste Gen 3.1) do processo Gen 3.1 (um processo de 16 dias).

[00305] **Figura 45:** Fornece dados de proliferação de TIL, contagens de células viáveis totais médias por fragmento de tumor, viabilidade percentual no Dia da Colheita e contagens de células viáveis totais (TVC) no Dia da Colheita para modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1). O teste Gen 3.1 (que inclui a adição de OKT-3 e alimentadoras no Dia 0) atingiu a capacidade máxima do frasco na colheita. Se um máximo de 4 frascos forem iniciados no dia 0, cada colheita de TVC deve ser multiplicada por 4.

[00306] **Figura 46:** Gráfico de barras que representa a contagem total de células viáveis (TVC) e a viabilidade percentual para modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1), um processo de 16 dias.

[00307] **Figura 47:** fornece dados que mostram que modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de

Gen 3.1) produziram células que mostraram expressão comparável de CD28, CD27 e CD57.

[00308] **Figura 48:** Fornece dados que mostram que os status de memória TIL eram comparáveis ao longo de células produzidas por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1). Os status da memória de REP TIL são descritos a seguir: subconjuntos de memória de TIL CD4+ ou CD8+ foram divididos em diferentes subconjuntos de memória. Virgem (CD45RA+CD62L+), CM: Memória central (CD45RA-CD62L+), EM: Memória Efetora (CD45RA-CD62L-), TEMRA/TEFF: RA+ Memória Efetora/Efetores (CD45RA+CD62L+). O gráfico de barras apresentado é uma porcentagem positiva de CD45+/- CD62L+/- quando bloqueadas em CD4+ ou CD8+.

[00309] **Figura 49:** Fornece dados que mostram que os marcadores de ativação/exaustão de TIL eram comparáveis entre células produzidas por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) quando bloqueados em CD4+. A ativação e exaustão do REP TIL foram determinadas por citometria de fluxo multicolor. Amostras TIL colhidas foram coradas com anticorpos de citometria de fluxo (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710, CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). O gráfico de barras apresentado é a porcentagem de TIL de CD4+ ou CD8+ de REP TIL.

[00310] **Figura 50:** Fornece dados que mostram que os marcadores de ativação/exaustão de TIL eram comparáveis entre células produzidas por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Gen 3.1) quando bloquados em CD8+. A ativação e exaustão do REP TIL foram determinadas por citometria de fluxo multicolor. As amostras

colhidas TIL foram coradas com anticorpos de citometria de fluxo (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710, CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). O gráfico de barras apresentado é a porcentagem de TIL de CD4+ ou CD8+ de REP TIL.

[00311] **Figura 51:** Fornece dados mostrando maior produção de IFN-γ exibida pelo produto final Gen 3.1. Análise ELISA de IFNγ foi avaliada no sobrenadante da cultura congelada para comparar os dois processos. Para cada estimulação do tumor durante a noite com placa anti-CD3 revestida, usando produto TIL fresco em cada dia de colheita. Cada barra representa aqui os níveis de IFN-γ de controle estimulado, não estimulado e de meio.

[00312] **Figura 52:** Fornece dados que mostram que a concentração de IL-2 no sobrenadante era comparável em modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1) usando meio padrão. Painel esquerdo: L4063 - Mídia padrão Gen 2. Painel direito: L4064 - CTS Optimizer Media. *ELISA realizado com diluente AIM V

[00313] **Figura 53:** Fornece dados que mostram que as concentrações de metabólitos eram comparáveis em sobrenadantes em modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1). TILs L4063 foram expandidos em meio padrão. TILs L4064 foram expandidos em meio CTS Optimizer.

[00314] **Figura 54:** Análise de comprimento de telômero em modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1). Análise do comprimento do telômero para células produzidas pelos números de identificação de tumor L4063 e L4064: o valor do comprimento relativo do telômero (RTL) indica a fluorescência média do telômero por cromossomo/genoma em células produzidas pelos processos

Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1 sobre o telômero fluorescência por cromossomo/genoma na linha de células de controle (linha de células de leucemia 1301) usando o kit DAKO.

[00315] **Figura 55:** Esquema de uma modalidade exemplificativa do processo de teste Gen 3.1 (Gen 3.1 otimizado) (um processo de 16 a 17 dias).

[00316] **Figura 56:** Esquema de uma modalidade exemplificativa do processo Gen 3 exemplificativo (um processo de 16 dias).

[00317] **Figura 57A e 57B:** Tabelas de comparação para processos Gen 2 exemplificativo e Gen 3 exemplificativo com diferenças exemplificativas destacadas.

[00318] **Figura 58:** Esquema de uma modalidade exemplificativa do processo Gen 3 (um processo de 16/17 dias) cronograma de preparação.

[00319] **Figura 59:** Esquema de uma modalidade exemplificativa do processo Gen 3 (um processo de 14 a 16 dias).

[00320] **Figura 60:** Resumo dos dados do Dia 16/17 de três execuções de engenharia de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo.

[00321] **Figura 61:** Dados relativos ao fenótipo estendido de TIL: são mostradas as características de diferenciação em relação às especificações de identidade (ID) de TIL para células produzidas por duas execuções de engenharia de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo.

[00322] **Figura 62:** Dados relativos ao fenótipo estendido de TIL expandido de tumores de pulmão: são mostradas as características de diferenciação contra especificações de identidade (ID) de TIL para células produzidas por duas execuções de desenvolvimento de processo (PD) de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo usando tecidos de tumor de pulmão.

[00323] **Figura 63:** Dados sobre o fenótipo estendido (pureza, identidade e memória) de TIL expandido de tumores ovarianos: são mostradas as características fenotípicas de pureza, identidade e memória de células

expandidas de tumores ovarianos usando modalidades de processo Gen 2, Gen 3.1 e FR ER exemplificativo (Tumor congelado, Early REP); * indica condição não testada; Y indica problema de amostragem, baixa contagem de TVC ou células não viáveis no descongelamento.

[00324] **Figura 64:** É mostrada a estratégia de bloqueio para caracterização de TIL (hierarquia de bloqueio é mostrada) e dados relativos às características fenotípicas estendidas de células produzidas por duas execuções de engenharia de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo.

[00325] **Figura 65:** É mostrada a estratégia de passagem para caracterização de TIL (a hierarquia de passagem é mostrada) e dados sobre as características fenotípicas estendidas da subpopulação CD4+ e a subpopulação CD8+ de células produzidas por duas execuções de engenharia de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo.

[00326] **Figura 66:** São apresentados os dados relativos à análise de Granzyme B ELISA de células produzidas por duas execuções de engenharia de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo.

[00327] **Figura 67A e 67B:** Esquema de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo (um processo de 16 dias).

[00328] **Figura 68:** Esquema de uma modalidade exemplificativa do processo Gen 3 (um processo de 16 dias).

[00329] **Figura 69:** Comparação de Gen 2, Gen 2.1 e uma modalidade do processo Gen 3 (um processo de 16 dias).

[00330] **Figura 70:** Comparação de Gen 2, Gen 2.1 e uma modalidade do processo Gen 3 (um processo de 16 dias).

[00331] **Figura 71:** componentes da modalidade Gen 3.

[00332] **Figura 72:** comparação do fluxograma da modalidade Gen 3 (Gen 3.0, controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1).

[00333] **Figura 73:** A contagem total de células viáveis e a expansão

em dobras são apresentadas para modalidades exemplificativas de Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro.

[00334] **Figura 74:** % de pontuação de viabilidade após reativação, aumento de escala de cultura e colheita de TIL são apresentados para modalidades exemplificativas de Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meios de cultura de células padrão e meios de cultura de células sem soro.

[00335] **Figura 75:** É apresentada a caracterização fenotípica do produto TIL final produzido pelo processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células CTS sem soro.

[00336] **Figura 76:** É apresentada a análise de marcador de memória do produto TIL produzido pelo processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS.

[00337] **Figura 77:** São apresentados marcadores de ativação e exaustão de TIL produzidos pelo processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células CTS livre de soro seguido por classificação de célula bloqueada por CD4+.

[00338] **Figura 78:** São apresentados marcadores de ativação e exaustão de TIL produzidos pelo processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células livre de soro CTS seguido por classificação de célula

bloqueada por CD8+.

[00339] **Figura 79:** São apresentadas as pontuações de produção de IFN-γ (pg/ml) para o produto TIL final produzido pelo processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meios de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS.

[00340] **Figura 80:** É apresentada a análise da concentração de IL-2 (pg/ml) do meio gasto (coletado após a reativação, aumento de escala da cultura e colheita de TIL) do processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS.

[00341] **Figura 81:** É apresentada a concentração de glicose (g/l) em meio gasto (coletado após reativação, aumento de escala de cultura e colheita de TIL) do processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1e) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS.

[00342] **Figura 82:** É apresentada a concentração de lactato (g/l) em meio gasto (coletado após reativação, aumento de escala de cultura e colheita de TIL) do processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1e) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS.

[00343] **Figura 83:** É apresentada a concentração de glutamina (mmol/l) em meio gasto (coletado após a reativação, aumento de escala de cultura e colheita de TIL) do processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1e) usando meio de cultura de células padrão e meio de

cultura de células sem soro CTS.

[00344] **Figura 84:** É apresentada a concentração de glutamax (mmol/l) em meio gasto (coletado após a reativação, aumento de escala de cultura e colheita de TIL) do processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1e) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS.

[00345] **Figura 85:** É apresentada a concentração de amônia (mmol/l) em meio gasto (coletado após a reativação, aumento de escala de cultura e colheita de TIL) do processamento de amostras de tumor L4063 e L4064 em processos Gen 3 exemplificativos (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS. Análise de comprimento de telômero em modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1). Análise do comprimento do telômero para células produzidas pelos números de identificação de tumor L4063 e L4064: o valor do comprimento relativo do telômero (RTL) indica a fluorescência média do telômero por cromossomo/genoma em células produzidas pelos processos Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1 sobre o telômero fluorescência por cromossomo/genoma na linha de células de controle (linha de células de leucemia 1301) usando o kit DAKO.

[00346] **Figura 86:** Análise de comprimento de telômero em TIL produzido por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS. Análise do comprimento do telômero para células produzidas pelos números de identificação de tumor L4063 e L4064: o valor do comprimento relativo do telômero (RTL) indica a fluorescência média do telômero por cromossomo/genoma em células produzidas pelos processos Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1

sobre o telômero fluorescência por cromossomo/genoma na linha de células de controle (linha de células de leucemia 1301) usando o kit DAKO.

[00347] **Figura 87:** Resumo do repertório TCR Vβ para TIL produzido por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1) usando meio de cultura de células padrão e meio de cultura de células sem soro CTS. É descrita a clonalidade de TIL para o produto TIL final produzido pelos números de identificação de tumor L4063 e L4064 produzidos pelos processos Gen 3.0, Controle de Gen 3.1 e Teste de Gen 3.1, conforme medido pelo repertório TCR Vβ de sequências CDR3 únicas.

[00348] **Figura 88:** Comparação de TIL produzido por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1) em relação à frequência de sequências CDR3 únicas no produto colhido por TIL do processamento de amostras de tumor L4063.

[00349] **Figura 89:** Comparação de TIL produzido por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1) em relação à porcentagem de sequências CDR3 únicas compartilhadas em produto celular colhido por TIL do processamento de amostras de tumor L4063: 975 sequências são compartilhadas entre o produto final Gen 3.0 e Teste de Gen 3.1, equivalente a 88% dos 80% principais das sequências CDR3 exclusivas de Gen 3.0 compartilhadas com o produto final Teste de Gen 3.1.

[00350] **Figura 90:** Comparação de TIL produzida por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1) em relação à porcentagem de sequências CDR3 únicas compartilhadas em produto celular colhido por TIL para processamento de amostras de tumor L4064: 2.163 sequências são compartilhadas entre o produto final de teste Gen 3.0 e Gen 3.1, equivalente a 87% dos 80% principais das sequências CDR3 exclusivas de Gen 3.0 compartilhadas com o

produto final de teste de Gen 3.1.

[00351] **Figura 91:** Comparação de TIL produzido por modalidades exemplificativas do processo Gen 3 (Gen 3.0, Controle de Gen 3.1, Teste de Gen 3.1) em relação à frequência de sequências CDR3 únicas no produto colhido por TIL do processamento de amostras de tumor L4064.

[00352] **Figura 92:** São mostrados os componentes de uma modalidade de processo Gen 3 exemplificativo (Gen 3-Optimized, um processo de 16 a 17 dias).

[00353] **Figura 93:** Tabela de critérios de aceitação.

[00354] **Figura 94:** Dia de reativação da contagem de células.

[00355] **Figura 95:** Dia de aumento de escala de contagens de células.

[00356] **Figura 96:** Contagens de células Colheita L4063.

[00357] **Figura 97:** Contagens de células Colheita L4064.

[00358] **Figura 98:** Dados de fluxo.

[00359] **Figura 99:** Dados de fluxo.

[00360] **Figura 100:** Dados de fluxo.

[00361] **Figura 101:** Dados de fluxo.

[00362] **Figura 102:** Dados de produção de IFN-γ Figura 7-L4063.

[00363] **Figura 103:** Dados de produção de IFN-γ Figura 7-L4064.

[00364] **Figura 104:** Análise ELISA dos dados de concentração de IL-2.

[00365] **Figura 105:** Tabela de resumo de dados metabólicos.

[00366] **Figura 106:** Dados resumidos.

[00367] **Figura 107:** Dados resumidos.

[00368] **Figura 108:** Índice de diversidade de Shannon.

[00369] **Figura 109:** Gráfico do Processo Exemplificativo 2A fornecendo uma visão geral das Etapas A a F.

[00370] **Figura 110:** Fornece as estruturas I-A e I-B, os cilindros se referem a domínios de ligação de polipeptídeo individuais. As estruturas I-A e

I-B compreendem três domínios de ligação de TNFRSF linearmente ligados derivados de, por exemplo, 4-1BBL ou um anticorpo que se liga a 4-1BB, que se dobra para formar uma proteína trivalente, que é então ligada a uma segunda proteína trivalente através de IgG1-Fc (incluindo domínios CH3 e CH2) é então usado para ligar duas das proteínas trivalentes através de ligações dissulfeto (pequenas ovais alongadas), estabilizando a estrutura e fornecendo agonistas capazes de reunir os domínios de sinalização intracelular dos seis receptores e proteínas de sinalização para formar um complexo de sinalização. Os domínios de ligação de TNFRSF denotados como cilindros podem ser domínios scFv compreendendo, por exemplo, uma cadeia VH e uma VL conectadas por um ligante que pode compreender resíduos hidrofílicos e sequências Gly e Ser para flexibilidade, bem como Glu e Lys para solubilidade.

[00371] **Figura 111: Visão geral dos processos Gen 2 e Gen 3 usando amostras de biópsia.**

[00372] **Figura 112: Modalidade exemplificativa dos processos Gen 3.**

BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[00373] SEQ ID NO: 1 é a sequência de aminoácidos da cadeia pesada de muromonab.

[00374] SEQ ID NO: 2 é a sequência de aminoácidos da cadeia leve de muromonab.

[00375] SEQ ID NO: 3 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-2 humana recombinante.

[00376] SEQ ID NO: 4 é a sequência de aminoácidos de aldesleucina.

[00377] SEQ ID NO: 5 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-4 humana recombinante.

[00378] SEQ ID NO: 6 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-7 humana recombinante.

[00379] SEQ ID NO: 7 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-15 humana recombinante.

[00380] SEQ ID NO: 8 é a sequência de aminoácidos de uma proteína IL-21 humana recombinante.

[00381] SEQ ID NO: 9 é a sequência de aminoácidos de 4-1BB humano.

[00382] SEQ ID NO: 10 é a sequência de aminoácidos de 4-1BB murino.

[00383] SEQ ID NO: 11 é a cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00384] SEQ ID NO: 12 é a cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00385] SEQ ID NO: 13 é a região variável da cadeia pesada (VH) para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00386] SEQ ID NO: 14 é a região variável da cadeia leve (VL) para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00387] SEQ ID NO: 15 é a CDR1 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00388] SEQ ID NO: 16 é a CDR2 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00389] SEQ ID NO: 17 é a CDR3 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00390] SEQ ID NO: 18 é a CDR1 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00391] SEQ ID NO: 19 é a CDR2 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00392] SEQ ID NO: 20 é a CDR3 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB utomilumabe (PF-05082566).

[00393] SEQ ID NO: 21 é a cadeia pesada para o anticorpo monoclonal

agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00394] SEQ ID NO: 22 é a cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00395] SEQ ID NO: 23 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00396] SEQ ID NO: 24 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00397] SEQ ID NO: 25 é a CDR1 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00398] SEQ ID NO: 26 é a CDR2 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00399] SEQ ID NO: 27 é a CDR3 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00400] SEQ ID NO: 28 é a CDR1 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00401] SEQ ID NO: 29 é a CDR2 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00402] SEQ ID NO: 30 é a CDR3 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista 4-1BB urelumabe (BMS-663513).

[00403] SEQ ID NO: 31 é um domínio Fc para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00404] SEQ ID NO: 32 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00405] SEQ ID NO: 33 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00406] SEQ ID NO: 34 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00407] SEQ ID NO: 35 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00408] SEQ ID NO: 36 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00409] SEQ ID NO: 37 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00410] SEQ ID NO: 38 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00411] SEQ ID NO: 39 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00412] SEQ ID NO: 40 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00413] SEQ ID NO: 41 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00414] SEQ ID NO: 42 é um domínio Fc para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00415] SEQ ID NO: 43 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00416] SEQ ID NO: 44 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00417] SEQ ID NO: 45 é um ligante para uma proteína de fusão agonista de TNFRSF.

[00418] SEQ ID NO: 46 é uma sequência de aminoácidos do ligante 4-1BB (4-1BBL).

[00419] SEQ ID NO: 47 é uma porção solúvel do polipeptídeo 4-1BBL.

[00420] SEQ ID NO: 48 é uma região variável de cadeia pesada (V_H) para o anticorpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versão 1.

[00421] SEQ ID NO: 49 é uma região variável de cadeia leve (V_L) para o anticorpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versão 1.

[00422] SEQ ID NO: 50 é uma região variável de cadeia pesada (V_H)

para o anticorpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versão 2.

[00423] SEQ ID NO: 51 é uma região variável de cadeia leve (V_L) para o anticorpo agonista 4-1BB 4B4-1-1 versão 2.

[00424] SEQ ID NO: 52 é uma região variável de cadeia pesada (V_H) para o anticorpo agonista 4-1BB H39E3-2.

[00425] SEQ ID NO: 53 é uma região variável de cadeia leve (V_L) para o anticorpo agonista 4-1BB H39E3-2.

[00426] SEQ ID NO: 54 é a sequência de aminoácidos de OX40 humano.

[00427] SEQ ID NO: 55 é a sequência de aminoácidos de OX40 murino.

[00428] SEQ ID NO: 56 é a cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00429] SEQ ID NO: 57 é a cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00430] SEQ ID NO: 58 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00431] SEQ ID NO: 59 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00432] SEQ ID NO: 60 é a CDR1 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00433] SEQ ID NO: 61 é a CDR2 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00434] SEQ ID NO: 62 é a CDR3 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00435] SEQ ID NO: 63 é a CDR1 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00436] SEQ ID NO: 64 é a CDR2 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00437] SEQ ID NO: 65 é a CDR3 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 tavolixizumabe (MEDI-0562).

[00438] SEQ ID NO: 66 é a cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00439] SEQ ID NO: 67 é a cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00440] SEQ ID NO: 68 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00441] SEQ ID NO: 69 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00442] SEQ ID NO: 70 é a CDR1 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00443] SEQ ID NO: 71 é a CDR2 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00444] SEQ ID NO: 72 é a CDR3 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00445] SEQ ID NO: 73 é a CDR1 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00446] SEQ ID NO: 74 é a CDR2 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00447] SEQ ID NO: 75 é a CDR3 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 11D4.

[00448] SEQ ID NO: 76 é a cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00449] SEQ ID NO: 77 é a cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00450] SEQ ID NO: 78 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00451] SEQ ID NO: 79 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o

anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00452] SEQ ID NO: 80 é a CDR1 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00453] SEQ ID NO: 81 é a CDR2 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00454] SEQ ID NO: 82 é a CDR3 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00455] SEQ ID NO: 83 é a CDR1 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00456] SEQ ID NO: 84 é a CDR2 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00457] SEQ ID NO: 85 é a CDR3 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 18D8.

[00458] SEQ ID NO: 86 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00459] SEQ ID NO: 87 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00460] SEQ ID NO: 88 é a CDR1 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00461] SEQ ID NO: 89 é a CDR2 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00462] SEQ ID NO: 90 é a CDR3 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00463] SEQ ID NO: 91 é a CDR1 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00464] SEQ ID NO: 92 é a CDR2 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00465] SEQ ID NO: 93 é a CDR3 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu119-122.

[00466] SEQ ID NO: 94 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00467] SEQ ID NO: 95 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00468] SEQ ID NO: 96 é a CDR1 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00469] SEQ ID NO: 97 é a CDR2 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00470] SEQ ID NO: 98 é a CDR3 da cadeia pesada para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00471] SEQ ID NO: 99 é a CDR1 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00472] SEQ ID NO: 100 é a CDR2 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00473] SEQ ID NO: 101 é a CDR3 da cadeia leve para o anticorpo monoclonal agonista OX40 Hu106-222.

[00474] SEQ ID NO: 102 é uma sequência de aminoácidos do ligante OX40 (OX40L).

[00475] SEQ ID NO: 103 é uma porção solúvel do polipeptídeo OX40L.

[00476] SEQ ID NO: 104 é uma porção solúvel alternativa do polipeptídeo OX40L.

[00477] SEQ ID NO: 105 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 008.

[00478] SEQ ID NO: 106 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 008.

[00479] SEQ ID NO: 107 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 011.

[00480] SEQ ID NO: 108 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o

anticorpo monoclonal agonista OX40 011.

[00481] SEQ ID NO: 109 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 021.

[00482] SEQ ID NO: 110 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 021.

[00483] SEQ ID NO: 111 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 023.

[00484] SEQ ID NO: 112 é a região variável da cadeia leve (V_L) para o anticorpo monoclonal agonista OX40 023.

[00485] SEQ ID NO: 113 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para um anticorpo monoclonal agonista OX40.

[00486] SEQ ID NO: 114 é a região variável da cadeia leve (V_L) para um anticorpo monoclonal agonista OX40.

[00487] SEQ ID NO: 115 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para um anticorpo monoclonal agonista OX40.

[00488] SEQ ID NO: 116 é a região variável da cadeia leve (V_L) para um anticorpo monoclonal agonista OX40.

[00489] SEQ ID NO: 117 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00490] SEQ ID NO: 118 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00491] SEQ ID NO: 119 é a região variável da cadeia leve (V_L) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00492] SEQ ID NO: 120 é a região variável da cadeia leve (V_L) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00493] SEQ ID NO: 121 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00494] SEQ ID NO: 122 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00495] SEQ ID NO: 123 é a região variável da cadeia leve (V_L) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00496] SEQ ID NO: 124 é a região variável da cadeia leve (V_L) para um anticorpo monoclonal agonista OX40 humanizado.

[00497] SEQ ID NO: 125 é a região variável da cadeia pesada (V_H) para um anticorpo monoclonal agonista OX40.

[00498] SEQ ID NO: 126 é a região variável da cadeia leve (V_L) para um anticorpo monoclonal agonista OX40.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. DEFINIÇÕES

[00499] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado que é comumente entendido por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Todas as patentes e publicações aqui referidas são incorporadas a título de referência na sua totalidade.

[00500] O termo "*in vivo*" se refere a um evento que ocorre no corpo de um sujeito.

[00501] O termo "*in vitro*" se refere a um evento que ocorre fora do corpo de um sujeito. Os ensaios *in vitro* abrangem ensaios baseados em células em que células vivas ou mortas são empregadas e também podem abranger um ensaio sem células em que nenhuma célula intacta é empregada.

[00502] O termo "*ex vivo*" se refere a um evento que envolve o tratamento ou a realização de um procedimento em uma célula, tecido e/ou órgão que foi removido do corpo de um sujeito. Adequadamente, a célula, tecido e/ou órgão pode ser devolvido ao corpo do sujeito em um método de cirurgia ou tratamento.

[00503] O termo "expansão rápida" significa um aumento no número de TILs específicos do antígeno de pelo menos cerca de 3 vezes (ou 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 vezes) durante um período de uma semana, mais preferencialmente

pelo menos cerca de 10 vezes (ou 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 vezes) ao longo de um período de uma semana, ou mais preferencialmente em pelo menos cerca de 100 vezes ao longo de um período de uma semana. Vários protocolos de expansão rápida são descritos abaixo.

[00504] Por "linfócitos infiltrantes de tumor" ou "TILs" neste documento, entende-se uma população de células originalmente obtidas como glóbulos brancos que deixaram a corrente sanguínea de um sujeito e migraram para um tumor. Os TILs incluem, porém sem limitação, células T citotóxicas $CD8^+$ (linfócitos), células T $CD4^+$ Th1 e Th17, células exterminadoras naturais, células dendríticas e macrófagos M1. TILs incluem TILs primários e secundários. "TILs primários" são aqueles que são obtidos a partir de amostras de tecido de paciente, conforme descrito neste documento (às vezes referido como “obtidos recentemente" ou “isolados recentemente"), e "TILs secundários" são quaisquer populações de células TIL que foram expandidas ou proliferadas conforme discutido neste documento, incluindo, porém sem limitação, TILs em massa e TILs expandidos ("TILs REP" ou "TILs pós-REP"). As populações de células TIL podem incluir TILs geneticamente modificados.

[00505] Por "população de células" (incluindo TILs) neste documento, entende-se um número de células que compartilham características comuns. Em geral, as populações geralmente variam de 1×10^6 a 1×10^{10} em número, com diferentes populações TIL compreendendo diferentes números. Por exemplo, o crescimento inicial de TILs primários na presença de IL-2 resulta em uma população de TILs em massa de aproximadamente 1×10^8 células. A expansão do REP é geralmente feita para fornecer populações de $1,5 \times 10^9$ a $1,5 \times 10^{10}$ células para infusão. Em algumas modalidades, a expansão do REP é feita para fornecer populações de $2,3 \times 10^{10}$ a $13,7 \times 10^{10}$.

[00506] Por "TILs criopreservados" neste documento, entende-se que os TILs, primários, em massa ou expandidos (REP TILs), são tratados e

armazenados na faixa de cerca de -150 ºC a -60 ºC. Métodos gerais para criopreservação também são descritos em outro lugar neste documento, incluindo nos Exemplos. Para maior clareza, "TILs criopreservados" são distinguíveis de amostras de tecido congeladas que podem ser usadas como uma fonte de TILs primários.

[00507] Por "TILs criopreservados descongelados" neste documento, entende-se uma população de TILs que foi previamente criopreservada e, em seguida, tratada para retornar à temperatura ambiente ou superior, incluindo, porém sem limitação, temperaturas de cultura de células ou temperaturas em que os TILs podem ser administrados a um paciente.

[00508] Os TILs geralmente podem ser definidos bioquimicamente, usando marcadores de superfície celular, ou funcionalmente, por sua capacidade de infiltrar tumores e efetuar o tratamento. Os TILs podem ser geralmente categorizados 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, os TILs podem ser funcionalmente definidos por sua capacidade de infiltrar tumores sólidos após a reintrodução em um paciente.

[00509] O termo "meio de criopreservação" ou "meio de criopreservação" se refere a qualquer meio que pode ser usado para criopreservação de células. Esses meios podem incluir meios compreendendo DMSO a 7% a 10%. Meios exemplificativos incluem CryoStor CS10, Hyperthermasol, bem como combinações dos mesmos. O termo "CS10" se refere a um meio de criopreservação que é obtido da Stemcell Technologies ou da Biolife Solutions. O meio CS10 pode ser referido pelo nome comercial “CryoStor® CS10”. O meio CS10 é um meio sem soro e sem componentes animais que compreende DMSO.

[00510] O termo "célula T de memória central" se refere a um subconjunto de células T que no ser humano 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. Fatores de transcrição para células T de memória central incluem BCL-6, BCL-6B, MBD2 e BMI1. As células T de memória central secretam principalmente IL-2 e CD40L como moléculas efetoras após o desencadeamento de TCR. As células T de memória central são predominantes no compartimento CD4 do sangue, e no ser humano são proporcionalmente enriquecidas em linfonodos e amígdalas.

[00511] O termo "célula T de memória efetora" se refere a um subconjunto de células T humanas ou de mamíferos que, como as células T de memória central, são CD45R0+, mas perderam a expressão constitutiva de CCR7 ($CCR7^{lo}$) e são heterogêneas ou baixas para expressão de CD62L ($CD62L^{lo}$). O fenótipo de superfície das células T de memória central também inclui TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Fatores de transcrição para células T de memória central incluem BLIMP1. As células T efetoras de memória secretam rapidamente altos níveis de citocinas inflamatórias após a estimulação antigênica, incluindo interferon-γ, IL-4 e IL-5. As células T efetoras de memória são predominantes no compartimento CD8 no sangue e, no ser humano, são proporcionalmente enriquecidas no pulmão, no fígado e no intestino. As células T de memória efetoras CD8+ carregam grandes quantidades de perforina.

[00512] O termo “sistema fechado” se refere a um sistema fechado para o ambiente externo. Qualquer sistema fechado apropriado para métodos de cultura de células pode ser empregado com os métodos da presente invenção. Os sistemas fechados incluem, por exemplo, porém sem limitação, recipientes G fechados. Uma vez que um segmento de tumor é adicionado ao sistema fechado, o sistema não é aberto para o ambiente externo até que os TILs estejam prontos para serem administrados ao paciente.

[00513] Os termos "fragmentação", "fragmento" e "fragmentado",

conforme usado neste documento para descrever processos para interromper um tumor, incluem métodos de fragmentação mecânica, como esmagamento, corte, divisão e morcelamento de tecido tumoral, bem como qualquer outro método para interromper a estrutura física do tecido tumoral.

[00514] O termo "aspirado por agulha fina" ou FNA se refere a um tipo de procedimento de biópsia que pode ser empregado para procedimentos de amostragem ou diagnóstico, incluindo amostragem de tumor, em que uma amostra é retirada, mas o tumor não é removido ou ressecado. Na aspiração por agulha fina, uma agulha oca, por exemplo calibre 25-18, é inserida no tumor ou em uma área contendo o tumor e fluido e células (incluindo tecido) são obtidos para análise posterior ou expansão, conforme descrito neste documento. Com um FNA, as células são removidas sem preservar a arquitetura histológica das células do tecido. Um FNA pode compreender TILs. Em alguns casos, uma biópsia aspirativa por agulha fina é realizada usando uma agulha de biópsia aspirativa por agulha fina guiada por ultrassom. As agulhas FNA estão comercialmente disponíveis junto à Becton Dickinson, Covidien e semelhantes.

[00515] O termo "biópsia por agulha" ou "biópsia de agulha central" se refere a um tipo de procedimento de biópsia que pode ser empregado para procedimentos de amostragem ou diagnóstico, incluindo amostragem de tumor, em que uma amostra é retirada, mas o tumor não é removido ou ressecado. Em uma biópsia por agulha, uma agulha oca, por exemplo, calibre 16-11, é inserida no tumor ou em uma área contendo o tumor e fluido e células (incluindo tecido) são obtidos para análise posterior ou expansão, conforme descrito neste documento. Com uma biópsia central, as células podem ser removidas com alguma preservação da arquitetura histológica das células do tecido, dado o tamanho da agulha maior em comparação com um FNA. A agulha de biópsia é geralmente de um tamanho padrão capaz de preservar pelo menos uma parte da arquitetura histológica do tumor. Uma

biópsia por agulha pode compreender TILs. Em alguns casos, uma biópsia com agulha grossa é realizada usando um instrumento de biópsia, um instrumento de biópsia com agulha grossa assistida a vácuo, um instrumento de biópsia com agulha grossa guiada por estereótipos, um instrumento de biópsia com agulha grossa guiada por ultrassom, um instrumento de biópsia com agulha grossa guiada por MRI comercialmente disponível junto à Bard Medical, Becton Dickinson e semelhantes.

[00516] Os termos "células mononucleares do sangue periférico" e "PBMCs" se referem a uma célula do sangue periférico com um 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 de sangue periférico alogênicas irradiadas.

[00517] Os termos “linfócitos do sangue periférico” e “PBLs” se referem às células T expandidas do sangue periférico. Em algumas modalidades, os PBLs são separados do sangue total ou produto de aférese de um doador. Em algumas modalidades, os PBLs são separados do sangue total ou produto de aférese de um doador por seleção positiva ou negativa de um fenótipo de células T, como o fenótipo de células T de CD3+ CD45+.

[00518] O termo "anticorpo anti-CD3" se refere a um anticorpo ou variante do mesmo, por exemplo, um anticorpo monoclonal e incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos ou murinos que são direcionados contra o receptor CD3 no receptor de antígeno de célula T de células T maduras. Os anticorpos anti-CD3 incluem OKT-3, também conhecido como muromonab. Os anticorpos anti-CD3 também incluem o clone UHCT1, também conhecido como T3 e CD3ε. Outros anticorpos anti-CD3 incluem, por exemplo, otelixizumab, teplizumab e visilizumab.

[00519] O termo "OKT-3" (também referido aqui como "OKT3") se

refere a um anticorpo monoclonal ou biossimilar ou variante do mesmo, incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos ou murinos, direcionados contra o receptor CD3 no receptor de antígeno de células T de células T maduras e inclui formas comercialmente disponíveis, como OKT-3 (30 ng/ml, MACS GMP CD3 puro, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, EUA) e muromonab ou variantes, substituições conservativas de aminoácidos, glicoformas ou seus biossimilares. As sequências de aminoácidos das cadeias pesadas e leves de muromonab são fornecidas na Tabela 1 (SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2). Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 é depositado com a American Type Culture Collection e atribuído o número de acesso ATCC CRL 8001. Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 também é depositado com European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) e com o número de Catálogo atribuído 86022706.

TABELA 1. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE MUROMONAB.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 1 Cadeia pesada de Muromonab	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 Muromonab	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

[00520] O termo "IL-2" (também aqui referido como "IL2") se refere 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 conservativas de aminoácidos, glicoformas, biossimilares e

variantes dos mesmos. IL-2 é descrita, por exemplo, em Nelson, *J. Immunol.* **2004,** *172,* 3983-88 e Malek, *Annu. Rev. Immunol.* **2008,** *26,* 453-79, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. A sequência de aminoácidos da IL-2 humana recombinante adequada para utilização na invenção é apresentada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 3). Por exemplo, o termo IL-2 abrange formas humanas recombinantes de IL-2, como aldesleucina (PROLEUKIN, disponível comercialmente junto a vários fornecedores em 22 milhões de UI por frascos de uso único), bem como a forma de IL-2 recombinante fornecida comercialmente junto à CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, EUA (CELLGRO GMP) ou ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (nº de Cat. CYT-209-b) e outros equivalentes comerciais de outros fornecedores. A aldosleucina (des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana) é uma forma recombinante humana não glicosilada de IL-2 com um peso molecular de aproximadamente 15 kDa. A sequência de aminoácidos da aldesleucina adequada para uso na invenção é fornecida na Tabela 2 (SEQ ID NO: 4). O termo IL-2 também abrange formas peguiladas de IL-2, como aqui descritas, incluindo o pró-fármaco de IL2 peguilado NKTR-214, disponível junto à Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, EUA. NKTR-214 e IL-2 peguilada adequados para uso na invenção são descritos na Publicação do Pedido de Patente nº US 2014/0328791 A1 e na Publicação do Pedido de Patente Internacional nº WO 2012/065086 Al, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. Formas alternativas de IL-2 conjugado adequadas para uso na invenção são descritas nas Patentes nºs US 4.766.106, 5.206.344, 5.089.261 e 4.902.502, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As formulações de IL-2 adequadas para utilização na invenção são descritas na Patente nº US 6.706.289, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência.

TABELA 2. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE INTERLEUCINAS.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
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

[00521] O termo "IL-4" (também referido aqui como "IL4") se refere à citocina conhecida como interleucina 4, que é produzida por células T Th2 e por eosinófilos, basófilos e mastócitos. A IL-4 regula a diferenciação de células T auxiliares virgens (células Th0) em células T Th2. Steinke e Borish, *Respir. Res.* **2001,** *2,* 66-70. Após a ativação por IL-4, as células T Th2 subsequentemente produzem IL-4 adicional em um ciclo de feedback positivo. A IL-4 também estimula a proliferação de células B e a expressão de MHC de classe II e induz a mudança de classe para a expressão de IgE e IgG_1 a partir de células B. A IL-4 humana recombinante adequada para uso na invenção está disponível comercialmente junto a vários fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (nº de Cat. CYT-211) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína recombinante de IL-15 humana, nº de Cat. Gibco CTP0043). A sequência de aminoácidos da IL-4 humana recombinante adequada para uso

na invenção é apresentada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 5).

[00522] O termo "IL-7" (também referido aqui como "IL7") se refere a uma citocina derivada de tecido glicosilada conhecida como interleucina 7, que pode ser obtida de células estromais e epiteliais, bem como de células dendríticas. Fry e Mackall, *Blood* **2002,** *99,* 3892-904. IL-7 pode estimular o desenvolvimento de células T. A IL-7 se liga ao receptor da IL-7, um heterodímero que consiste no receptor alfa da IL-7 e no receptor da cadeia gama comum, que em uma série de sinais importantes para o desenvolvimento das células T no timo e a sobrevivência na periferia. A IL-7 humana recombinante adequada para uso na invenção está disponível comercialmente junto a vários fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (nº de Cat. CYT-254) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína recombinante de IL-15 humana, nº de Cat. Gibco PHC0071). A sequência de aminoácidos da IL-7 humana recombinante adequada para uso na invenção é apresentada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 6).

[00523] O termo "IL-15" (também aqui referido como "IL15") se refere ao fator de crescimento de células T conhecido como interleucina-15 e inclui todas as formas de IL-2, incluindo formas humanas e de mamíferos, substituições conservativas de aminoácidos, glicoformas, biossimilares e variantes dos mesmos. IL-15 é descrita, por exemplo, em Fehniger and Caligiuri, *Blood* **2001,** *97,* 14 a 32, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência. IL-15 compartilha subunidades do receptor de sinalização β e γ com IL-2. IL-15 humana recombinante é uma única cadeia polipeptídica não glicosilada contendo 114 aminoácidos (e uma metionina terminal N) com uma massa molecular de 12,8 kDa. A IL-15 humana recombinante está disponível comercialmente junto a vários fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (nº de Cat. CYT-230-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA,

EUA (proteína recombinante de IL-15 humana, nº de Cat. 34-8159-82). A sequência de aminoácidos da IL-15 humana recombinante adequada para utilização na invenção é apresentada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 7).

[00524] O termo "IL-21" (também aqui referido como "IL21") se refere à proteína de 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 dos mesmos. IL-21 é descrito, por exemplo, em Spolski e Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2014,** *13,* 379-95, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência. A IL-21 é produzida principalmente por células T exterminadoras naturais e células T CD4+ humanas ativadas. A IL-21 humana recombinante é uma única cadeia polipeptídica não glicosilada contendo 132 aminoácidos com uma massa molecular de 15,4 kDa. A IL-21 humana recombinante está disponível comercialmente junto a vários fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EUA (nº de Cat. CYT-408-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA (proteína recombinante de IL-21 humana, nº de Cat. 14-8219-80). A sequência de aminoácidos da IL-21 humana recombinante adequada para utilização na invenção é apresentada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 8).

[00525] Quando "uma quantidade eficaz antitumoral", "uma quantidade eficaz inibidora de 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 em idade, peso, tamanho do tumor, extensão da infecção ou metástase e condição do paciente (sujeito). Pode ser geralmente afirmado que uma composição farmacêutica compreendendo os linfócitos infiltrantes de tumor (por exemplo, TILs secundários ou linfócitos citotóxicos geneticamente modificados) aqui descritos podem ser administrados em uma

dosagem de 10^4 a 10^{11} células/kg de peso corporal (por exemplo, 10^5 a 10^6, 10^5 a 10^{10}, 10^5 a 10^{11}, 10^6 a 10^{10}, 10^6 a 10^{11}, 10^7 a 10^{11}, 10^7 a 10^{10}, 10^8 a 10^{11}, 10^8 a 10^{10}, 10^9 a 10^{11}, ou 10^9 a 10^{10} células/kg de peso corporal), incluindo todos os valores inteiros dentro dessas faixas. As composições de linfócitos infiltrantes de tumor (incluindo, em alguns casos, linfócitos citotóxicos geneticamente modificados) podem ser administradas várias vezes nessas dosagens. Os linfócitos infiltrantes de tumor (incluindo, em alguns casos, linfócitos citotóxicos geneticamente modificados) podem ser administrados usando técnicas de infusão que são comumente conhecidas em imunoterapia (ver, por exemplo, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). A dosagem ideal e o regime de tratamento para um determinado paciente podem ser facilmente determinados por um especialista na técnica da medicina monitorando-se o paciente quanto a sinais de doença e ajustando o tratamento de acordo.

[00526] O termo "malignidade hematológica", "malignidade hematológica" ou termos de significado correlativo se referem a cânceres e tumores de mamíferos dos tecidos hematopoiéticos e linfoides, incluindo, porém sem limitação, tecidos do sangue, medula óssea, nódulos linfáticos e sistema linfático. Malignidades hematológicas também são chamadas de "tumores líquidos". As malignidades hematológicas incluem, porém sem limitação, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma linfocítico crônico (LLC), linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia monocítica aguda (AMoL), Linfoma de Hodgkin e linfomas não Hodgkin. O termo "malignidade hematológica de células B" se refere a doenças malignas hematológicas que afetam as células B.

[00527] O termo "tumor sólido" se refere a uma massa anormal de tecido que geralmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo "câncer de tumor sólido" se refere

a tumores sólidos malignos, neoplásicos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, porém sem limitação, sarcomas, carcinomas e linfomas, tais como cânceres de pulmão, mama, próstata, cólon, reto e bexiga. A estrutura do tecido de tumores sólidos inclui compartimentos de tecido interdependentes, incluindo o parênquima (células cancerosas) e as células estromais de suporte nas quais as células cancerosas estão dispersas e que podem fornecer um microambiente de suporte.

[00528] O termo "tumor líquido" se refere a uma massa anormal de células que é de natureza fluida. Os cânceres de tumor líquido incluem, porém sem limitação, leucemias, mielomas e linfomas, bem como outras doenças malignas hematológicas. TILs obtidos de tumores líquidos também podem ser referidos aqui como linfócitos infiltrantes de medula (MILs). Os TILs obtidos de tumores líquidos, incluindo tumores líquidos que circulam no sangue periférico, também podem ser referidos aqui como PBLs. Os termos MIL, TIL e PBL são usados indistintamente aqui e diferem apenas com base no tipo de tecido do qual as células são derivadas.

[00529] O termo "microambiente", tal como aqui utilizado, pode referir-se ao microambiente tumoral sólido ou hematológico como um todo ou a um subconjunto individual de células dentro do microambiente. O microambiente tumoral, tal como aqui utilizado, se refere a uma mistura complexa de "células, fatores solúveis, moléculas de sinalização, matrizes extracelulares e pistas mecânicas que promovem a transformação neoplásica, apoiam o crescimento e a invasão do tumor, protegem o tumor da imunidade do hospedeiro, promovem a resistência terapêutica, e fornecem nichos para o desenvolvimento de metástases dominantes", conforme descrito em Swartz, *et al., Cancer Res.,* **2012,** *72,* 2473. Embora os tumores expressem antígenos que devem ser reconhecidos pelas células T, a eliminação do tumor pelo sistema imunológico é rara devido à supressão imunológica pelo microambiente.

[00530] 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 invenção. Em algumas modalidades, a população de TILs pode ser fornecida 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 (dias 27 e 26 antes da infusão de TIL) e fludarabina 25 mg/m2/d por 5 dias (dias 27 a 23 antes da infusão de TIL). Em uma modalidade, após quimioterapia não mieloablativa e infusão de TIL (no dia 0) de acordo com a invenção, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 por via intravenosa a 720000 UI/kg a cada 8 horas até a tolerância fisiológica.

[00531] Achados experimentais indicam que a linfodepleção antes da transferência adotiva de linfócitos T específicos do tumor desempenha um papel fundamental no aumento da eficácia do tratamento, eliminando células T reguladoras e elementos concorrentes do sistema imunológico ("sumidouros de citocinas"). Consequentemente, 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.

[00532] Os termos "coadministração", “coadministrando", "administrado em combinação com", "administração em combinação com", "simultâneo" e “concomitante", conforme usado neste documento, abrangem a administração de dois ou mais ingredientes farmacêuticos ativos (em uma modalidade preferencial da presente invenção, por exemplo, pelo menos um agonista do canal de potássio em combinação com uma pluralidade de TILs) a um sujeito de modo que ambos os ingredientes farmacêuticos ativos e/ou seus metabólitos estejam presentes no sujeito ao mesmo tempo. A coadministração

inclui a administração simultânea em composições separadas, a administração em momentos diferentes em composições separadas ou a administração em uma composição na qual dois ou mais ingredientes farmacêuticos ativos estão presentes. A administração simultânea em composições separadas e a administração em uma composição em que ambos os agentes estão presentes são preferenciais.

[00533] O termo "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere à quantidade de um composto ou combinação de compostos, conforme descrito neste documento, que é suficiente para efetuar a aplicação pretendida, incluindo, porém sem limitação, tratamento da doença. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo da aplicação pretendida (*in vitro* ou *in vivo*), ou do sujeito e condição da doença a ser tratada (por exemplo, o peso, idade e sexo do sujeito), a gravidade da condição da doença, ou forma de administração. O termo também se aplica a uma dose que irá induzir uma resposta particular nas células-alvo (por exemplo, a redução da adesão plaquetária e/ou migração celular). A dose específica irá variar dependendo dos compostos particulares escolhidos, o regime de dosagem a ser seguido, se o composto é administrado em combinação com outros compostos, tempo de administração, o tecido ao qual é administrado e o sistema de distribuição física no qual o composto é transportado.

[00534] Os termos "tratamento", "tratando", "tratar" e semelhantes se referem à obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenção completa ou parcial de uma doença ou sintoma da mesma e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. "Tratamento", tal como aqui utilizado, cobre qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, particularmente em um ser humano, e inclui: (a) prevenir a ocorrência da doença em um sujeito que pode estar predisposto

à doença, mas ainda não foi diagnosticado como tendo a mesma; (b) inibir a doença, ou seja, interromper seu desenvolvimento ou progressão; e (c) aliviar a doença, ou seja, causar a regressão da doença e/ou aliviar um ou mais sintomas da doença. "Tratamento" também se destina a abranger a entrega de um agente a fim de fornecer um efeito farmacológico, mesmo na ausência de uma doença ou condição. Por exemplo, "tratamento" abrange a entrega de uma composição que pode desencadear uma resposta imune ou conferir imunidade na ausência de uma condição de doença, por exemplo, no caso de uma vacina.

[00535] O termo "heterólogo" quando usado com referência a porções de um ácido nucleico ou proteína indica que o ácido nucleico ou proteína compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico é tipicamente produzido de forma recombinante, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionados dispostos para fazer um novo ácido nucleico funcional, por exemplo, um promotor de uma fonte e uma região de codificação de outra fonte, ou regiões de codificação de fontes diferentes. Da mesma forma, uma proteína heteróloga indica que a proteína compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza (por exemplo, uma proteína de fusão).

[00536] Os termos "identidade de sequência", "porcentagem de identidade" e "porcentagem de identidade de sequência" (ou sinônimos dos mesmos, por exemplo, "99% idêntica") no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou polipeptídeos, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou têm uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos que são os mesmos, quando comparados e alinhados (introduzindo lacunas, se necessário) para correspondência máxima, não considerando quaisquer substituições conservativas de aminoácidos como parte da identidade de sequência. A

porcentagem de identidade pode ser medida usando software ou algoritmos de comparação de sequência 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. Os programas adequados para determinar a percentagem de identidade de sequência incluem, por exemplo, o conjunto de programas BLAST disponível no site do Centro Nacional de Informação de Biotecnologia do Governo dos EUA BLAST. As comparações entre duas sequências podem ser realizadas usando o algoritmo BLASTN ou BLASTP. BLASTN é usado para comparar sequências de ácido nucleico, enquanto BLASTP é usado para comparar sequências de aminoácidos. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Califórnia) ou MegAlign, disponíveis junto à DNASTAR, são programas de software adicionais disponíveis ao público que podem ser usados para alinhar sequências. Um especialista na técnica pode determinar os parâmetros apropriados para alinhamento máximo por software de alinhamento particular. Em certas modalidades, os parâmetros padrão do software de alinhamento são usados.

[00537] Tal como aqui utilizado, o termo "variante" abrange, porém sem limitação, proteínas, anticorpos ou proteínas de fusão que compreendem uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos de uma proteína de referência, anticorpo ou proteína de fusão por meio de uma ou mais substituições, deleções e/ou adições em certas posições dentro ou adjacentes à sequência de aminoácidos do anticorpo, proteína ou proteína de fusão de referência. A variante pode compreender uma ou mais substituições conservativas em sua sequência de aminoácidos em comparação com a sequência de aminoácidos de um anticorpo de referência. As substituições conservativas podem envolver, por exemplo, a substituição de aminoácidos carregados ou não carregados de forma semelhante. A variante retém a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno do anticorpo, proteína ou

proteína de fusão de referência. O termo variante também inclui anticorpos ou proteínas peguiladas.

[00538] Por "linfócitos infiltrantes de tumor" ou "TILs" neste documento, entende-se uma população de células originalmente obtidas como glóbulos brancos que deixaram a corrente sanguínea de um sujeito e migraram para um tumor. Os TILs incluem, porém sem limitação, células T citotóxicas $CD8^+$ (linfócitos), células T $CD4^+$ Th1 e Th17, células exterminadoras naturais, células dendríticas e macrófagos M1. TILs incluem TILs primários e secundários. "TILs primários" são aqueles que são obtidos a partir de amostras de tecido do paciente conforme descrito neste documento (às vezes referido como "obtido recentemente" ou "isolado de fresco"), e "TILs secundários" são quaisquer populações de células TIL que foram expandidas ou proliferadas conforme discutido neste documento, incluindo, porém sem limitação, TILs em massa, TILs expandidos ("REP TILs"), bem como "TILs de reREP", conforme discutido neste documento. TILs de 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 1, incluindo TILs referidos como TILs de reREP).

[00539] Os TILs geralmente podem ser definidos bioquimicamente, usando marcadores de superfície celular, ou funcionalmente, por sua capacidade de infiltrar tumores e efetuar o tratamento. Os TILs podem ser geralmente categorizados 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, os TILs podem ser funcionalmente definidos por sua capacidade de infiltrar tumores sólidos após a reintrodução em um paciente. TILS podem ainda ser caracterizados pela potência - por exemplo, TILS podem ser considerados potentes se, por exemplo, a liberação de interferon (IFN) for maior do que cerca de 50 pg/ml, maior do que cerca de 100 pg/ml, maior do que cerca de 150 pg/ml, ou

superior a cerca de 200 pg/ml. TILS podem ser considerados potentes se, por exemplo, a liberação de interferon (IFNγ) for maior do que cerca de 50 pg/ml, maior do que cerca de 100 pg/ml, maior do que cerca de 150 pg/ml, ou maior do que cerca de 200 pg/ml, maior do que cerca de 300 pg/ml, maior do que cerca de 400 pg/ml, maior do que cerca de 500 pg/ml, maior do que cerca de 600 pg/ml, maior do que cerca de 700 pg/ml, maior do que cerca de 800 pg/ml, maior do que cerca de 900 pg/ml, maior do que cerca de 1000 pg/ml.

[00540] Os termos "carreador 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 de absorção e ingredientes inertes. A utilização de tais carreadores farmaceuticamente aceitáveis ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis para ingredientes farmacêuticos ativos é bem conhecida na técnica. Exceto na medida em que qualquer carreador farmaceuticamente aceitável convencional ou excipiente farmaceuticamente aceitável seja incompatível com o ingrediente farmacêutico ativo, seu uso nas composições terapêuticas da invenção é contemplado. Ingredientes farmacêuticos ativos adicionais, tais como outros fármacos, também podem ser incorporados nas composições e métodos descritos.

[00541] Os termos “cerca de” e “aproximadamente” significam dentro de uma faixa estatisticamente significativa de um valor. Tal faixa pode estar dentro de uma ordem de magnitude, preferencialmente dentro de 50%, mais preferencialmente dentro de 20%, mais preferencialmente ainda dentro de 10%, e ainda mais preferencialmente dentro de 5% de um dado valor ou faixa. A variação permitida abrangida pelos termos "cerca de" ou "aproximadamente" depende do sistema particular em estudo e pode ser prontamente apreciada por um versado na técnica. Além disso, conforme usado neste documento, os termos "cerca de" e "aproximadamente"

significam que dimensões, tamanhos, formulações, parâmetros, formas e outras quantidades e características não são e não precisam ser exatas, mas podem ser aproximadas e/ou maiores ou menores, conforme desejado, refletindo tolerâncias, fatores de conversão, arredondamento, erro de medição e semelhantes, e outros fatores conhecidos pelos versados na técnica. Em geral, uma dimensão, tamanho, formulação, parâmetro, forma ou outra quantidade ou característica é "cerca de" ou "aproximada", seja ou não expressamente declarado como tal. É notado que modalidades de tamanhos, formas e dimensões muito diferentes podem empregar os arranjos descritos.

[00542] Os termos de transição "compreendendo", "consistindo essencialmente em" e "consistindo em", quando usados nas reivindicações anexas, na forma original e alterada, definem o escopo da reivindicação com relação a quais elementos ou etapas adicionais não recitados da reivindicação, se houver, estão excluídos do escopo da reivindicação (ou reivindicações). O termo "compreendendo" se destina a ser inclusivo ou em aberto e não exclui qualquer elemento, método, etapa ou material adicional não solicitado. O termo "consistindo em" exclui qualquer elemento, etapa ou material diferente dos especificados na reivindicação e, no último caso, impurezas comuns associadas ao material (ou materiais) especificado. O termo "consistindo essencialmente em" limita o escopo de uma reivindicação aos elementos, etapas ou materiais especificados e aqueles que não afetam materialmente as características básicas e novas da invenção reivindicada. Todas as composições, métodos e kits descritos neste documento que incorporam a presente invenção podem, em modalidades alternativas, ser mais especificamente definidos por qualquer um dos termos transitórios "compreendendo", "consistindo essencialmente em" e "consistindo em".

II. PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DE TIL (MODALIDADES DE PROCESSOS GEN3, OPCIONALMENTE INCLUINDO MEIO DEFINIDO)

[00543] Sem estar limitado a qualquer teoria particular, acredita-se que

a primeira expansão de iniciação que inicia uma ativação de células T seguida pela segunda expansão rápida que aumenta a ativação de células T, conforme descrito nos métodos da invenção, permite a preparação de células T expandidas que retêm um fenótipo "mais jovem" e, como tal, espera-se que as células T expandidas da invenção exibam maior citotoxicidade contra as células cancerosas do que as células T expandidas por outros métodos. Em particular, acredita-se que uma ativação de células T que é iniciada pela exposição a um anticorpo anti-CD3 (por exemplo, OKT-3), IL-2 e, opcionalmente, células apresentadoras de antígeno (APCs) e, em seguida, reforçada pela exposição subsequente a anticorpo anti-CD-3 (por exemplo, OKT-3), IL-2 e APCs, conforme 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 maduro, que as células T são menos exauridas pela expansão em cultura e exibem maior citotoxicidade contra as células cancerosas. Em algumas modalidades, a etapa de segunda expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala da cultura: (a) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuar a transferência das células T na cultura de escala pequena para um segundo recipiente maior que o primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 500MCS, e cultivar as células T da cultura de escala pequena em uma cultura de escala maior no segundo recipiente por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar uma distribuição da cultura: (a) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma primeira cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuar a transferência e a repartição das células T da

primeira cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da primeira cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma segunda cultura de escala pequena por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (a) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuar a transferência e a repartição das células T da cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (a) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 4 dias, e então (b) efetuar a transferência e a repartição das células T da cultura de escala pequena em e dentre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 5 dias.

[00544] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é

realizada após a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de iniciação começar a diminuir, abater, decair ou diminuir.

[00545] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada após a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de iniciação ter diminuído em ou cerca 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%.

[00546] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada após a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de iniciação ter diminuído em uma porcentagem na faixa de ou cerca de 1% a 100%.

[00547] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada após a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de iniciação ter diminuído em uma porcentagem na faixa de ou cerca de 1% a 10%, 10% a 20%, 20% a 30%, 30% a 40%, 40% a 50%, 50% a 60%, 60% a 70%, 70% a 80%, 80% a 90% ou 90% a 100%.

[00548] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada após a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de iniciação ter diminuído em pelo menos 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%.

[00549] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida é realizada após a ativação de células T efetuada pela primeira expansão de

iniciação ter diminuído em até ou cerca 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%.

[00550] Em algumas modalidades, a diminuição na ativação de células T efetuada pela primeira expansão de iniciação é determinada por uma redução na quantidade de interferon gama liberado pelas células T em resposta à estimulação com antígeno.

[00551] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de até ou cerca de 7 dias ou cerca de 8 dias.

[00552] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de até ou cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 8 dias.

[00553] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 8 dias.

[00554] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de até ou cerca de 11 dias.

[00555] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de até ou cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias ou 11 dias.

[00556] 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.

[00557] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de ou cerca de 1 dia a ou cerca de 7

dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de ou cerca de 1 dia a ou cerca de 11 dias.

[00558] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de até ou cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 8 dias e o segundo rápido a expansão de células T é realizada durante um período de até ou cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias ou 11 dias.

[00559] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de ou cerca de 1 dia a ou cerca de 8 dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de ou cerca de 1 dia a, ou cerca de, 9 dias.

[00560] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de 8 dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de 9 dias.

[00561] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação de células T é realizada durante um período de ou cerca de 1 dia a ou cerca de 7 dias e a segunda expansão rápida de células T é realizada durante um período de ou cerca de 1 dia a ou cerca de 9 dias.

[00562] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação 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.

[00563] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

[00564] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos infiltrantes de medula (MILs).

[00565] Em algumas modalidades, as células T são linfócitos do sangue periférico (PBLs).

[00566] Em algumas modalidades, as células T são obtidas de um doador que sofre de câncer.

[00567] Em algumas modalidades, as células T são TILs obtidos de um tumor excisado de um paciente que sofre de um câncer.

[00568] Em algumas modalidades, as células T são MILs obtidos da medula óssea de um paciente que sofre de uma malignidade hematológica.

[00569] Em algumas modalidades, as células T são PBLs obtidos de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de um doador. Em algumas modalidades, o doador está sofrendo de um câncer. Em algumas modalidades, o câncer é o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer de endométrio, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), 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.

[00570] Em certos aspectos da presente divulgação, as células efetoras imunes, por exemplo, células T, podem ser obtidas a partir de uma unidade de sangue coletada de um sujeito usando qualquer número de técnicas conhecidas pelo especialista na técnica, tal como separação FICOLL. Em um

aspecto preferencial, as células do sangue circulante de um indivíduo são obtidas por aférese. O produto de aférese normalmente contém linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e plaquetas. Em um aspecto, as células coletadas por aférese podem ser lavadas para remover a fração de plasma e, opcionalmente, para colocar as células em um tampão ou meio apropriado para as etapas de processamento subsequentes. Em uma modalidade, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em uma modalidade alternativa, a solução de lavagem carece de cálcio e pode carecer de magnésio ou pode carecer de muitos, senão todos os cátions divalentes. Em um aspecto, as células T são isoladas dos linfócitos do sangue periférico por lise dos glóbulos vermelhos e esgotamento dos monócitos, por exemplo, por centrifugação através de um gradiente de PERCOLL ou por elutriação centrífuga de contrafluxo.

[00571] Em algumas modalidades, as células T são PBLs separados do sangue total ou produto de aférese enriquecido para linfócitos de um doador. Em algumas modalidades, o doador está sofrendo de um câncer. Em algumas modalidades, o câncer é o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer de endométrio, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de

cabeça e pescoço (HNSCC)), 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. Em algumas modalidades, os PBLs são isolados de sangue total ou produto de aférese enriquecido para linfócitos usando métodos de seleção positiva ou negativa, ou seja, removendo os PBLs usando um marcador (ou marcadores), por exemplo, CD3+ CD45+, para o fenótipo de células T, ou removendo células de fenótipo de células não T, deixando PBLs. Em outras modalidades, os PBLs são isolados por centrifugação em gradiente. Após o isolamento de PBLs do tecido do doador, a primeira expansão de iniciação de PBLs pode ser iniciada semeando-se número adequado de PBLs isolados (em algumas modalidades, aproximadamente 1×10^7 PBLs) na primeira cultura de expansão de iniciação de acordo com a primeira etapa de expansão de iniciação de qualquer um dos métodos aqui descritos.

[00572] Um processo de TIL exemplificativo conhecido como processo 3 (também referido aqui como GEN3) contendo algumas dessas características é representado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), e algumas das vantagens desta modalidade da presente invenção sobre o processo 2A são descritas nas Figuras 1, 2, 30 e 31 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Duas modalidades do processo 3 são mostradas nas Figuras 1 e 30 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). O processo 2A ou Gen 2 também é descrito na Publicação de Patente nº US 2018/.0280436, incorporada neste documento a título de referência em sua totalidade.

[00573] Conforme discutido e geralmente descrito aqui, os TILs são retirados de uma amostra de paciente e manipulados para expandir 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, conforme discutido abaixo. Em algumas modalidades, os TILs podem ser criopreservados antes ou após a expansão. Uma vez descongelados, eles também podem ser estimulados novamente para aumentar seu metabolismo antes da infusão em um paciente.

[00574] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (incluindo processos referidos no presente documento como a pré-Expansão Rápida (Pré-REP), bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa B) é encurtada a 1 a 8 dias e a segunda expansão rápida (incluindo processos referidos no presente documento como o Protocolo de Expansão Rápida (REP) bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa D) é encurtada a 1 a 9 dias, conforme discutido em detalhes abaixo bem como nos exemplos e nas figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (incluindo processos referidos no presente documento como a pré-Expansão Rápida (Pré-REP), bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa B) é encurtada a 1 a 8 dias e a segunda expansão rápida (incluindo processos referidos no presente documento como o Protocolo de Expansão Rápida (REP) bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa D) é encurtada a 1 a 8 dias, conforme discutido em detalhes abaixo bem como nos exemplos e nas figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (incluindo processos referidos no presente documento como a pré-Expansão Rápida (Pré-REP), bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa B) é encurtada a 1 a 7 dias e a segunda expansão rápida (incluindo processos referidos no presente

documento como o Protocolo de Expansão Rápida (REP) bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa D) é encurtada a 1 a 9 dias, conforme discutido em detalhes abaixo bem como nos exemplos e nas figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (incluindo processos referidos no presente documento como a pré-Expansão Rápida (Pré-REP), bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa B) é 1 a 7 dias e a segunda expansão rápida (incluindo processos referidos no presente documento como o Protocolo de Expansão Rápida (REP) bem como processos mostrados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) como a Etapa D) é 1 a 10 dias, conforme discutido em detalhes abaixo bem como nos exemplos e nas figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é encurtada a 8 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 7 a 9 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 8 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 8 a 9 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é encurtada a 7 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 7 a 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a

Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é encurtada a 8 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 8 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 9 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 8 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 7 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 7 a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 7 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 8 a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo, uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 7 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 9 a 10 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação (por exemplo,

uma expansão descrita como a Etapa B na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é encurtada a 7 dias e a segunda expansão rápida (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é 7 a 9 dias. Em algumas modalidades, a combinação da primeira expansão de iniciação e da segunda expansão rápida (por exemplo, expansões descritas como Etapa B e Etapa D na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é de 14 a 16 dias, conforme discutido em detalhes abaixo e nos exemplos e figuras. Particularmente, é considerado que certas modalidades da presente invenção compreendem uma primeira etapa de expansão de iniciação em que os TILs são ativados por exposição a um anticorpo anti-CD3, por exemplo, OKT-3 na presença de IL-2 ou exposição a um antígeno na presença de pelo menos IL-2 e um anticorpo anti-CD3, por exemplo, OKT-3. Em certas modalidades, os TILs que são ativados na primeira etapa de expansão de iniciação, conforme descrito acima, são uma primeira população de TILs, isto é, que são uma população de células primárias.

[00575] As designações de “Etapa" A, B, C, *etc.*, abaixo são em referência ao exemplo não limitativo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) e em referência a certas modalidades não limitantes descritas no presente documento. A ordenação das Etapas abaixo e na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) é exemplificativa e qualquer combinação ou ordem de etapas, bem como etapas adicionais, repetição de etapas e/ou omissão de etapas é contemplado pelo presente pedido e pelos métodos aqui divulgados.

A. ETAPA A: OBTER UMA AMOSTRA DE TUMOR DO PACIENTE

[00576] Em geral, os TILs são obtidos inicialmente a partir de uma amostra de tumor de paciente ("TILs primários") ou de linfócitos circulantes, como linfócitos de sangue periférico, incluindo linfócitos de sangue periférico

com características semelhantes a TIL, e são então expandidos em uma população maior para manipulação posterior conforme descrito neste documento, opcionalmente criopreservado e opcionalmente avaliado para fenótipo e parâmetros metabólicos como uma indicação de saúde de TIL.

[00577] Uma amostra de tumor de paciente pode ser obtida usando métodos conhecidos na técnica, geralmente por meio de ressecção cirúrgica, biópsia por agulha ou outros meios para obter uma amostra que contém uma mistura de tumor e células TIL. Em geral, a amostra de tumor pode ser de qualquer tumor sólido, incluindo tumores primários, tumores invasivos ou tumores metastáticos. A amostra de tumor também pode ser um tumor líquido, como um tumor obtido de uma malignidade hematológica. O tumor sólido pode ser de qualquer tipo de câncer, incluindo, porém sem limitação, mama, pâncreas, próstata, colorretal, pulmão, cérebro, renal, estômago e pele (incluindo, porém sem limitação, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais e melanoma). Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer de cabeça e pescoço (incluindo, por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (GBM), câncer gastrointestinal, câncer de ovário, sarcoma, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de células não pequenas. Em algumas modalidades, TILs úteis são obtidos a partir de tumores de melanoma maligno, uma vez que foi relatado que estes têm níveis particularmente elevados de TILs.

[00578] Uma vez obtida, a amostra de tumor é geralmente fragmentada utilizando dissecção cortante em pedaços pequenos de entre 1 a cerca de 8 $mm^{3,}$ com cerca de 2 a 3 mm^3 sendo particularmente útil. Os TILs são cultivados a partir desses fragmentos usando digestão enzimática de tumor. Esses tumores digeridos podem ser produzidos por incubação em meio enzimático (por exemplo, tampão 1640 do Roswell Park Memorial Institute

(RPMI), glutamato a 2 mM, gentamicina a 10 mcg/ml, 30 unidades/ml de DNase e 1,0 mg/ml de colagenase) seguido por dissociação mecânica (por exemplo, usando um dissociador de tecido). A digestão do tumor pode ser produzida colocando-se o tumor em meio enzimático e dissociando mecanicamente o tumor por aproximadamente 1 minuto, seguido de incubação por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 a 5%, seguido por ciclos repetidos de dissociação mecânica e incubação sob as condições anteriores até que apenas pequenos pedaços de tecido estejam presentes. No final desse processo, se a suspensão de células contiver um grande número de glóbulos vermelhos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade usando polissacarídeo hidrofílico ramificado FICOLL pode ser realizada para remover essas células. Métodos alternativos conhecidos na técnica podem ser usados, tais como aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente nº US 2012/0244133 A1, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência. Qualquer um dos métodos anteriores pode ser usado em qualquer uma das modalidades aqui descritas para métodos de expansão de TILs ou métodos de tratamento de um câncer.

[00579] Conforme indicado acima, em algumas modalidades, os TILs são derivados de tumores sólidos. Em algumas modalidades, os tumores sólidos não são fragmentados. Em algumas modalidades, os tumores sólidos não são fragmentados e são submetidos à digestão enzimática como tumores inteiros. Em algumas modalidades, os tumores são digeridos em uma mistura de enzimas que compreende colagenase, DNase e hialuronidase. Em algumas modalidades, os tumores são digeridos em uma mistura de enzimas compreendendo colagenase, DNase e hialuronidase por 1 a 2 horas. Em algumas modalidades, os tumores são digeridos em uma mistura de enzimas compreendendo colagenase, DNase e hialuronidase por 1 a 2 horas a 37 ºC, de CO_2 a 5%. Em algumas modalidades, os tumores são digeridos em uma mistura de enzima compreendendo colagenase, ADNase e hialuronidase

durante 1 a 2 horas a 37 ºC, CO_2 a 5% com rotação. Em algumas modalidades, os tumores são digeridos durante a noite com rotação constante. Em algumas modalidades, os tumores são digeridos durante a noite a 37 ºC, CO_2 a 5% com rotação constante. Em algumas modalidades, todo o tumor é combinado com as enzimas para formar uma mistura de reação de digestão do tumor.

[00580] Em algumas modalidades, o tumor é reconstituído com as enzimas liofilizadas em um tampão estéril. Em algumas modalidades, o tampão é HBSS estéril.

[00581] Em algumas modalidades, a mistura de enximas compreende colagenase. Em algumas modalidades, a colagenase é colagenase IV. Em algumas modalidades, o estoque de trabalho para a colagenase é um estoque de trabalho 10X 100 mg/ml.

[00582] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende DNAse. Em algumas modalidades, o estoque de trabalho para a DNAse é um estoque de trabalho 10X 10000 UI/ml.

[00583] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende hialuronidase. Em algumas modalidades, o estoque de trabalho para a hialuronidase é um estoque de trabalho 10X 10 mg/ml.

[00584] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende 10 mg/ml de colagenase, 1000 UI/ml de DNAse e 1 mg/ml de hialuronidase.

[00585] Em algumas modalidades, a mistura de enzimas compreende 10 mg/ml de colagenase, 500 UI/ml de DNAse e 1 mg/ml de hialuronidase.

[00586] Em geral, a suspensão de células obtida do tumor é chamada de "população de células primárias" ou uma população de células "recém-obtida" ou "recém-isolada". Em certas modalidades, a população de células recém-obtida de TILs é exposta a um meio de cultura de células compreendendo células de apresentação de antígeno, IL-12 e OKT-3.

[00587] Em algumas modalidades, a fragmentação inclui fragmentação

física, incluindo, por exemplo, dissecção, bem como digestão. Em algumas modalidades, a fragmentação é fragmentação física. Em algumas modalidades, a fragmentação é dissecção. Em algumas modalidades, a fragmentação é por digestão. Em algumas modalidades, os TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de digestão enzimática de tumor e fragmentos de tumor obtidos de pacientes. Em uma modalidade, os TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de digestão enzimática de tumor e fragmentos de tumor obtidos de pacientes.

[00588] Em algumas modalidades, quando o tumor é um tumor sólido, o tumor sofre fragmentação física após a amostra do tumor ser obtida, por exemplo, na Etapa A (conforme fornecido na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre antes da criopreservação. Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre após a criopreservação. Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre após a obtenção do tumor e na ausência de qualquer criopreservação. Em algumas modalidades, a etapa de fragmentação é um processo *in vitro* ou *ex-vivo*. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 10, 20, 30, 40 ou mais fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 30 ou 40 fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 40 fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 4 a cerca de 50 fragmentos, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm^3. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm^3 a cerca de 1500 mm^3. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de

cerca de 1350 mm^3. Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 4 fragmentos.

[00589] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos a partir de fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, o fragmento do tumor é obtido por dissecção afiada. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 10 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 8 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 1 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 2 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 3 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 4 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 5 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 6 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 7 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 8 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 9 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 10 mm^3. Em algumas modalidades, os fragmentos de tumor são 1 a 4 mm x 1 a 4 mm x 1 a 4 mm. Em algumas modalidades, os fragmentos de tumor são de 1 mm x 1 mm x 1 mm. Em algumas modalidades, os fragmentos de tumor são de 2 mm x 2 mm x 2 mm. Em algumas modalidades, os fragmentos de tumor são de 3 mm x 3 mm x 3 mm. Em algumas modalidades, os fragmentos de tumor são de 4 mm x 4 mm x 4 mm.

[00590] Em algumas modalidades, os tumores são fragmentados a fim de minimizar a quantidade de tecidos hemorrágicos, necróticos e/ou gordurosos em cada pedaço. Em algumas modalidades, os tumores são fragmentados a fim de minimizar a quantidade de tecido hemorrágico em

cada pedaço. Em algumas modalidades, os tumores são fragmentados a fim de minimizar a quantidade de tecido necrótico em cada pedaço. Em algumas modalidades, os tumores são fragmentados a fim de minimizar a quantidade de tecido adiposo em cada pedaço. Em certas modalidades, a etapa de fragmentação do tumor é um método *in vitro* ou *ex-vivo.*

[00591] Em algumas modalidades, a fragmentação do tumor é realizada a fim de manter a estrutura interna do tumor. Em algumas modalidades, a fragmentação do tumor é realizada sem pré-formar um movimento de serra com um bisturi. Em algumas modalidades, os TILs são obtidos a partir de digestão de tumor. Em algumas modalidades, a digestão do tumor foi gerada por incubação em meio enzimático, por exemplo, porém sem limitação, RPMI 1640, GlutaMAX a 2 mM, 10 mg/ml de gentamicina, 30 U/ml de DNase e 1,0 mg/ml de colagenase, seguido por dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de colocar o tumor em meio enzimático, 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 a 5% e então mecanicamente interrompida novamente por aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado novamente por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 a 5%, o tumor pode ser interrompido mecanicamente uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, após a terceira interrupção mecânica se grandes pedaços de tecido estivessem presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais foram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 ºC em CO_2 a 5%. Em algumas modalidades, no fim da incubação final, se a suspensão de células contiver um grande número de glóbulos vermelhos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade usando Ficoll pode ser realizada para remover essas células.

[00592] Em algumas modalidades, a suspensão de células antes da primeira etapa de expansão de iniciação é chamada de "população de células

primárias" ou uma população de células "recém-obtida" ou "recém-isolada".

[00593] Em algumas modalidades, as células podem ser opcionalmente congeladas após o isolamento da amostra (por exemplo, após a obtenção da amostra de tumor e/ou após a obtenção da suspensão de células da amostra de tumor) e armazenadas congeladas antes da entrada na expansão descrita na Etapa B, que é descrita em mais detalhes abaixo, bem como exemplificado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C).

1. TILS DERIVADOS DE BIÓPSIA POR AGULHA/BIÓPSIA PEQUENA

[00594] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos inicialmente de uma amostra de tumor de paciente ("TILs primários") obtida por uma biópsia por agulha ou procedimento semelhante e, em seguida, expandidos em uma população maior para manipulação adicional, conforme descrito neste documento, opcionalmente criopreservado e opcionalmente avaliado para fenótipo e parâmetros metabólicos.

[00595] Em algumas modalidades, uma amostra de tumor de paciente pode ser obtida usando métodos conhecidos na técnica, geralmente por meio de pequena biópsia, biópsia por agulha, biópsia de agulha ou outros meios para obter uma amostra que contém uma mistura de tumor e células TIL. Em geral, a amostra de tumor pode ser de qualquer tumor sólido, incluindo tumores primários, tumores invasivos ou tumores metastáticos. A amostra de tumor também pode ser um tumor líquido, como um tumor obtido de uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, a amostra pode ser de várias amostras pequenas de tumor ou biópsias. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender várias amostras de tumor de um único tumor do mesmo paciente. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender várias amostras de tumor de um, dois, três ou quatro tumores do mesmo paciente. Em algumas modalidades, a amostra pode compreender várias amostras de tumor de vários tumores do mesmo paciente. O tumor sólido pode ser de qualquer tipo de câncer, incluindo, porém sem limitação, mama,

pâncreas, próstata, colorretal, pulmão, cérebro, renal, estômago e pele (incluindo, porém sem limitação, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais e melanoma). Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer de cabeça e pescoço (incluindo, por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (GBM), câncer gastrointestinal, câncer de ovário, sarcoma, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Em algumas modalidades, TILs úteis são obtidos a partir de tumores de melanoma maligno, uma vez que foi relatado que estes têm níveis particularmente elevados de TILs.

[00596] Em geral, a suspensão de células obtida a partir do núcleo ou fragmento do tumor é chamada de "população de células primárias" ou uma população de células "recém-obtida" ou "recém-isolada". Em certas modalidades, a população de células recém-obtida de TILs é exposta a um meio de cultura de células compreendendo células de apresentação de antígeno, IL-2 e OKT-3.

[00597] Em algumas modalidades, se o tumor é metastático e a lesão primária foi tratada/removida de forma eficiente 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 área axilar, quando disponível. Em algumas modalidades, uma lesão de pele é removida ou uma pequena biópsia da mesma é removida. Em algumas modalidades, um linfonodo ou uma pequena biópsia do mesmo é removido. Em algumas modalidades, uma lesão metastática pulmonar ou hepática, ou um linfonodo intra-abdominal ou torácico ou uma pequena biópsia podem ser empregados.

[00598] Em algumas modalidades, o tumor é um melanoma. Em algumas modalidades, a pequena biópsia para um melanoma compreende uma

toupeira ou porção da mesma.

[00599] 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 torno de uma toupeira suspeita. Em algumas modalidades, a biópsia por punção é obtida com uma lâmina circular pressionada na pele e um pedaço redondo de pele é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia por punção e a porção redonda do tumor é removida.

[00600] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e toda a mancha ou crescimento é removido. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia excisional e toda a verruga ou tumor é removido junto com uma pequena borda de pele de aparência normal.

[00601] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e apenas a parte mais irregular de uma verruga ou tumor é retirada. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia incisional e a biópsia incisional é usada quando outras técnicas não podem ser concluídas, como se uma verruga suspeita for muito grande.

[00602] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia pulmonar. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por broncoscopia. Em geral, na broncoscopia, o paciente é colocado sob anestesia, e uma pequena ferramenta passa pelo nariz ou boca, desce pela garganta e entra nas vias brônquicas, onde pequenas ferramentas são usadas para remover algum tecido. Em algumas modalidades, quando o tumor ou crescimento não pode ser alcançado por meio de broncoscopia, uma biópsia por agulha transtorácica pode ser empregada. Em geral, para uma biópsia por agulha transtorácica, o paciente também está sob anestesia e uma agulha é

inserida através da pele diretamente no local suspeito para remover uma pequena amostra de tecido. Em algumas modalidades, uma biópsia por agulha transtorácica pode exigir radiologia intervencionista (por exemplo, o uso de raios-x ou tomografia computadorizada para guiar a agulha). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por biópsia por agulha. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por ultrassom endoscópico (por exemplo, um endoscópio com uma luz e é colocado através da boca no esôfago). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida cirurgicamente.

[00603] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de 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 pequeno pedaço de tecido é cortado de uma área de aparência anormal. Em algumas modalidades, se a região anormal for facilmente acessada, a amostra pode ser retirada sem hospitalização. Em algumas modalidades, se o tumor estiver mais profundo dentro da boca ou garganta, a biópsia pode precisar ser feita em uma sala de cirurgia, 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 toda a área é removida. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma aspiração por agulha fina (FNA). Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma aspiração por agulha fina (FNA), em que uma agulha muito fina acoplada 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 uma pinça de punção é usada para remover um pedaço da área suspeita.

[00604] Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia cervical. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é obtida por

colposcopia. Em geral, os métodos de colposcopia empregam o uso de um instrumento de aumento iluminado acoplado a binóculos de aumento (um colposcópio), que é então usado para fazer a biópsia de uma pequena seção da superfície do colo do útero. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de conização/cone. Em algumas modalidades, a pequena biópsia é uma biópsia de conização/cone, em que uma cirurgia ambulatorial 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, uma biópsia em cone pode servir como um tratamento inicial.

[00605] O termo "tumor sólido" se refere a uma massa anormal de tecido que geralmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo "câncer de tumor sólido" se refere a tumores sólidos malignos, neoplásicos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, porém sem limitação, sarcomas, carcinomas e linfomas, tais como cânceres de pulmão, mama, câncer de mama triplo negativo, próstata, cólon, reto e bexiga. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado dentre câncer cervical, câncer de cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de mama triplo negativo e carcinoma de pulmão de células não pequenas. A estrutura do tecido de tumores sólidos inclui compartimentos de tecido interdependentes, incluindo o parênquima (células cancerosas) e as células estromais de suporte nas quais as células cancerosas estão dispersas e que podem fornecer um microambiente de suporte.

[00606] Em algumas modalidades, a amostra do tumor é obtida como um aspirado de agulha fina (FNA), uma biópsia por agulha, uma pequena biópsia (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção). Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiro em um G-Rex 10. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiro em um G-Rex 10 quando há 1 ou 2 biópsia por agulha e/ou pequenas amostras de biópsia. Em algumas

modalidades, a amostra é colocada primeiro em um G-Rex 100 quando há 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais biópsias por agulha e/ou pequenas amostras de biópsia. Em algumas modalidades, a amostra é colocada primeiro em um G-Rex 500 quando há 3, 4, 5, 6, 8, 9 ou 10 ou mais biópsias por agulha e/ou pequenas amostras de biópsia.

[00607] O FNA pode ser obtido a partir de um tumor selecionado do grupo que consiste em pulmão, melanoma, cabeça e pescoço, cervical, ovário, pancreático, glioblastoma, colorretal e sarcoma. Em algumas modalidades, o FNA é obtido de um tumor de pulmão, como um tumor de pulmão de um paciente com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Em alguns casos, o paciente com NSCLC foi previamente submetido a um tratamento cirúrgico.

[00608] Os TILs aqui descritos podem ser obtidos a partir 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 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 400000 TILs, por exemplo, 400000 TILs, 450000 TILs, 500000 TILs, 550000 TILs, 600000 TILs, 650000 TILs, 700000 TILs, 750000 TILs, 800000 TILs, 850000 TILs, 900000 TILs, 950000 TILs ou mais.

[00609] Em alguns casos, os TILs aqui descritos são obtidos a partir de uma amostra de biópsia por agulha. Em alguns casos, a amostra de biópsia do núcleo é obtida ou isolada do paciente usando uma agulha cirúrgica ou médica 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 do paciente pode conter pelo menos 400000 TILs, por exemplo, 400000 TILs, 450000 TILs, 500000 TILs, 550000 TILs, 600000 TILs, 650000 TILs, 700000 TILs,

750000 TILs, 800000 TILs, 850000 TILs, 900000 TILs, 950000 TILs ou mais.

[00610] Em geral, a suspensão de células colhidas é chamada de "população de células primárias" ou população de células "recém-colhidas".

[00611] Em algumas modalidades, os TILs não são obtidos a partir de digestão de tumor. Em algumas modalidades, os núcleos de tumor sólido não são fragmentados.

[00612] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos a partir de digestão de tumor. Em algumas modalidades, a digestão do tumor foi gerada por incubação em meio enzimático, por exemplo, porém sem limitação, RPMI 1640, GlutaMAX a 2 mM, 10 mg/ml de gentamicina, 30 U/ml de DNase e 1,0 mg/ml de colagenase, seguido por dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de colocar o tumor em meio enzimático, 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 a 5% e então mecanicamente interrompida novamente por aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado novamente por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 a 5%, o tumor pode ser interrompido mecanicamente uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, após a terceira interrupção mecânica se grandes pedaços de tecido estivessem presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais foram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 ºC em CO_2 a 5%. Em algumas modalidades, no fim da incubação final, se a suspensão de células contiver um grande número de glóbulos vermelhos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade usando Ficoll pode ser realizada para remover essas células.

2. MÉTODOS DE EXPANSÃO DE LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO (PBLS) A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO

[00613] Método PBL 1. Em uma modalidade da invenção, os PBLs são

expandidos usando os processos descritos neste documento. Em uma modalidade da invenção, o método compreende a obtenção de uma amostra de PBMC de sangue total. Em uma modalidade, o método compreende o enriquecimento de células T pelo isolamento de células T puras de PBMCs usando a seleção negativa de uma fração não CD19+. Em uma modalidade, o método compreende o enriquecimento de células T pelo isolamento de células T puras de PBMCs usando seleção negativa baseada em microesferas magnéticos de uma fração não CD19+.

[00614] Em uma modalidade da invenção, o Método PBL 1 é realizado como segue: No Dia 0, uma amostra de PBMC criopreservada é descongelada e PBMC são contados. As células T são isoladas usando um kit de isolamento humano Pan T-Cell e colunas LS (Miltenyi Biotec).

[00615] Método PBL 2. Em uma modalidade da invenção, os PBLs são expandidos usando o Método 2 de PBL, que compreende a obtenção de uma amostra de PBMC de sangue total. As células T das PBMCs são enriquecidas incubando as PBMCs por pelo menos três horas a 37 ºC e, em seguida, isolando as células não aderentes.

[00616] Em uma modalidade da invenção, o Método PBL 2 é realizado da seguinte forma: No Dia 0, a amostra de PMBC criopreservada é descongelada e as células PBMC são semeadas em 6 milhões de células por poço em uma placa de 6 poços em meio CM-2 e incubadas por 3 horas a 37 graus Celsius. Após 3 horas, as células não aderentes, que são os PBLs, são removidas e contadas.

[00617] Método PBL 3. Em uma modalidade da invenção, os PBLs são expandidos usando o Método 3 de PBL, que compreende a obtenção de uma amostra de PBMC de sangue periférico. As células B são isoladas usando uma seleção CD19+ e as células T são selecionadas usando a seleção negativa da fração não CD19+ da amostra de PBMC.

[00618] Em uma modalidade da invenção, o Método 3 de PBL é

realizado como segue: No Dia 0, PBMCs criopreservadas derivadas de sangue periférico são descongeladas e contadas. As células B CD19+ são classificadas usando um kit CD19 Multisort, Human (Miltenyi Biotec). Da fração de células não CD19+, as células T são purificadas usando o Human Pan T-cell Isolation Kit e LS Columns (Miltenyi Biotec).

[00619] Em uma modalidade, PBMCs são isoladas de uma amostra de sangue total. Em uma modalidade, a amostra de PBMC é usada como material de partida para expandir os PBLs. Em uma modalidade, a amostra é criopreservada antes do processo de expansão. Em outra modalidade, uma amostra fresca é usada como o material de partida para expandir os PBLs. Em uma modalidade da invenção, as células T são isoladas de PBMCs usando métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, as células T são isoladas usando um kit de isolamento de células T Pan Humanas e colunas LS. Em uma modalidade da invenção, células T são isoladas de PBMCs usando métodos de seleção de anticorpos conhecidos na técnica, por exemplo, seleção negativa de CD19.

[00620] Em uma modalidade da invenção, a amostra de PBMC é incubada por um período de tempo a uma temperatura desejada eficaz para identificar as células não aderentes. Em uma modalidade da invenção, o tempo de incubação é de cerca de 3 horas. Em uma modalidade da invenção, a temperatura é de cerca de 37 ºC. As células não aderentes são então expandidas usando o processo descrito acima.

[00621] Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi opcionalmente pré-tratado com um regime que compreende um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK. Em algumas modalidades, a amostra de tumor é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime que compreende um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK. Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime que compreende um

inibidor de quinase ou um inibidor de ITK, foi submetido a tratamento por pelo menos 1 mês, pelo menos 2 meses, pelo menos 3 meses, pelo menos 4 meses, pelo menos 5 meses, pelo menos 6 meses ou 1 ano ou mais. Em outra modalidade, as PBMCs são derivadas de um paciente que está atualmente em um regime de inibidor de ITK, como ibrutinib.

[00622] Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK e é refratário ao tratamento com um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK, como ibrutinib.

[00623] Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime que compreende um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK, mas não está mais em tratamento com um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK. Em algumas modalidades, a amostra de PBMC é de um sujeito ou paciente que foi pré-tratado com um regime compreendendo um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK, mas não está mais em tratamento com um inibidor de quinase ou um inibidor de ITK e não foi submetido a tratamento para pelo menos 1 mês, pelo menos 2 meses, pelo menos 3 meses, pelo menos 4 meses, pelo menos 5 meses, pelo menos 6 meses, ou pelo menos 1 ano ou mais. Em outra modalidade, as PBMCs são derivadas de um paciente que teve exposição anterior a um inibidor de ITK, mas não foi tratado em pelo menos 3 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses ou pelo menos 1 ano.

[00624] Em uma modalidade da invenção, no Dia 0, as células são selecionadas para CD19+ e classificadas em conformidade. Em uma modalidade da invenção, a seleção é feita usando microesferas de ligação de anticorpo. Em uma modalidade da invenção, as células T puras são isoladas no Dia 0 das PBMCs.

[00625] Em uma modalidade da invenção, para pacientes que não são pré-tratados com ibrutinib ou outro inibidor de ITK, 10 a 15ml de camada

leucocitária irão render cerca de 5×10^9 PBMCs, que, por sua vez, irão produzir cerca de $5,5 \times 10^7$ PBLs.

[00626] Em uma modalidade da invenção, para os pacientes que são pré-tratados com Ibrutinib ou outro inibidor de ITK, o processo de expansão irá produzir cerca de 20×10^9 PBLs. Em uma modalidade da invenção, $40,3 \times 10^6$ PBMCs produzirão cerca de $4,7 \times 10^5$ PBLs.

[00627] Em qualquer uma das modalidades anteriores, as PBMCs podem ser derivadas de uma amostra de sangue total, por aférese, a partir da camada leucocitária ou de qualquer outro método conhecido na técnica para obter PBMCs.

3. MÉTODOS DE EXPANSÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DA MEDULA (MILS) A PARTIR DE PBMCS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA

[00628] Método MIL 3. Em uma modalidade da invenção, o método compreende a obtenção de PBMCs da medula óssea. No Dia 0, as PBMCs são selecionadas para CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ e classificados, e a fração de células não CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ é sonicada e uma porção da fração de célula sonicada é adicionada de volta à fração de célula selecionada.

[00629] Em uma modalidade da invenção, o Método MIL 3 é realizado como segue: No Dia 0, uma amostra criopreservada de PBMCs é descongelada e PBMCs são contadas. As células são coradas com anticorpos CD3, CD33, CD20 e CD14 e classificadas usando uma célula S3e classificada (Bio-Rad). As células são classificadas em duas frações - uma fração de células imunes (ou a fração MIL) (CD3+CD33+CD20+CD14+) e uma fração de células blásticas de LMA (não CD3+CD33+CD20+CD14+).

[00630] Em uma modalidade da invenção, PBMCs são obtidas a partir da medula óssea. Em uma modalidade, as PBMCs são obtidas a partir da medula óssea por aférese, aspiração, biópsia por agulha ou outros meios semelhantes conhecidos na técnica. Em uma modalidade, as PBMCs são

novas. Em outra modalidade, as PBMCs são criopreservadas.

[00631] Em uma modalidade da invenção, MILs são expandidos de 10 a 50 ml de aspirado de medula óssea. Em uma modalidade da invenção, 10 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em outra modalidade, 20 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em outra modalidade, 30 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em outra modalidade, 40 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente. Em outra modalidade, 50 ml de aspirado de medula óssea são obtidos do paciente.

[00632] Em uma modalidade da invenção, o número de PBMCs produzidas de cerca de 10 a 50 ml de aspirado de medula óssea é de cerca de 5×10^7 a cerca de 10×10^7 PBMCs. Em outra modalidade, o número de PMBCs produzidas é de cerca de 7×10^7 PBMCs.

[00633] Em uma modalidade da invenção, cerca de 5×10^7 a cerca de 10×10^7 PBMCs produz cerca de $0,5 \times 10^6$ a cerca de $1,5 \times 10^6$ MILs. Em uma modalidade da invenção, cerca de 1×10^6 MILs são produzidos.

[00634] Em uma modalidade da invenção, 12×10^6 PBMC derivadas de aspirado de medula óssea rendem aproximadamente $1,4 \times 10^5$ MILs.

[00635] Em qualquer uma das modalidades anteriores, as PBMCs podem ser derivadas de uma amostra de sangue total, da medula óssea, por aférese, do revestimento leucocitário ou de qualquer outro método conhecido na técnica para obter PBMCs.

B. ETAPA B: PREPARANDO A PRIMEIRA EXPANSÃO

[00636] Em algumas modalidades, os presentes métodos fornecem TILs mais jovens, que podem fornecer benefícios terapêuticos adicionais em relação aos TILs mais antigos (isto é, TILs que passaram por mais rodadas de replicação antes da administração a um sujeito/paciente). As características de jovens TILs 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 incorporados no presente documento a título de referência na sua totalidade.

[00637] Após a dissecção ou digestão de fragmentos de tumor e/ou fragmentos de tumor, por exemplo, como descrito na Etapa A da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), as células resultantes são cultivadas em soro contendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras (por exemplo, células alimentadoras apresentadoras de antígeno), sob condições que favorecem o crescimento de TILs sobre o tumor e outras células. Em algumas modalidades, as células IL-2, OKT-3 e de alimentação são adicionadas no início da cultura junto com a digestão do tumor e/ou fragmentos do tumor (por exemplo, no Dia 0). Em algumas modalidades, a digestão do tumor e/ou fragmentos do tumor são incubados em um recipiente com até 60 fragmentos por recipiente e com 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente de 1 a 8 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente de 1 a 7 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação ocorre por um período de 1 a 8 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação ocorre por um período de 1 a 7 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8

células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de iniciação ocorre por um período de 5 a 8 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de iniciação ocorre por um período de 5 a 7 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de iniciação ocorre por um período de cerca de 6 a 8 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de iniciação ocorre por um período de cerca de 6 a 7 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de iniciação ocorre por um período de cerca de 7 a 8 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa primeira expansão de iniciação ocorre por um período de cerca de 7 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, esta primeira expansão de iniciação ocorre por um período de cerca de 8 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa.

[00638] Em uma modalidade preferencial, a expansão de TILs pode ser realizada usando uma primeira etapa de expansão de iniciação (por exemplo, como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que pode incluir os processos referidos como pré-REP ou REP de iniciação e que contêm células alimentadoras do Dia 0 e/ou do início da cultura) conforme descrito abaixo e neste documento, seguido por uma segunda expansão rápida (Etapa D, incluindo processos referidos como etapas de protocolo de expansão rápida (REP)) conforme descrito abaixo na Etapa D e aqui, seguida por criopreservação opcional e

seguida por uma segunda Etapa D (incluindo processos referidos como etapas de REP de nova estimulação), conforme descrito abaixo e aqui. Os TILs obtidos a partir desse processo podem ser opcionalmente caracterizados quanto às características fenotípicas e parâmetros metabólicos, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 10 mm^3.

[00639] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão é referido como "CM", uma abreviatura para meios de cultura. Em algumas modalidades, CM para a Etapa B consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano a 10%, Hepes a 25 mM e 10 mg/ml de gentamicina.

[00640] Em algumas modalidades, existem menos de 240 fragmentos de tumor ou 240 fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, há menos de 240 fragmentos de tumor ou 240 fragmentos de tumor colocados em menos de 4 recipientes ou 4 recipientes. Em algumas modalidades, os recipientes são frascos GREX100 MCS. Em algumas modalidades, menos de 60 fragmentos de tumor ou 60 fragmentos de tumor são colocados em 1 recipiente. Em algumas modalidades, cada recipiente compreende menos de 500 ml de meio ou 500 ml 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 de apresentação de antígeno (também referidas neste documento como "células de apresentação de antígeno"). Em algumas modalidades, o meio compreende $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação 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 de OKT-3 e $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação de

antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/ml de IL-2, 30 ng/ml de OKT-3 e 2,5 × 10^8 células alimentadoras de apresentação de antígeno por recipiente.

[00641] Após a preparação dos fragmentos de tumor, as células resultantes (ou seja, fragmentos que são uma população de células primárias) são cultivadas em meio contendo IL-2, células alimentadoras de apresentação de antígeno e OKT-3 sob condições que favorecem o crescimento de TILs sobre o tumor e outras células e que permitem a iniciação de TIL e o crescimento acelerado desde o início da cultura no Dia 0. Em algumas modalidades, a digestão do tumor e/ou fragmentos do tumor são incubados com 6000 UI/ml de IL-2, bem como células alimentadoras de apresentação de antígeno e OKT-3. Essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente de 1 a 8 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1 × 10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, o meio de crescimento durante a primeira expansão de iniciação compreende IL-2 ou uma variante da mesma, bem como células alimentadoras de apresentação de antígeno e OKT-3. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de dias, geralmente de 1 a 7 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1 × 10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, o meio de crescimento durante a primeira expansão de iniciação compreende IL-2 ou uma variante da mesma, bem como células alimentadoras de apresentação 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 a 30 × 10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20 × 10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 25 × 10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas

modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 30 × 10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 4 a 8 × 10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 5 a 7 × 10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 6 × 10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 é preparada conforme descrito no Exemplo C. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 10000 UI/ml de IL-2, cerca de 9000 UI/ml de IL-2, cerca de 8000 UI/ml de IL-2, cerca de 7000 UI/ml de IL-2, cerca de 6000 UI/ml de IL-2 ou cerca de 5000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 9000 UI/ml de IL-2 a cerca de 5000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 8000 UI/ml de IL-2 a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 7000 UI/ml de IL-2 a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende ainda IL-2. Em uma modalidade preferencial, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação 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 primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação 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.

[00642] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão de preparação 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 de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 500 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 400 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 300 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 200 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15. Em uma modalidade, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende ainda IL-15. Em uma modalidade preferencial, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15.

[00643] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão de preparação compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21, cerca de 15 UI/ml de IL-21, cerca de 12 UI/ml de IL-21, cerca de 10 UI/ml de IL-21, cerca de 5 UI/ml de IL-21, cerca de 4 UI/ml de IL-21, cerca de 3 UI/ml de IL-21, cerca de 2 UI/ml de IL-21, cerca de 1 UI/ml de IL-21, ou cerca de

0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 15 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 12 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 10 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 5 UI/ml de IL-21 a cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 2 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-21. Em uma modalidade preferencial, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21.

[00644] Em uma modalidade, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende cerca de 30 ng/ml de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende cerca de 0,1 ng/ml, cerca de 0,5 ng/ml, cerca de 1 ng/ml, cerca de 2,5 ng/ml, cerca de 5 ng/ml, cerca de 7,5 ng/ml, cerca de 10 ng/ml, cerca de 15 ng/ml, cerca de 20 ng/ml, cerca de 25 ng/ml, cerca de 30 ng/ml, cerca de 35 ng/ml, cerca de 40 ng/ml, cerca de 50 ng/ml, cerca de 60 ng/ml, cerca de 70 ng/ml, cerca de 80 ng/ml, cerca de 90 ng/ml, cerca de 100 ng/ml, cerca de 200 ng/ml, cerca de 500 ng/ml e cerca de 1 μg/ml de anticorpo OKT-3. Em uma

modalidade, o meio de cultura de células compreende entre 0,1 ng/ml e 1 ng/ml, entre 1 ng/ml e 5 ng/ml, entre 5 ng/ml e 10 ng/ml, entre 10 ng/ml e 20 ng/ml, entre 20 ng/ml e 30 ng/ml, entre 30 ng/ml e 40 ng/ml, entre 40 ng/ml e 50 ng/ml, e entre 50 ng/ml e 100 ng/ml de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende entre 15 ng/ml e 30 ng/ml de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende 30 ng/ml de anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o anticorpo OKT-3 é muromonab.

TABELA 3: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE MUROMONAB (ANTICORPO OKT-3 EXEMPLIFICATIVO)

Identificador	**Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)**
SEQ ID NO: 1 Cadeia pesada de Muromonab	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 Muromonab	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

[00645] Em algumas modalidades, o meio de cultura de primeira expansão de iniciação compreende um ou mais agonistas TNFRSF em um meio de cultura de células. 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 do 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 atingir uma concentração no meio de cultura de células entre 0,1 µg/ml e 100 µg/ml. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é adicionado em uma concentração suficiente para atingir uma concentração no meio de cultura de células entre 20 µg/ml e 40 µg/ml.

[00646] Em algumas modalidades, além de um ou mais agonistas de TNFRSF, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende ainda IL-2 a uma concentração inicial de cerca de 3000 UI/ml e o anticorpo OKT-3 a uma concentração inicial de cerca de 30 ng/ml, e em que o um ou mais agonistas de TNFRSF compreendem um agonista de 4-1BB. Em algumas modalidades, além de um ou mais agonistas de TNFRSF, o primeiro meio de cultura de células de expansão de iniciação compreende ainda IL-2 a uma concentração inicial de cerca de 6000 UI/ml e o anticorpo OKT-3 a uma concentração inicial de cerca de 30 ng/ml, e em que o um ou mais agonistas de TNFRSF compreendem um agonista de 4-1BB.

[00647] Em algumas modalidades, o meio de cultura da primeira expansão de iniciação é referido como “CM”, uma abreviação para meios de cultura. Em algumas modalidades, o mesmo é referido como CM1 (meio de cultura 1). Em algumas modalidades, CM consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano a 10%, Hepes a 25 mM e gentamicina 10 mg/ml. Em algumas modalidades, o CM é o CM1 descrito nos Exemplos, consultar o Exemplo A. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação ocorre em um meio de cultura de células inicial ou um primeiro meio de cultura de células. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação meio de cultura ou o meio de cultura de células incial ou o primeiro meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 e células alimentadoras de apresentação de antígeno (também referidas no presente documento como células alimentadoras).

[00648] Em algumas modalidades, o meio de cultura usado nos

processos de expansão aqui divulgados é um meio sem soro ou um meio definido. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é usado para prevenir e/ou diminuir a variação experimental devido em parte à variação lote a lote de meios contendo soro.

[00649] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou reposição de soro. Em algumas modalidades, o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[00650] Em algumas modalidades, o suplemento de soro ou substituição de soro inclui, porém sem limitação, um ou mais de suplemento sérico de expansão de células T CTS™ OpTmizer, substituição de soro celular imune CTS™, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-

fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

[00651] Em algumas modalidades, a substituição de soro celular imune de células T CTS™OpTmizer™ é usada com meios de crescimento convencionais, incluindo, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[00652] Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro (% em volume) no meio sem soro ou no meio definido é de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio definido ou livre de soro total. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 3% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 5% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 10% do volume total do meio sem soro ou definido.

[00653] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do

meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific). Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e a concentração final de 2-mercaptoetanol nos meios é 55 μM.

[00654] Em algumas modalidades, o meio definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o

SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular

imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e a concentração final de 2-mercaptoetanol nos meios é 55 μM.

[00655] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM, ou 4 mM a cerca de 5 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

[00656] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM, ou cerca de 65 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM. Em algumas modalidades, a concentração final de 2-mercaptoetanol no meio é de 55 μM.

[00657] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos na Publicação PCT Internacional nº WO/1998/030679, que é incorporada no presente documento a título de referência, são úteis na presente invenção. Nessa publicação, são descritos meios de cultura de células eucarióticas sem soro. O meio de cultura de células eucarióticas sem soro inclui um meio de cultura de células basais suplementado com um suplemento sem soro capaz

de suportar o crescimento de células em cultura sem soro. O suplemento de meio de cultura de células eucarióticas sem soro compreende ou é obtido pela combinação de um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais elementos traço e um ou mais antibióticos. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou beta-mercaptoetanol. Em algumas modalidades, o meio definido compreende uma albumina ou um substituto da albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, um ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio de células basais é selecionado a partir do grupo que consiste no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), no meio mínimo essencial (MEM), no meio basal de Eagle (BME), em RPMI 1640, em F-10, em F-12, no meio mínimo essencial (αMEM), no meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), no meio de crescimento RPMI e no meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[00658] Em algumas modalidades, a concentração de glicina no meio

definido está na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-histidina é de cerca de 5 a 250 mg/l, a concentração de L-isoleucina é de cerca de 5 a 300 mg/l, a concentração de L-metionina é de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-fenilalanina é de cerca de 5 a 400 mg/l, a concentração de L-prolina é de cerca de 1 a 1000 mg/l, a concentração de L-hidroxiprolina é de cerca de 1 a 45 mg/l, a concentração de L-serina é de cerca de 1 a 250 mg/l, a concentração de L-treonina é de cerca de 10 a 500 mg/l, a concentração de L-triptofano é de cerca de 2 a 110 mg/l, a concentração de L-tirosina é de cerca de 3 a 175 mg/l, a concentração de L-valina é de cerca de 5 a 500 mg/l, a concentração de tiamina é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de glutationa reduzida é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de ácido L-ascórbico-2-fosfato é de cerca de 1 a 200 mg/l, a concentração de transferrina saturada de ferro é de cerca de 1 a 50 mg/l, a concentração de insulina é de cerca 1 a 100 mg/l, a concentração de selenita de sódio é de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e a concentração de albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) é de cerca de 5000 a 50000 mg/l.

[00659] Em algumas modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração em 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas concentrações finais listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial de 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, o meio definido é um meio de células basais que compreende um suplemento sem soro. Em algumas dessas modalidades, o suplemento sem soro compreende ingredientes da porção química não-traço do tipo e nas concentrações listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial no suplemento" na Tabela A abaixo.

TABELA A: CONCENTRAÇÕES DE INGREDIENTES DE PORÇÃO

QUÍMICA DE ELEMENTO NÃO-TRAÇO

Ingrediente	Uma modalidade preferencial em suplemento (mg/l) (Cerca de)	Faixa de concentração em 1X meio (mg/l) (Cerca de)	Uma modalidade preferencial em 1X meio (mg/l) (Cerca de)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-fenilalanina	1800	5-400	336
L-Prolina	4000	1-1000	600
L-hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-treonina	2200	10-500	425
L-triptofano	440	2-110	82
L-tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutationa Reduzida	10	1-20	1,5
Ácido ascórbico-2-PO_4 (sal de magnésio)	330	1-200	50
Transferrina (ferro saturado)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenita de Sódio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83000	5000-50000	12500

[00660] Em algumas modalidades, a osmolaridade do meio definido está entre cerca de 260 e 350 mOsmol. Em algumas modalidades, a osmolaridade está entre cerca de 280 e 310 mOsmol. Em algumas modalidades, o meio definido é suplementado com até cerca de 3,7 g/l, ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio. O meio definido pode ser suplementado com L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM), 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

[00661] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos em Smith, *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement", *Clin Transl Immunology*, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) são úteis na presente invenção. Resumidamente, RPMI ou CTS™ OpTmizer™ foi usado como o meio de células basais e suplementado com substituição de soro celular imune CTS™ a 0, 2%, 5% ou 10%.

[00662] Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou

segundo recipiente permeável a gás 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 permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

[00663] Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 1 a 8 dias, conforme discutido nos exemplos e nas figuras. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 2 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 3 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 4 a 8 dias, conforme discutido nos exemplos e nas figuras. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 1 a 7 dias, conforme discutido nos exemplos e nas figuras. Em algumas modalidades, o processo

da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 2 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 2 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 3 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 3 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 4 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às

vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 5 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 5 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 6 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 6 a 7 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles fornecidos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 7 a 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles fornecidos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 8 dias. Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão de iniciação (incluindo processos tais como por exemplo aqueles fornecidos na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), que podem incluir aqueles às vezes referidos como a pré-REP ou REP de iniciação) é 7 dias.

[00664] Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 1 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação

ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 1 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 2 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 2 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 3 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 3 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 4 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 4 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 5 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 5 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 6 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira

expansão de TIL de iniciação pode proceder por 6 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 7 a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL de iniciação pode proceder por 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada.

[00665] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação dos TILs pode prosseguir por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 1 dia a 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 1 dia a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 3 dias a 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 3 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 4 dias a 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 4 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 5 dias a 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 5 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 6 dias a 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 6 dias a 7 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 7 a 8 dias. Em algumas

modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 8 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 7 dias.

[00666] 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 iniciação. Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21, bem como quaisquer combinações dos mesmos, podem ser incluídos durante a primeira expansão de iniciação, incluindo, por exemplo, durante os processos da Etapa B de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), 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 iniciação. Em algumas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21, bem como quaisquer combinações das mesmas, podem ser incluídas durante os processos da Etapa B de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) e conforme descrito aqui.

[00667] Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação, por exemplo, Etapa B de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. 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-10 ou 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 ANTÍGENOS

[00668] Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a

expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como "células apresentadoras de antígeno") na iniciação da expansão de TIL, mas em vez disso são adicionadas durante a primeira expansão de iniciação. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como "células apresentadoras de antígeno") na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante os dias 4 a 8. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como "células apresentadoras de antígeno") na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante os dias 4 a 7. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como "células apresentadoras de antígeno") na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento

durante os dias 5 a 8. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como "células apresentadoras de antígeno") na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante os dias 5 a 7. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como "células apresentadoras de antígeno") na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante os dias 6 a 8. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como "células apresentadoras de antígeno") na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante os dias 6 a 7. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células

alimentadoras (também referidas no presente documento como “células apresentadoras de antígeno”) na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante o dia 7 ou 8. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como “células apresentadoras de antígeno”) na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante o dia 7. Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) não exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como “células apresentadoras de antígeno”) na iniciação da expansão de TIL, mas sim foram adicionadas durante a primeira expansão de iniciação em qualquer momento durante o dia 8.

[00669] Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos no presente documento (por exemplo incluindo a expansão como aquelas descritas na Etapa B da Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), bem como aquelas referidas como pré-REP ou REP de iniciação) exigem células alimentadoras (também referidas no presente documento como “células apresentadoras de antígeno”) na iniciação da expansão de TIL e durante a primeira expansão de iniciação. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de unidades de sangue total padrão de doadores de sangue saudáveis alogênicos. As PBMCs são obtidas

usando métodos padrão, como separação por gradiente Ficoll-Paque. Em algumas modalidades, $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras são usadas durante a primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras por recipiente são usadas durante a primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras por GREX-10 são usadas durante a primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras por GREX-100 são usadas durante a primeira expansão de iniciação.

[00670] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos REP, conforme descrito nos exemplos, que fornece um protocolo exemplificativa para avaliar a incompetência de replicação de PBMCs alogênicas irradiadas.

[00671] Em algumas modalidades, PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis no dia 14 for menor que o número inicial de células viáveis colocadas em cultura no dia 0 da primeira expansão de iniciação.

[00672] Em algumas modalidades, PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 não tiver aumentado a partir do número de células viável inicial colocadas em cultura no dia 0 da primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 ng/ml de anticorpo OKT3 e 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 ng/ml de anticorpo OKT3 e 6000 UI/ml de IL-2.

[00673] Em algumas modalidades, PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis,

cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 não tiver aumentado a partir do número de células viável inicial colocadas em cultura no dia 0 da primeira expansão de iniciação. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 5-60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 1000-6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 10-50 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2000-5000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 20-40 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2000-4000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 25-35 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2500-3500 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 ng/ml de anticorpo OKT3 e 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 15 ng/ml de anticorpo OKT3 e 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 de 15 ng/ml e 6000 UI/ml de IL-2.

[00674] Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno são PBMCs. Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno são células alimentadoras artificiais de apresentação de antígeno. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é cerca de 1 a 25, cerca de 1 a 50, cerca de 1 a 100, cerca de 1 a 125, cerca de 1 a 150, cerca de 1 a 175, cerca de 1 a 200, cerca de 1 a 225, cerca de 1 a 250, cerca de 1 a 275, cerca de 1 a 300, cerca de 1 a 325, cerca de 1 a 350, cerca de 1 a 375, cerca de 1 a 400 ou cerca de 1 a 500. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão está entre 1 e 50 e 1 a 300. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão está entre 1 e 100 e 1 a 200.

[00675] Em uma modalidade, os primeiros procedimentos de expansão de iniciação descritos neste documento exigem uma razão de cerca de 2,5 ×

10^8 células alimentadoras para cerca de 100×10^6 TILs. Em outra modalidade, os primeiros procedimentos de expansão de iniciação aqui descritos exigem uma razão de cerca de $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras para cerca de 50×10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, a primeira expansão de iniciação aqui descrita exige cerca de $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras a cerca de 25×10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, a primeira expansão de iniciação aqui descrita exige cerca de $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras. Em ainda outra modalidade, a primeira expansão de iniciação exige um quarto, um terço, cinco duodécimos ou metade do número de células alimentadoras usadas na segunda expansão rápida.

[00676] Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de iniciação compreende IL-2. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de iniciação compreende 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de iniciação compreende células alimentadoras de apresentação de antígeno. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de iniciação compreende $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de iniciação 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 $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação de antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende 6000 UI/ml de IL-2, 30 ng/ml de OKT-3 e $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio compreende 500 ml de meio de cultura e 15 µg de OKT-3 por $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação 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 ng de OKT-3 e 2,5 × 10^8 células alimentadoras de apresentação 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 × 10^8 células alimentadoras de apresentação 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 × 10^8 células alimentadoras de apresentação de antígeno por recipiente.

[00677] Em uma modalidade, os procedimentos da primeira expansão de iniciação descritos neste documento exigem um excesso de células alimentadoras sobre TILs durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de unidades de sangue total padrão de doadores de sangue saudáveis alogênicos. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão, como separação por gradiente Ficoll-Paque. Em uma modalidade, células apresentadoras de antígeno artificial (aAPC) são usadas no lugar de PBMCs.

[00678] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos, incluindo os procedimentos exemplificativos descritos nas figuras e exemplos.

[00679] Em uma modalidade, as células de apresentação de antígeno artificial são usadas na primeira expansão de iniciação como uma substituição para, ou em combinação com, PBMCs.

2. CITOCINAS

[00680] Os métodos de expansão aqui descritos geralmente usam meios de cultura com altas doses de uma citocina, em particular IL-2, como é conhecido na técnica.

[00681] Alternativamente, o uso de combinações de citocinas para a

primeira expansão de iniciação de TILs é adicionalmente possível, com combinações de duas ou mais de IL-2, IL-15 e IL-21, como é geralmente descrito na Publicação Internacional nº WO 2015/189356 e no documento WO 2015/189357, expressamente incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade. Assim, as combinações possíveis incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21, e IL-2, IL-15 e IL-21, com a última encontrando uso particular em muitas modalidades. A utilização de combinações de citocinas favorece especificamente a geração de linfócitos e, em particular, de células T, conforme descrito no presente documento.

TABELA 4: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE INTERLEUCINAS.

Identificador	**Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)**
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 INICIAÇÃO PARA A SEGUNDA EXPANSÃO RÁPIDA

[00682] Em alguns casos, a população de TIL em massa obtida a partir da primeira expansão de iniciação (que pode incluir expansões às vezes referidas como pré-REP), incluindo, por exemplo, a população de TIL obtida

a partir, por exemplo, da Etapa B, conforme indicado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), pode ser submetido a uma segunda expansão rápida (que pode incluir expansões às vezes referidas como Protocolo de Expansão Rápida (REP)) e então criopreservadas conforme discutido abaixo. Da mesma forma, no caso em que TILs geneticamente modificados serão usados na terapia, a população de TIL expandida a partir da primeira expansão de iniciação ou a população de TIL expandida a partir da segunda expansão rápida pode ser submetida a modificações genéticas para tratamentos adequados antes da etapa de expansão ou após a primeira expansão de iniciação e antes da segunda expansão rápida.

[00683] Em algumas modalidades, os TILs obtidos a partir da primeira expansão de iniciação (por exemplo, a partir da Etapa B como indicado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) são armazenados até fenotipados para seleção. Em algumas modalidades, os TILs obtidos a partir da primeira expansão de iniciação (por exemplo, a partir da Etapa B, conforme indicado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) não são armazenados e prosseguem diretamente para a segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, os TILs obtidos a partir da primeira expansão de iniciação não são criopreservados após a primeira expansão de iniciação e antes da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 2 dias, 3 dias, 4, dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 8 dias a partir de quando ocorre a fragmentação do tumor e/ou quando o a primeira etapa de expansão da escorva é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre em cerca de 3 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a primeira etapa de expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de

iniciação para a segunda expansão rápida ocorre em cerca de 3 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a primeira etapa de expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 4 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 4 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 5 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 5 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 6 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 6 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 7 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre em cerca de 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre

em cerca de 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada.

[00684] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre em 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, ou 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 1 dia a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 1 dia a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre 2 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre 2 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre 3 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão ocorre 3 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 4 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 4 dias

a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 5 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 5 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 6 dias a 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 6 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 7 dias a 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 7 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida ocorre 8 dias a partir de quando a fragmentação ocorre e/ou quando a etapa de primeira expansão de iniciação é iniciada.

[00685] Em algumas modalidades, os TILs não são armazenados após a primeira expansão primária e antes da segunda expansão rápida e os TILs procedem diretamente para a segunda expansão rápida (por exemplo, em algumas modalidades, não há armazenamento durante a transição da Etapa B para a Etapa D, conforme mostrado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a transição ocorre

em sistema fechado, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, os TILs da primeira expansão de iniciação, a segunda população de TILs, procedem diretamente para a segunda expansão rápida sem período de transição.

[00686] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida, por exemplo, Etapa C de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o biorreator único empregado é, por exemplo, um GREX-10 ou GREX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida envolve um aumento de escala no tamanho do recipiente. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação é realizada em um recipiente menor do que a segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a primeira expansão de iniciação é realizada em um GREX-100 e a segunda expansão rápida é realizada em um GREX-500.

D. ETAPA D: SEGUNDA EXPANSÃO RÁPIDA

[00687] Em algumas modalidades, a população de células TIL é ainda expandida em número após a colheita e a primeira expansão de iniciação, após a Etapa A e a Etapa B, e a transição referida como Etapa C, conforme indicado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Essa expansão adicional é referida neste documento como a segunda expansão rápida, que pode incluir processos de expansão geralmente referidos na técnica como um processo de expansão rápida (Protocolo de Expansão Rápida ou REP; bem como processos indicados na Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)). A

segunda expansão rápida é geralmente realizada usando um meio de cultura compreendendo uma série de componentes, incluindo células alimentadoras, uma fonte de citocina e um anticorpo anti-CD3, em um recipiente permeável a gás. Em algumas modalidades, 1 dia, 2 dias, 3 dias ou 4 dias após o início da segunda expansão rápida (ou seja, nos dias 8, 9, 10 ou 11 do processo geral Gen 3), os TILs são transferidos para um recipiente de maior volume.

[00688] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida (que pode incluir expansões às vezes referidas como REP; bem como processos indicados na Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)) de TIL pode ser realizada usando quaisquer frascos ou recipientes de TIL conhecidos por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4, dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias ou 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 1 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 1 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 2 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 2 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 3 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 3 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 4 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 4 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da

segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 5 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 5 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 6 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 6 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 7 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 7 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 8 dias a cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 8 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 9 dias a cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 1 dia após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 2 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 3 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 4 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 5 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 6 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em

algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 7 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 8 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 9 dias após a iniciação da segunda expansão rápida. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode proceder por cerca de 10 dias após a iniciação da segunda expansão rápida.

[00689] Em uma modalidade, a segunda expansão rápida pode ser realizada em um recipiente permeável a gás usando os métodos da presente divulgação (incluindo, por exemplo, expansões referidas como REP; bem como processos indicados na Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)). Em algumas modalidades, os TILs são expandidos na segunda expansão rápida na presença de IL-2, OKT-3 e células alimentadoras (também referidas neste documento 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 iniciação. Por exemplo, os TILs podem ser expandidos rapidamente usando estimulação não específica do receptor de células T na presença de interleucina-2 (IL-2) ou interleucina-15 (IL-15). O estímulo do receptor de células T não específico pode incluir, por exemplo, um anticorpo anti-CD3, tal como cerca de 30 ng/ml de OKT3, um anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3 (comercialmente disponível junto à Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA) ou UHCT-1 (comercialmente disponível junto à BioLegend, San Diego, CA, EUA). Os 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 (ou epítopos) do câncer, que pode ser opcionalmente expresso a partir de um vetor, tal como um peptídeo de ligação ao antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), por exemplo, MART-1 a 0,3 μM: 26-35 (27 l) ou gpl 00: 209-217 (210 M), opcionalmente na presença de um fator de crescimento de células T, como 300 UI/ml de IL-2 ou IL-15. Outros antígenos adequados podem incluir, por exemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno de câncer de tirosinase, MAGE-A3, SSX-2 e VEGFR2 ou porções antigênicas dos mesmos. O TIL também pode ser rapidamente expandido por nova estimulação com o mesmo antígeno (ou antígenos) do câncer pulsado nas células apresentadoras de antígeno que expressam HLA-A2. Alternativamente, os TILs podem ser ainda re-estimulados com, por exemplo, linfócitos autólogos irradiados ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. Em algumas modalidades, a nova estimulação 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.

[00690] Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de células 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 de células 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.

[00691] Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 30 ng/ml de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende cerca de 0,1 ng/ml, cerca de 0,5 ng/ml, cerca de 1 ng/ml, cerca de 2,5 ng/ml, cerca de 5 ng/ml, cerca de 7,5 ng/ml, cerca de 10 ng/ml, cerca de 15 ng/ml, cerca de 20 ng/ml, cerca de 25 ng/ml, cerca de 30 ng/ml, cerca de 35 ng/ml, cerca de 40 ng/ml, cerca de 50 ng/ml, cerca de 60 ng/ml, cerca de 70 ng/ml, cerca de 80 ng/ml, cerca de 90 ng/ml, cerca de 100 ng/ml, cerca de 200 ng/ml, cerca de 500 ng/ml e cerca de 1 μg/ml de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende entre 0,1 ng/ml e 1 ng/ml, entre 1 ng/ml e 5 ng/ml, entre 5 ng/ml e 10 ng/ml, entre 10 ng/ml e 20 ng/ml, entre 20 ng/ml e 30 ng/ml, entre 30 ng/ml e 40 ng/ml, entre 40 ng/ml e 50 ng/ml, e entre 50 ng/ml e 100 ng/ml de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende entre 30 ng/ml e 60 ng/ml de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende cerca de 60 ng/ml de OKT-3. Em algumas modalidades, o anticorpo OKT-3 é muromonab.

[00692] 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 de apresentação de antígeno. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação de antígeno por recipiente. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão rápida compreende OKT-3. Em algumas modalidades, o segundo meio de expansão rápido 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 segundo meio de expansão rápido compreende 6000 UI/ml de IL-2, 60 ng/ml de OKT-3 e $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação

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 $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação de antígeno por recipiente.

[00693] 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 de apresentação de antígeno. Em algumas modalidades, o meio compreende entre 5×10^8 e $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras 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 5×10^8 e $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação 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 5×10^8 e $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras de apresentação de antígeno por recipiente.

[00694] Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende um ou mais agonistas de TNFRSF em um meio de cultura de células. 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 do 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 atingir uma concentração no meio de cultura de células entre 0,1 µg/ml e 100 µg/ml. Em algumas modalidades, o agonista de TNFRSF é adicionado em uma concentração suficiente para atingir uma concentração no

meio de cultura de células entre 20 µg/ml e 40 µg/ml.

[00695] Em algumas modalidades, além de um ou mais agonistas de TNFRSF, o meio de cultura de células compreende ainda IL-2 em uma concentração inicial de cerca de 3000 UI/ml e anticorpo OKT-3 em uma concentração inicial de cerca de 30 ng/ml, e em que o um ou mais agonistas de TNFRSF compreendem um agonista de 4-1BB.

[00696] 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 incluídos durante a segunda expansão, incluindo, por exemplo, durante um processo da Etapa D de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), 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 os processos da Etapa D de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) e conforme descrito no presente documento.

[00697] Em algumas modalidades, a segunda expansão pode ser conduzida em um meio de cultura de células suplementado compreendendo IL-2, OKT-3, células alimentadoras de apresentação de antígeno e, opcionalmente, um agonista de TNFRSF. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura de células suplementado. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células suplementado compreende IL-2, OKT-3 e células alimentadoras de apresentação de antígeno. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs; também referidas como células alimentadoras de apresentação de antígeno). Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura

de células compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras de apresentação de antígeno (isto é, células de apresentação de antígeno).

[00698] Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de 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 segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 500 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 400 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 300 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 200 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-15. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15.

[00699] Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21, cerca de 15 UI/ml de IL-21, cerca de 12 UI/ml de IL-21, cerca de 10 UI/ml de IL-21, cerca de 5 UI/ml de IL-21, cerca de 4 UI/ml de IL-21, cerca de 3 UI/ml de IL-21, cerca de 2 UI/ml de IL-21, cerca de 1 UI/ml de IL-21 ou cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 15 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 12 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o

segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 10 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 5 UI/ml de IL-21 a cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 2 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-21. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21.

[00700] Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno (APCs) são PBMCs. Em uma modalidade, a razão entre TILs e PBMCs e/ou células apresentadoras de antígeno na expansão rápida e/ou na segunda expansão é de cerca de 1 a 10, cerca de 1 a 15, cerca de 1 a 20, cerca de 1 a 25, cerca de 1 a 30, cerca de 1 a 35, cerca de 1 a 40, cerca de 1 a 45, cerca de 1 a 50, cerca de 1 a 75, cerca de 1 a 100, cerca de 1 a 125, cerca de 1 a 150, cerca de 1 a 175, cerca de 1 a 200, cerca de 1 a 225, cerca de 1 a 250, cerca de 1 a 275, cerca de 1 a 300, cerca de 1 a 325, cerca de 1 a 350, cerca de 1 a 375, cerca de 1 a 400 ou cerca de 1 a 500. Em uma modalidade, a razão entre TILs e PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 e 50 e de 1 a 300. Em uma modalidade, a razão entre TILs e PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 e 100 e de 1 a 200.

[00701] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão rápida é realizada em frascos com os TILs em massa sendo misturados com um excesso de 100 ou 200 vezes de células alimentadoras inativadas, em que a concentração de células alimentadoras é de pelo menos 1,1 vezes (1,1X), 1,2X, 1,3X, 1,4X, 1,5X, 1,6X, 1,7X, 1,8X, 1,8X, 2X, 2,1X, 2,2X, 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 da célula de alimentação na primeira expansão de iniciação, 30 ng/ml OKT3 anticorpo anti-CD3 e 6000 UI/ml de IL-2 em 150 ml de meio. A substituição de meio é feita (geralmente 2/3 de substituição de meio por meio de aspiração de 2/3 de meio gasto e substituição com um volume igual de meio fresco) até que as células sejam transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. Câmaras de crescimento alternativas incluem frascos G-REX e recipientes permeáveis a gás, conforme discutido mais detalhadamente abaixo.

[00702] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida (que pode incluir processos referidos como o processo REP) é de 7 a 9 dias, conforme 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.

[00703] Em uma modalidade, a segunda expansão (que pode incluir expansões referidas como REP, bem como aquelas referidas na Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) pode ser realizada com capacidade de 500 ml de frascos permeáveis a gás com fundo de silício de 100 cm permeável a gás (G-Rex 100, comercialmente disponível junto à Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EUA), 5×10^6 ou 10×10^6 TIL podem ser cultivados com PBMCs em 400 ml de meio 50/50, suplementado com 5% de soro AB humano, 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 de CO_2 a 5%. No dia 5, 250 ml de sobrenadante podem ser removidos e colocados em garrafas de centrífuga e centrifugados a 1500 rpm (491 × g) por 10 minutos. Os péletes TIL podem ser ressuspensos com 150 ml de meio fresco com 5% de soro AB humano, 6000 UI por ml de IL-2 e adicionados de volta aos frascos GREX-100 originais. Quando os TILs são expandidos em série em frascos GREX-100, no dia 10 ou 11 os TILs podem ser movidos para um frasco maior, como um

GREX-500. As células podem ser colhidas no dia 14 de cultura. As células podem ser colhidas no dia 15 de cultura. As células podem ser colhidas no dia 16 de cultura. Em algumas modalidades, a substituição do meio é feita até que as células sejam transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. Em algumas modalidades, 2/3 do meio são substituídos por aspiração de meio gasto e substituição por um volume igual de meio novo. Em algumas modalidades, as câmaras de crescimento alternativas incluem frascos GREX e recipientes permeáveis a gás, conforme discutido mais detalhadamente abaixo.

[00704] Em algumas modalidades, o meio de cultura usado nos processos de expansão aqui divulgados é um meio sem soro ou um meio definido. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é usado para prevenir e/ou diminuir a variação experimental devido em parte à variação lote a lote de meios contendo soro.

[00705] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou reposição de soro. Em algumas modalidades, o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[00706] Em algumas modalidades, o suplemento de soro ou substituição de soro inclui, porém sem limitação, um ou mais de suplemento

sérico de expansão de células T CTS™ OpTmizer, substituição de soro celular imune CTS™, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

[00707] Em algumas modalidades, a substituição de soro celular imune de células T CTS™OpTmizer™ é usada com meios de crescimento convencionais, incluindo, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[00708] Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro (% em volume) no meio sem soro ou no meio definido é de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio definido ou livre de soro total.

Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 3% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 5% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 10% do volume total do meio sem soro ou definido.

[00709] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific). Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e a concentração final de 2-mercaptoetanol nos meios é 55 μM.

[00710] Em algumas modalidades, o meio definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™

OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a

cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e a concentração final de 2-mercaptoetanol nos meios é 55 μM.

[00711] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM, ou 4 mM a cerca de 5 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

[00712] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca

de 70 mM, ou cerca de 65 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

[00713] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos na Publicação PCT Internacional nº WO/1998/030679, que é incorporada no presente documento a título de referência, são úteis na presente invenção. Nessa publicação, são descritos meios de cultura de células eucarióticas sem soro. O meio de cultura de células eucarióticas sem soro inclui um meio de cultura de células basais suplementado com um suplemento sem soro capaz de suportar o crescimento de células em cultura sem soro. O suplemento de meio de cultura de células eucarióticas sem soro compreende ou é obtido pela combinação de um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais elementos traço e um ou mais antibióticos. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou beta-mercaptoetanol. Em algumas modalidades, o meio definido compreende uma albumina ou um substituto da albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, um ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina

e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio de células basais é selecionado a partir do grupo que consiste no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), no meio mínimo essencial (MEM), no meio basal de Eagle (BME), em RPMI 1640, em F-10, em F-12, no meio mínimo essencial (αMEM), no meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), no meio de crescimento RPMI e no meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[00714] Em algumas modalidades, a concentração de glicina no meio definido está na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-histidina é de cerca de 5 a 250 mg/l, a concentração de L-isoleucina é de cerca de 5 a 300 mg/l, a concentração de L-metionina é de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-fenilalanina é de cerca de 5 a 400 mg/l, a concentração de L-prolina é de cerca de 1 a 1000 mg/l, a concentração de L-hidroxiprolina é de cerca de 1 a 45 mg/l, a concentração de L-serina é de cerca de 1 a 250 mg/l, a concentração de L-treonina é de cerca de 10 a 500 mg/l, a concentração de L-triptofano é de cerca de 2 a 110 mg/l, a concentração de L-tirosina é de cerca de 3 a 175 mg/l, a concentração de L-valina é de cerca de 5 a 500 mg/l, a concentração de tiamina é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de glutationa reduzida é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de ácido L-ascórbico-2-fosfato é de cerca de 1 a 200 mg/l, a concentração de transferrina saturada de ferro é de cerca de 1 a 50 mg/l, a concentração de insulina é de cerca 1 a 100 mg/l, a concentração de selenita de sódio é de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e a concentração de albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) é de cerca de 5000 a 50000 mg/l.

[00715] Em algumas modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração em 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, os ingredientes da porção

química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas concentrações finais listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial de 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, o meio definido é um meio de células basais que compreende um suplemento sem soro. Em algumas dessas modalidades, o suplemento sem soro compreende ingredientes da porção química não-traço do tipo e nas concentrações listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial no suplemento" na Tabela A abaixo.

TABELA A: CONCENTRAÇÕES DE INGREDIENTES DE PORÇÃO QUÍMICA DE ELEMENTO NÃO-TRAÇO

Ingrediente	Uma modalidade preferencial em suplemento (mg/l) (Cerca de)	Faixa de concentração em 1X meio (mg/l) (Cerca de)	Uma modalidade preferencial em 1X meio (mg/l) (Cerca de)
Glicina	150	5200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-fenilalanina	1800	5-400	336
L-Prolina	4000	1-1000	600
L-hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-treonina	2200	10-500	425
L-triptofano	440	2-110	82
L-tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutationa Reduzida	10	1-20	1,5
Ácido ascórbico-2-PO_4 (sal de Mg)	330	1-200	50
Transferrina (ferro saturado)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenita de Sódio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83000	5000-50000	12500

[00716] Em algumas modalidades, a osmolaridade do meio definido está entre cerca de 260 e 350 mOsmol. Em algumas modalidades, a osmolaridade está entre cerca de 280 e 310 mOsmol. Em algumas modalidades, o meio definido é suplementado com até cerca de 3,7 g/l, ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio. O meio definido pode ser suplementado com L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM), 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca

de 100 μM).

[00717] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos em Smith, *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement", *Clin Transl Immunology*, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) são úteis na presente invenção. Resumidamente, RPMI ou CTS™ OpTmizer™ foi usado como o meio de células basais e suplementado com substituição de soro celular imune CTS™ a 0, 2%, 5% ou 10%.

[00718] Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou segundo recipiente permeável a gás 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 permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

[00719] Em uma modalidade, a segunda expansão rápida (incluindo expansões referidas como REP) é realizada e compreende ainda uma etapa em que os TILs são selecionados para reatividade tumoral superior. Qualquer método de seleção conhecido na técnica pode ser usado. Por exemplo, os métodos descritos na Publicação do Pedido de Patente US nº 2016/0010058 A1, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência, podem ser usados para a seleção de TILs para reatividade tumoral superior.

[00720] Opcionalmente, um ensaio de viabilidade celular pode ser realizado após a segunda expansão rápida (incluindo expansões referidas como a expansão REP), usando ensaios padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, um ensaio de exclusão de azul de tripano pode ser feito em uma amostra dos TILs em massa, que rotula seletivamente as células mortas e permite uma avaliação de viabilidade. Em algumas modalidades, as amostras TIL podem ser contadas e a viabilidade determinada usando um contador de

células automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Em algumas modalidades, a viabilidade é determinada de acordo com o protocolo padrão Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter.

[00721] Os diversos receptores de antígenos dos linfócitos T e B são produzidos pela recombinação somática de um número limitado, mas um grande número de segmentos gênicos. Esses segmentos gênicos: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e as aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de células T (TCRs). A presente invenção fornece 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 na diversidade é um aumento na diversidade da imunoglobulina e/ou na diversidade do receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está na imunoglobulina, está na cadeia pesada de imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está na imunoglobulina, está na cadeia leve da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está no receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está em um dos receptores de células T selecionados do grupo que consiste em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do 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 segundo meio de cultura de expansão rápida (por exemplo, às vezes referido como CM2 ou o segundo

meio de cultura de células) compreende IL-2, OKT-3, bem como as células alimentadoras de apresentação de antígeno (APCs), como discutido em mais detalhes abaixo. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão rápida (por exemplo, às vezes referido como CM2 ou o segundo meio de cultura de células) compreende 6000 UI/ml de IL-2, 30 ug/frasco OKT-3, bem como 7,5 × 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígenos (APCs), como discutido em mais detalhes abaixo. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão rápida (por exemplo, às vezes referido como CM2 ou o segundo meio de cultura de células) compreende IL-2, OKT-3, bem como as células alimentadoras de apresentação de antígeno (APCs), como discutido em mais detalhes abaixo. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão rápida (por exemplo, às vezes referido como CM2 ou o segundo meio de cultura de células) compreende 6000 UI/ml de IL-2, 30 ug/frasco OKT-3, bem como 5 × 10^8 células alimentadoras apresentadoras de antígenos (APCs), como discutido em mais detalhes abaixo.

[00723] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida, por exemplo, Etapa D de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. 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 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.

1. CÉLULAS ALIMENTADORAS E CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

[00724] Em uma modalidade, os procedimentos de segunda expansão

rápida descritos neste documento (por exemplo, incluindo expansão, tal como aqueles descritos na Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, da Figura 1B e/ou da Figura 1C), bem como aqueles referidos como REP) exigem um excesso de células alimentadoras durante a expansão REP TIL e/ou durante a segunda expansão rápida. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de unidades de sangue total padrão de doadores de sangue saudáveis. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão, como separação por gradiente Ficoll-Paque.

[00725] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos REP, conforme descrito nos exemplos, que fornece um protocolo exemplificativa para avaliar a incompetência de replicação de PBMCs alogênicas irradiadas.

[00726] Em algumas modalidades, PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis no dia 7 ou 14 for menor que 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).

[00727] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14 não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocado em cultura no dia 0 do REP e/ou no 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 ng/ml de anticorpo OKT3 e 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são

cultivadas na presença de 60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 ng/ml de anticorpo OKT3 e 6000 UI/ml de IL-2.

[00728] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitáveis para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14 não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocado em cultura no dia 0 do REP e/ou no 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 a 60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 1000 a 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 a 60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2000 a 5000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 a 60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2000 a 4000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 a 60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2500 a 3500 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 a 60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 6000 UI/ml de IL-2.

[00729] Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno são PBMCs. Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno são células alimentadoras artificiais de apresentação de antígeno. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é cerca de 1 a 10, cerca de 1 a 25, cerca de 1 a 50, cerca de 1 a 100, cerca de 1 a 125, cerca de 1 a 150, cerca de 1 a 175, cerca de 1 a 200, cerca de 1 a 225, cerca de 1 a 250, cerca de 1 a 275, cerca de 1 a 300, cerca de 1 a 325, cerca de 1 a 350, cerca de 1 a 375, cerca de 1 a 400 ou cerca de 1 a 500. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de

antígeno na segunda expansão está entre 1 e 50 e de 1 a 300. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão está entre 1 e 100 e de 1 a 200.

[00730] Em uma modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem uma razão de cerca de 5×10^8 células alimentadoras para cerca de 100×10^6 TILs. Em uma modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem uma razão de cerca de $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras para cerca de 100×10^6 TILs. Em outra modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem uma razão de cerca de 5×10^8 células alimentadoras para cerca de 50×10^6 TILs. Em outra modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem uma razão de cerca de $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras para cerca de 50×10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem cerca de 5×10^8 células alimentadoras a cerca de 25×10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem cerca de $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras a cerca de 25×10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, a segunda expansão rápida exige duas vezes o número de células alimentadoras que a segunda expansão rápida. Em ainda outra modalidade, quando a primeira expansão de iniciação aqui descrita exige cerca de $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras, a segunda expansão rápida exige cerca de 5×10^8 células alimentadoras. Em ainda outra modalidade, quando a primeira expansão de iniciação aqui descrita exige cerca de $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras, a segunda expansão rápida exige cerca de $7,5 \times 10^8$ células alimentadoras. Em ainda outra modalidade, a segunda expansão rápida exige duas vezes (2,0X), 2,5X, 3,0X, 3,5X ou 4,0X o número de células alimentadoras como a primeira expansão de iniciação.

[00731] Em uma modalidade, os procedimentos de segunda expansão rápida aqui descritos exigem um excesso de células alimentadoras durante a

segunda expansão rápida. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de unidades de sangue total padrão de doadores de sangue saudáveis alogênicos. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão, como separação por gradiente Ficoll-Paque. Em uma modalidade, células apresentadoras de antígeno artificial (aAPC) são usadas 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 iniciação.

[00732] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos, incluindo os procedimentos exemplificativos descritos nas figuras e exemplos.

[00733] Em uma modalidade, as células de apresentação de antígeno artificial são usadas na segunda expansão rápida como uma substituição para, ou em combinação com, PBMCs.

2. CITOCINAS

[00734] Os segundos métodos de expansão rápida aqui descritos geralmente usam meios de cultura com altas doses de uma 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 adicionalmente possível, com combinações de duas ou mais de IL-2, IL-15 e IL-21, como é geralmente descrito em nos documentos WO 2015/189356 e WO 2015/189357, por meio do presente documento expressamente incorporado a título de referência em sua totalidade. Assim, as combinações possíveis incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21, e IL-2, IL-15 e IL-21, com a última encontrando uso particular em muitas modalidades. A utilização de combinações de citocinas favorece especificamente a geração de linfócitos e, em particular, de células

T, conforme descrito no presente documento.

E. ETAPA E: COLHER TILS

[00736] Após a segunda etapa de expansão rápida, as células podem ser colhidas. Em algumas modalidades, os TILs são colhidos após uma, duas, três, quatro ou mais etapas de expansão, por exemplo, conforme fornecido na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, os TILs são colhidos após duas etapas de expansão, por exemplo, conforme fornecido na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, os TILs são colhidos após duas etapas de expansão, uma primeira expansão de iniciação e uma segunda expansão rápida, por exemplo, conforme fornecido na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C).

[00737] Os TILs podem ser colhidos de qualquer maneira apropriada e estéril, incluindo, por exemplo, por centrifugação. Os métodos para a colheita de TIL são bem conhecidos na técnica e quaisquer desses métodos conhecidos podem ser empregados com o presente processo. Em algumas modalidades, os TILS são colhidos usando um sistema automatizado.

[00738] Coletores de células e/ou sistemas de processamento de células estão comercialmente disponíveis a partir de uma variedade de fontes, incluindo, por exemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer e Inotech Biosystems International, Inc. Qualquer coletor baseado em células 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 colheita de células é feita por meio de um sistema de processamento de células, como o sistema LOVO (fabricado pela Fresenius Kabi). O termo "sistema de processamento de células LOVO" também se refere a qualquer instrumento ou dispositivo fabricado por qualquer fornecedor que pode bombear uma solução compreendendo células através de uma membrana ou filtro, como

uma membrana giratória ou filtro giratório em um ambiente de sistema estéril e/ou fechado, permitindo fluxo contínuo e processamento de células para remover o sobrenadante ou meio de cultura de células sem peletização. Em algumas modalidades, o coletor de células e/ou sistema de processamento de células pode realizar separação de células, lavagem, troca de fluidos, concentração e/ou outras etapas de processamento de células em um sistema estéril fechado.

[00739] Em algumas modalidades, a segunda expansão rápida, por exemplo, Etapa D de acordo com a Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. 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 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 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C) é realizada de acordo com os processos aqui descritos. Em algumas modalidades, o sistema fechado é acessado por meio de seringas em condições estéreis, a fim de manter a esterilidade e a natureza fechada do sistema. Em algumas modalidades, um sistema fechado, conforme descrito neste documento, é empregado.

[00741] Em algumas modalidades, os TILs são colhidos de acordo com os métodos descritos neste documento. Em algumas modalidades, os TILs entre os dias 14 e 16 são colhidos usando os métodos descritos neste documento. Em algumas modalidades, os TILs são colhidos em 14 dias usando os métodos descritos neste documento. Em algumas modalidades, os

TILs são colhidos em 15 dias usando os métodos descritos neste documento. Em algumas modalidades, os TILs são colhidos em 16 dias usando os métodos descritos neste documento.

F. ETAPA F: FORMULAÇÃO FINAL/TRANSFERÊNCIA PARA BOLSA DE INFUSÃO

[00742] Após as etapas de A a E, conforme fornecido em uma ordem exemplificativa na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) e conforme descrito em detalhes acima e aqui estão completos, as células são transferidas para um recipiente para uso na administração para um paciente. Em algumas modalidades, uma vez que um número terapeuticamente suficiente de TILs é obtido usando os métodos de expansão descritos acima, eles são transferidos para um recipiente para uso na administração a um paciente.

[00743] Em uma modalidade, os TILs expandidos usando os métodos da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. Os TILs expandidos conforme divulgado neste documento podem ser administrados por qualquer via adequada, conforme conhecido na técnica. Em algumas modalidades, os TILs são administrados como uma única infusão intra-arterial ou intravenosa, que preferencialmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias de administração adequadas incluem intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

G. RAZÕES DE CÉLULAS ALIMENTADORAS DE PBMC

[00744] Em algumas modalidades, os meios de cultura usados nos métodos de expansão descritos neste documento (consultar, por exemplo, a Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C) incluem um anticorpo anti-CD3, por exemplo, OKT-3. Um anticorpo anti-CD3 em combinação com IL-2 induz ativação de células T e divisão celular na população de TIL. Este efeito pode ser observado com anticorpos de

comprimento total, bem como fragmentos Fab e F(ab')2, sendo o primeiro geralmente preferencial; consultar, por exemplo, Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, incorporado no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00745] Em uma modalidade, o número de camadas de alimentação de PBMC é calculado da seguinte forma:

[00746] A. Volume de uma célula T (10 μm de diâmetro): $V = (4/3)\ \pi r^3 = 523{,}6\ \mu m^3$

[00747] B. Coluna de G-Rex 100 (M) com uma altura de 40 μm (4 células): $V = (4/3)\ \pi r^3 = 4 \times 10^{12}\ \mu m^3$

[00748] C. Número da célula necessária para preencher a coluna B: $4 \times 10^{12}\ \mu m^3 / 523{,}6\ \mu m^3 = 7{,}6 \times 10^8\ \mu m^3 * 0{,}64 = 4{,}86 \times 10^8$

[00749] D. Número de células que podem ser ativadas de modo ideal no espaço 4D: $4{,}86 \times 10^8/24 = 20{,}25 \times 10^6$

[00750] E. Número de alimentadoras e TIL extrapolado para G-Rex 500: TIL: 100×10^6 e Alimentadora: $2{,}5 \times 10^9$

[00751] Nesse cálculo, uma aproximação do número de células mononucleares necessárias para fornecer uma geometria icosaédrica para ativação de TIL em um cilindro com uma base de 100 cm^2 é usada. O cálculo deriva o resultado experimental de aproximadamente 5×10^8 para ativação de limiar de células T que espelha de perto os dados experimentais do NCI.[(1)] (C) O multiplicador (0,64) é a densidade de empacotamento aleatório para esferas equivalentes conforme 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 no espaço quadridimensional "o número de Newton". [(3)].

[00752] [(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. Abril de 2012; 35 (3):

283 a 292.

[00753] (2) Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 20 de março de 1992; 255 (5051):1523-31.

[00754] (3) O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794 a 795.

[00755] Em uma modalidade, o número de células alimentadoras de apresentação de antígeno fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de iniciação é aproximadamente metade do número de células alimentadoras de apresentação de antígeno fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida. Em certas modalidades, o método compreende realizar a primeira expansão de iniciação em um meio de cultura de células que compreende aproximadamente 50% menos células de apresentação de antígeno em comparação com o meio de cultura de células da segunda expansão rápida.

[00756] Em outra modalidade, o número de células alimentadoras de apresentação de antígeno (APCs) fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é maior que o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de iniciação.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 20:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 10:1.

[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 iniciação está em

uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 9:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 8:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 7:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 6:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 5:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 4:1.

[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 iniciação) está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 3:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,9:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,8:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,7:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,6:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,5:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,4:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,3:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,2:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,1:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 10:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 5:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 4:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 3:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,9:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,8:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,7:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,6:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,5:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,4:1.

[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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,3:1.

[00787] 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 iniciação está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,2:1.

[00788] 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 iniciação está em

uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,1:1.

[00789] 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 iniciação é de ou cerca de 2:1.

[00790] 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 iniciação é de ou cerca de 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.

[00791] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de iniciação é em ou cerca de 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, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é de ou cerca de 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.

[00792] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas

exogenamente durante a primeira expansão de iniciação está na faixa de ou cerca de $1,5 \times 10^8$ APCs a ou cerca de 3×10^8 APCs, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de 4×10^8 APCs a ou cerca de $7,5 \times 10^8$ APCs.

[00793] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de iniciação está na faixa de ou cerca de 2×10^8 APCs a ou cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de $4,5 \times 10^8$ APCs a ou cerca de $5,5 \times 10^8$ APCs.

[00794] Em outra modalidade, o número de APCs fornecidas exogenamente durante a primeira expansão de iniciação é de ou cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs, e o número de APCs fornecidas exogenamente durante a segunda expansão rápida é de ou cerca de 5×10^8 APCs.

[00795] Em uma modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) adicionados no dia 0 da primeira expansão de iniciação é aproximadamente metade do número de PBMCs adicionados no dia 7 da primeira expansão de iniciação (por exemplo, dia 7 de o método). Em certas modalidades, o método compreende adicionar células de apresentação de antígeno no dia 0 da primeira expansão de iniciação à primeira população de TILs e adicionar células de apresentação de antígeno no dia 7 à segunda população de TILs, em que o número de células de apresentação de antígeno adicionado no dia 0 é aproximadamente 50% do número de células apresentadoras de antígeno adicionadas no dia 7 da primeira expansão de iniciação (por exemplo, dia 7 do método).

[00796] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é maior do que o número de PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação.

[00797] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na

primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $1,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00798] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $1,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00799] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de 2×10^6 APCs/cm^2 a ou cerca de 3×10^6 APCs/cm^2.

[00800] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade de ou cerca de 2×10^6 APCs/cm^2.

[00801] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade de ou cerca de $1,0 \times 10^6$, $1,1 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$, $1,3 \times 10^6$, $1,4 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $1,6 \times 10^6$, $1,7 \times 10^6$, $1,8 \times 10^6$, $1,9 \times 10^6$, 2×10^6, $2,1 \times 10^6$, $2,2 \times 10^6$, $2,3 \times 10^6$, $2,4 \times 10^6$, $2,5 \times 10^6$, $2,6 \times 10^6$, $2,7 \times 10^6$, $2,8 \times 10^6$, $2,9 \times 10^6$, 3×10^6, $3,1 \times 10^6$, $3,2 \times 10^6$, $3,3 \times 10^6$, $3,4 \times 10^6$, $3,5 \times 10^6$, $3,6 \times 10^6$, $3,7 \times 10^6$, $3,8 \times 10^6$, $3,9 \times 10^6$, 4×10^6, $4,1 \times 10^6$, $4,2 \times 10^6$, $4,3 \times 10^6$, $4,4 \times 10^6$ ou $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00802] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $2,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00803] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $6,0 \times 10^6$

APCs/cm^2.

[00804] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de 4,0 × 10^6 APCs/cm^2 a cerca de 5,5 × 10^6 APCs/cm^2.

[00805] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de 4,0 × 10^6 APCs/cm^2.

[00806] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade de ou cerca de 2,5 × 10^6 APCs/cm^2, 2,6 × 10^6 APCs/cm^2, 2,7 × 10^6 APCs/cm^2, 2,8 × 10^6, 2,9 × 10^6, 3 × 10^6, 3,1 × 10^6, 3,2 × 10^6, 3,3 × 10^6, 3,4 × 10^6, 3,5 × 10^6, 3,6 × 10^6, 3,7 × 10^6, 3,8 × 10^6, 3,9 × 10^6, 4 × 10^6, 4,1 × 10^6, 4,2 × 10^6, 4,3 × 10^6, 4,4 × 10^6, 4,5 × 10^6, 4,6 × 10^6, 4,7 × 10^6, 4,8 × 10^6, 4,9 × 10^6, 5 × 10^6, 5,1 × 10^6, 5,2 × 10^6, 5,3 × 10^6, 5,4 × 10^6, 5,5 × 10^6, 5,6 × 10^6, 5,7 × 10^6, 5,8 × 10^6, 5,9 × 10^6, 6 × 10^6, 6,1 × 10^6, 6,2 × 10^6, 6,3 × 10^6, 6,4 × 10^6, 6,5 × 10^6, 6,6 × 10^6, 6,7 × 10^6, 6,8 × 10^6, 6,9 × 10^6, 7 × 10^6, 7,1 × 10^6, 7,2 × 10^6, 7,3 × 10^6, 7,4 × 10^6 ou 7,5 × 10^6 APCs/cm^2.

[00807] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade de ou cerca de 1,0 × 10^6, 1,1 × 10^6, 1,2 × 10^6, 1,3 × 10^6, 1,4 × 10^6, 1,5 × 10^6, 1,6 × 10^6, 1,7 × 10^6, 1,8 × 10^6, 1,9 × 10^6, 2 × 10^6, 2,1 × 10^6, 2,2 × 10^6, 2,3 × 10^6, 2,4 × 10^6, 2,5 × 10^6, 2,6 × 10^6, 2,7 × 10^6, 2,8 × 10^6, 2,9 × 10^6, 3 × 10^6, 3,1 × 10^6, 3,2 × 10^6, 3,3 × 10^6, 3,4 × 10^6, 3,5 × 10^6, 3,6 × 10^6, 3,7 × 10^6, 3,8 × 10^6, 3,9 × 10^6, 4 × 10^6, 4,1 × 10^6, 4,2 × 10^6, 4,3 × 10^6, 4,4 × 10^6 ou 4,5 × 10^6 APCs/cm^2 e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade de ou cerca de 2,5 × 10^6 APCs/cm^2, 2,6 × 10^6 APCs/cm^2, 2,7 × 10^6 APCs/cm^2, 2,8 × 10^6, 2,9 × 10^6, 3 × 10^6, 3,1 × 10^6, 3,2 × 10^6, 3,3 × 10^6, 3,4 × 10^6, 3,5 × 10^6, 3,6 × 10^6, 3,7

$\times 10^6$, $3,8 \times 10^6$, $3,9 \times 10^6$, 4×10^6, $4,1 \times 10^6$, $4,2 \times 10^6$, $4,3 \times 10^6$, $4,4 \times 10^6$, $4,5 \times 10^6$, $4,6 \times 10^6$, $4,7 \times 10^6$, $4,8 \times 10^6$, $4,9 \times 10^6$, 5×10^6, $5,1 \times 10^6$, $5,2 \times 10^6$, $5,3 \times 10^6$, $5,4 \times 10^6$, $5,5 \times 10^6$, $5,6 \times 10^6$, $5,7 \times 10^6$, $5,8 \times 10^6$, $5,9 \times 10^6$, 6×10^6, $6,1 \times 10^6$, $6,2 \times 10^6$, $6,3 \times 10^6$, $6,4 \times 10^6$, $6,5 \times 10^6$, $6,6 \times 10^6$, $6,7 \times 10^6$, $6,8 \times 10^6$, $6,9 \times 10^6$, 7×10^6, $7,1 \times 10^6$, $7,2 \times 10^6$, $7,3 \times 10^6$, $7,4 \times 10^6$ ou $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00808] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $1,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $2,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00809] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $1,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de 6×10^6 APCs/cm^2.

[00810] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de 2×10^6 APCs/cm^2 a ou cerca de 3×10^6 APCs/cm^2, e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura a uma densidade em uma faixa de ou cerca de 4×10^6 APCs/cm^2 a ou cerca de $5,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00811] Em outra modalidade, as APCs fornecidas exogenamente na primeira expansão de iniciação são semeadas no frasco de cultura a uma densidade de ou cerca de 2×10^6 APCs/cm^2 e as APCs fornecidas exogenamente na segunda expansão rápida são semeadas no frasco de cultura em uma densidade de ou cerca de 4×10^6 APCs/cm^2.

[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 PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação está em uma faixa de em ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 20:1.

[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 PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação está em uma faixa de em ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 10:1.

[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 PBMCs fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação está em uma faixa de em ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 9:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 8:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 7:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em

uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 6:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 5:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 4:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 3:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,9:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,8:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,7:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,6:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,5:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,4:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,3:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,2:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,1:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 10:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 5:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 4:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 3:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,9:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,8:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,7:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,6:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,5:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,4:1.

[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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,3:1.

[00842] 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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,2:1.

[00843] 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 iniciação a primeira expansão está em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,1:1.

[00844] 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 iniciação a primeira expansão é em ou cerca de 2:1.

[00845] 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 iniciação a primeira expansão é em ou cerca de 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.

[00846] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por

exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação é ou cerca de 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 (incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida está em ou cerca de $3,5 \times 10^8$, $3,6 \times 10^8$, $3,7 \times 10^8$, $3,8 \times 10^8$, $3,9 \times 10^8$, 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 (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00847] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação está na faixa de ou cerca de 1×10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a ou cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a ou cerca de 1×10^9 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00848] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação está na faixa de ou cerca de $1,5 \times 10^8$ APCs a ou cerca de 3×10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por

exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de 4×10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a ou cerca de $7,5 \times 10^8$ APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00849] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação está na faixa de ou cerca de 2×10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a ou cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs), e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de $4,5 \times 10^8$ APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) a ou cerca de $5,5 \times 10^8$ APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00850] Em outra modalidade, o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação é em ou cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o número de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é ou cerca de 5×10^8 APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs).

[00851] Em uma modalidade, o número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) adicionadas no dia 0 da primeira expansão de iniciação é aproximadamente 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 de apresentação de antígeno no dia 0 da primeira expansão de iniciação à primeira população de TILs e adicionar camadas de células de apresentação de antígeno no dia 7 à segunda população de TILs, em que o número de camadas de células de apresentação de antígeno adicionado no dia 0 é aproximadamente 50% do número de camadas de células de apresentação de antígeno adicionadas no dia 7.

[00852] Em outra modalidade, o número de camadas de APCs

(incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 7 da segunda expansão rápida é maior do que o número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) fornecidas exogenamente no dia 0 da primeira expansão de iniciação.

[00853] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 2 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 4 camadas de células.

[00854] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de uma camada de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 3 camadas de células.

[00855] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 1,5 camada de células a ou cerca de 2,5 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 3 camadas de células.

[00856] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de uma camada de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 2 camadas de células.

[00857] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de

iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca 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 dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca 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.

[00858] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 1 camada de células a ou cerca de 2 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 3 camadas de células a ou cerca de 10 camadas de células.

[00859] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 2 camadas de células a ou cerca de 3 camadas de células e dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 4 camadas de células a ou cerca de 8 camadas de células.

[00860] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 2 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 4 camadas de células a ou cerca de 8 camadas de células.

[00861] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 1, 2 ou 3 camadas de células e o dia 7 da segunda expansão rápida ocorre na presença de APCs em camadas (incluindo, por exemplo, PBMCs) com uma espessura média de ou cerca de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[00862] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:10.

[00863] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:8.

[00864] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:7.

[00865] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:6.

[00866] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:5.

[00867] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:4.

[00868] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:3.

[00869] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:2.

[00870] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de

iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,2 a ou cerca de 1:8.

[00871] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,3 a ou cerca de 1:7.

[00872] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,4 a ou cerca de 1:6.

[00873] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,5 a ou cerca de 1:5.

[00874] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,6 a ou cerca de 1:4.

[00875] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo,

PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,7 a ou cerca de 1:3,5.

[00876] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,8 a ou cerca de 1:3.

[00877] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) está na faixa de ou cerca de 1:1,9 a ou cerca de 1:2,5.

[00878] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo,

PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é igual ou cerca de 1:2.

[00879] Em outra modalidade, o dia 0 da primeira expansão de iniciação ocorre na presença de APCs 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 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 entre o primeiro número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) e o segundo número de camadas de APCs (incluindo, por exemplo, PBMCs) é igual a ou cerca de 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.

[00880] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação está na faixa de cerca de $1,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e o número de APCs na segunda expansão rápida está em a faixa de cerca de $2,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00881] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação está na faixa de cerca de $1,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e o número de APCs na segunda expansão rápida está em a faixa de cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $6,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[00882] Em algumas modalidades, o número de APCs na primeira expansão de iniciação está na faixa de cerca de $2,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de

3,0 × 10^6 APCs/cm^2, e o número de APCs na segunda expansão rápida está em a faixa de cerca de 4,0 × 10^6 APCs/cm^2 a cerca de 5,5 × 10^6 APCs/cm^2.

H. COMPONENTES OPCIONAIS DO MEIO CELULAR

1. ANTICORPOS ANTI-CD3

[00883] Em algumas modalidades, os meios de cultura usados em métodos de expansão aqui descritos (consultar, por exemplo, a Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C) incluem um anticorpo anti-CD3. Um anticorpo anti-CD3 em combinação com IL-2 induz ativação de células T e divisão celular na população de TIL. Este efeito pode ser observado com anticorpos de comprimento total, bem como fragmentos Fab e F(ab')2, sendo o primeiro geralmente preferencial; consultar, por exemplo, Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, incorporado no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00884] Como será apreciado por aqueles na técnica, há uma série de anticorpos CD3 anti-humanos adequados que encontram uso na invenção, incluindo anticorpos policlonais e monoclonais de CD3 anti-humanos de vários mamíferos, incluindo, porém sem limitação, murino, anticorpos humanos, primatas, ratos e caninos. Em modalidades particulares, o anticorpo anti-CD3 OKT3 é usado (comercialmente disponível junto à Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

TABELA 5: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE MUROMONAB (ANTICORPO OKT-3 EXEMPLIFICATIVO)

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 1 Cadeia pesada de Muromonab	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

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 2 Cadeia leve de Muromonab	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 4-1BB (CD137)

[00885] Em uma modalidade, o meio de cultura de células da primeira expansão de iniciação e/ou da segunda expansão rápida compreende um agonista de TNFRSF. Em uma modalidade, o agonista de TNFRSF é um agonista 4-1BB (CD137). O agonista 4-1BB pode ser qualquer molécula de ligação 4-1BB conhecida na técnica. A molécula de ligação 4-1BB pode ser um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão capaz de se ligar ao 4-1BB humano ou mamífero. Os agonistas 4-1BB ou moléculas de ligação 4-1BB podem compreender uma cadeia pesada de imunoglobulina de qualquer isotipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse da molécula de imunoglobulina. O agonista 4-1BB ou molécula de ligação 4-1BB pode ter uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Tal como aqui utilizado, o termo molécula de ligação também inclui anticorpos (incluindo anticorpos de comprimento total), anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos e fragmentos de anticorpos, por exemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab′), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, fragmentos de ligação a epítopo de qualquer um dos mesmos acima, e formas modificadas de anticorpos, por exemplo, moléculas de scFv, que se ligam a 4-1BB. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de ligação ao antígeno que é um anticorpo totalmente humano. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de ligação ao antígeno que é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, os

agonistas de 4-1BB para uso nos métodos e composições presentemente divulgados incluem anticorpos anti-4-1BB, anticorpos anti-4-1BB humanos, anticorpos anti-4-1BB de camundongo, anticorpos anti-4-1BB de mamíferos, anticorpos monoclonais anti-4-1BB, anticorpos policlonais anti-4-1BB, anticorpos quiméricos anti-4-1BB, adnectinas anti-4-1BB, anticorpos de domínio anti-4-1BB, fragmentos anti-4-1BB de cadeia única, fragmentos anti-4-1BB de cadeia pesada, fragmentos anti-4-1BB de cadeia leve, proteínas de fusão anti-4-1BB e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos. Os anticorpos agonísticos anti-4-1BB são conhecidos por induzirem fortes respostas imunológicas. Lee, *et al.*, *PLOS One* **2013**, *8,* e69677. Em uma modalidade preferencial, o agonista 4-1BB é um anticorpo monoclonal agonístico, anti-4-1BB humanizado ou totalmente humano (isto é, um anticorpo derivado de uma única linha 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 do mesmo. Em uma modalidade preferencial, o agonista de 4-1BB é utomilumabe ou urelumabe, ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar dos mesmos.

[00886] Em uma modalidade preferencial, o agonista 4-1BB ou molécula de ligação 4-1BB também pode ser uma proteína de fusão. Em uma modalidade preferencial, um agonista 4-1BB multimérico, tal como um agonista 4-1BB trimérico ou hexamérico (com três ou seis domínios de ligação de ligante), pode induzir agrupamento de receptor superior (4-1BBL) e formação de complexo de sinalização celular interno em comparação com um anticorpo monoclonal agonístico, que tipicamente possui dois domínios de ligação ao ligante. Proteínas triméricas (trivalentes) ou hexaméricas (ou hexavalentes) ou proteínas de fusão superiores compreendendo três domínios de ligação TNFRSF e IgG1-Fc e opcionalmente ligando adicional de duas ou mais dessas proteínas de fusão são descritas, por exemplo, em Gieffers, *et al.*,

Mol. Cancer Therapeutics **2013,** *12,* 2735-47.

[00887] Anticorpos agonísticos 4-1BB e proteínas de fusão são conhecidos por induzir fortes respostas imunológicas. Em uma modalidade preferencial, o agonista 4-1BB é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão que se liga especificamente ao antígeno 4-1BB de uma maneira suficiente para reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal 4-1BB agonístico ou proteína de fusão que anula a toxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), por exemplo, citotoxicidade de células NK. Em algumas modalidades, o agonista 4-1BB é um anticorpo monoclonal 4-1BB agonístico ou proteína de fusão que anula a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP). Em algumas modalidades, o agonista 4-1BB é um anticorpo monoclonal 4-1BB agonístico ou proteína de fusão que anula a citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Em algumas modalidades, o agonista 4-1BB é um anticorpo monoclonal 4-1BB agonístico ou proteína de fusão que anula a funcionalidade da região Fc.

[00888] Em algumas modalidades, os agonistas de 4-1BB são caracterizados pela ligação ao 4-1BB humano (SEQ ID NO: 9) com alta afinidade e atividade agonística. 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 a 4-1BB murino (SEQ ID NO: 10). As sequências de aminoácidos do antígeno 4-1BB ao qual um agonista 4-1BB ou molécula de ligação se liga estão resumidas na Tabela 6.

TABELA 6. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE ANTÍGENOS 4-1BB.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 9 4-1BB humano, superfamília do receptor 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

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 10 4-1BB murino, Superfamília de receptores de 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

[00889] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista 4-1BB que liga 4-1BB humano ou murino com um K_D de cerca de 100 pM ou inferior, liga 4-1BB humano ou murino com um K_D de cerca de 90 pM ou inferior, liga 4-1BB humano ou murino com um K_D de cerca de 80 pM ou inferior, liga 4-1BB humano ou murino com um K_D de cerca de 70 pM ou inferior, liga 4-1BB humano ou murino com K_D de cerca de 60 pM ou inferior, liga 4-1BB humano ou murino com um K_D de cerca de 50 pM ou inferior, liga 4-1BB humano ou murino com um K_D de cerca de 40 pM ou inferior, ou liga 4-1BB humano ou murino com um K_D de cerca de 30 pM ou inferior.

[00890] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista 4-1BB que se liga a 4-1BB humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, se liga a 4-1BB humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 8×10^5 1/M·s ou mais rápido, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $8,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 9×10^5 1/M·s ou mais rápido, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $9,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, ou liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 1×10^6 1/M·s ou mais rápido.

[00891] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista 4-1BB que se liga a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de 2×10^{-5} 1/s ou mais lento, se liga a 4-

1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou liga-se a 4-1BB humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de 3×10^{-5} 1/s ou mais lento.

[00892] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista 4-1BB que se liga a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 10 nM ou inferior, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 9 nM ou inferior, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 8 nM ou inferior, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 7 nM ou inferior, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 6 nM ou inferior, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 5 nM ou inferior, liga-se a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 4 nM ou inferior, se liga a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 3 nM ou inferior, se liga a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 2 nM ou inferior, ou se liga a 4-1BB humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 1 nM ou inferior.

[00893] Em uma modalidade preferencial, o agonista de 4-1BB é utomilumabe, também conhecido como PF-05082566 ou MOR-7480, ou um fragmento, derivado, variante ou biossimilar do mesmo. O utomilumabe está disponível junto à Pfizer, Inc. O utomilumabe é uma imunoglobulina G2-

lambda, anti-[TNFRSF9 *Homo sapiens* (membro da superfamília 9 de receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), 4-1BB, antígeno de célula T ILA, CD137)], anticorpo monoclonal *Homo sapiens* (totalmente humano). As sequências de aminoácidos de utomilumabe são apresentadas na Tabela 7. Utomilumabe compreende locais de glicosilação em Asn59 e Asn292; pontes dissulfureto intracadeia de cadeia pesada nas posições 22 a 96 (V_H-V_L), 143 a 199 (C_H1-C_L), 256 a 316 (C_H2) e 362 a 420 (C_H3); pontes dissulfureto intracadeia de cadeia leve nas posições 22'-87' (V_H-V_L) e 136'-195' (C_H1-C_L); pontes dissulfeto de cadeia pesada intercadeia-cadeia pesada nas posições de isoforma IgG2A 218-218, 219-219, 222-222 e 225-225, nas posições de isoforma IgG2A/B 218-130, 219-219, 222-222 e 225- 225, e nas posições da isoforma IgG2B 219-130 (2), 222-222 e 225-225; e pontes dissulfeto de cadeia pesada-cadeia leve intercadeia nas posições da isoforma IgG2A 130-213' (2), posições da isoforma IgG2A/B 218-213' e 130-213', e nas posições da isoforma IgG2B 218-213' (2). A preparação e as propriedades do utomilumabe e suas variantes e fragmentos são descritas nas Patentes n^{os} US 8.821.867; 8.337.850; e 9.468.678, e Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2012/032433 A1, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As características pré-clínicas do utomilumabe são descritas em Fisher, *et al.*, *Cancer Immunolog. & Immunother.* **2012,** *61,* 1721 a 33. Os ensaios clínicos atuais de utomilumabe em uma variedade de indicações hematológicas e de tumor sólido incluem os identificadores NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 e NCT02554812 do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos.

[00894] Em uma modalidade, um agonista 4-1BB compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 11 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 12. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas na SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos

Fab, fragmentos variáveis de cadeia única (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 compreende 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.

[00895] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de utomilumabe. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada do agonista 4-1BB (V_H) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 13, e a região variável da cadeia leve do agonista 4-1BB (V_L) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 14, e substituições conservativas 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 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 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 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 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.

[00896] Em uma modalidade, um agonista 4-1BB compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada com as sequências estabelecidas na SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 e SEQ ID NO: 17, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas, e domínios de cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 tendo as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 20, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas.

[00897] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista 4-1BB aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos com referência ao utomilumabe. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo 4-1BB que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácidos de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-tradução em comparação com o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-tradução são selecionadas a partir de um ou mais dentre: glicosilação, oxidação,

desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo de agonista 4-1BB autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista 4-1BB é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe. O anticorpo agonista 4-1BB pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, como o FDA dos EUA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumabe.

TABELA 7. SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA ANTICORPOS AGONISTAS 4-1BB RELACIONADOS AO UTOMILUMABE.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 11 cadeia pesada para 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

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 12 cadeia leve para 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 para utomilumabe	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO: 14 região variável de cadeia leve para utomilumabe	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
SEQ ID NO: 15 CDR1 da cadeia pesada para utomilumabe	STYWIS 6
SEQ ID NO: 16 CDR2 da cadeia pesada para utomilumabe	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
SEQ ID NO: 17 CDR3 da cadeia pesada para utomilumabe	RGYGIFDY 8
SEQ ID NO: 18 CDR1 de cadeia leve para utomilumabe	SGDNIGDQYA H 11
SEQ ID NO: 19 CDR2 de cadeia leve para utomilumabe	QDKNRPS 7
SEQ ID NO: 20 CDR3 de cadeia leve para utomilumabe	ATYTGFGSLA V 11

[00898] Em uma modalidade preferencial, o agonista 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. Urelumab está disponível junto à Bristol-Myers Squibb, Inc., e Creative Biolabs, Inc. Urelumab é uma imunoglobulina G4-kappa, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF9 (membro da superfamília 9 do fator de necrose tumoral, 4-1BB, antígeno de células T ILA, CD137)], anticorpo monoclonal *Homo sapiens* (totalmente humano). As sequências de aminoácidos de urelumabe são apresentadas na Tabela EE. Urelumab compreende locais de N-glicosilação nas posições 298 (e 298"); pontes dissulfeto intracadeia de 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 em posições 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'', e 368''-426''); pontes dissulfureto intracadeia 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 dissulfureto intercadeia cadeia pesada-cadeia pesada nas posições 227-227" e 230-230"; e pontes dissulfureto intercadeia de cadeia pesada-cadeia leve em 135-216' e

135"-216"'. A preparação e as propriedades do urelumabe e suas variantes e fragmentos são descritas nas Patentes nos US 7.288.638 e 8.962.804, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As características pré-clínicas e clínicas do urelumabe são descritas em Segal, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **2016,** disponível junto à http:/dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272. Os ensaios clínicos atuais de urelumabe em uma variedade de indicações hematológicas e de tumor sólido incluem os identificadores de clinicaltrials.gov do Instituto Nacional de Saúde dos EUA NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 e NCT01471210.

[00899] Em uma modalidade, um agonista 4-1BB compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 21 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 22. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas na SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 22, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variável de cadeia única (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 compreende 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.

[00900] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de urelumabe. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada do agonista 4-1BB (V_H) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 23, e a região variável da cadeia leve do agonista 4-1BB (V_L) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 24, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas. Em uma modalidade, um agonista 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 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 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 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 que 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.

[00901] Em uma modalidade, um agonista 4-1BB compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 27, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve com as sequências

estabelecidas em SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas.

[00902] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista 4-1BB aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos com referência ao urelumabe. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo 4-1BB que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácidos de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-tradução em comparação com o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é o urelumabe. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-tradução são selecionadas a partir de um ou mais dentre: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biosimilar é um anticorpo agonista 4-1BB autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista 4-1BB é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é urelumabe. O anticorpo agonista 4-1BB pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, como o FDA dos EUA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é urelumabe. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou

mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou o produto biológico de referência é o urelumabe.

TABELA 8: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA ANTICORPOS AGONISTAS 4-1BB RELACIONADOS COM URELUMABE.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 21 cadeia pesada para 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 para 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 para urelumabe	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO: 24 cadeia leve variável para urelumabe	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO: 25 CDR1 da cadeia pesada para urelumabe	GYYWS 5
SEQ ID NO: 26 CDR2 da cadeia pesada para urelumabe	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO: 27 CDR3 da cadeia pesada para urelumabe	DYGPGNYDWY FDL 13
SEQ ID NO: 28 CDR1 de cadeia leve para urelumabe	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO: 29 CDR2 de cadeia leve para urelumabe	DASNRAT 7
SEQ ID NO: 30 CDR3 de cadeia leve para urelumabe	QQRSDWPPAL T 11

[00903] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é selecionado do 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 linha celular depositado como nº ATCC HB-11248 e divulgado na Patente nº US 6.974.863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), anticorpos divulgados na Publicação de Pedido de Patente nº US 2005/0095244, anticorpos divulgados na Patente nº US 7.288.638 (como 20H4.9-IgGl (BMS-663031)), anticorpos divulgados na Patente nº US 6.887.673 (tais como 4E9 ou BMS-554271), anticorpos divulgados na Patente nº US 7.214.493, anticorpos divulgados na Patente nº US 6.303.121, anticorpos divulgados na Patente nº US 6.569.997, anticorpos divulgados na Patente nº US 6.905.685 (tais como 4E9 ou BMS-554271), anticorpos divulgados na Patente nº US 6.362.325 (como 1D8 ou BMS-469492; 3H3 ou BMS-469497; ou 3El), os anticorpos divulgados na Patente nº US 6.974.863 (tal como 53A2); anticorpos divulgados na Patente nº US 6.210.669 (tal como 1D8, 3B8 ou 3El), anticorpos descritos na Patente nº US 5.928.893, anticorpos divulgados na Patente nº US 6.303.121, anticorpos divulgados na Patente nº US 6.569.997, anticorpos divulgados na International Publicação de Pedido de Patente nºs WO 2012/177788, WO 2015/119923 e WO 2010/042433, e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos, em que a divulgação de cada uma das patentes anteriores ou publicações de pedidos de patente é incorporada a título de referência aqui.

[00904] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é uma proteína de fusão agonística 4-1BB descrita na Publicação de 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 de Pedido de Patente nºs US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 e US 2015/0126710 A1; e Patentes

nos US 9.359.420, 9.340.599, 8.921.519 e 8.450.460, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência.

[00905] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de fusão agonística 4-1BB conforme representado na Estrutura I-A (proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal C) ou Estrutura I-B (proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal N), ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar do mesmo, conforme fornecido na **Figura 110.**

[00906] Nas estruturas I-A e I-B, os cilindros se referem a domínios de ligação de polipeptídeo individuais. As estruturas I-A e I-B compreendem três domínios de ligação de TNFRSF linearmente ligados derivados de, por exemplo, 4-1BBL (ligante 4-1BB, ligante CD137 (CD137L) ou membro da superfamília 9 do fator de necrose tumoral (TNFSF9)) ou um anticorpo que se liga a 4-1BB, que se dobram para formar uma proteína trivalente, que é então ligada a uma segunda proteína triavelente por meio de IgG1-Fc (incluindo os domínios C_H3 e C_H2), é então usada para ligar duas das proteínas trivalentes por meio de ligações dissulfeto (pequenas e alongadas ovais), estabilizando a estrutura e fornecendo um agonista capaz de reunir os domínios de sinalização intracelular dos seis receptores e proteínas de sinalização para formar um complexo de sinalização. Os domínios de ligação TNFRSF denotados como cilindros podem ser domínios scFv compreendendo, por exemplo, uma cadeia V_H e uma V_L conectadas por um ligante que pode compreender resíduos hidrofílicos e sequências Gly e Ser para flexibilidade, bem como Glu e Lys para solubilidade. Qualquer projeto de domínio scFv pode ser usado, como aqueles descritos em de Marco, *Microbial Cell Factories*, **2011,** *10*, 44; Ahmad, *et al.*, *Clin. & Dev. Immunol.* **2012,** 980250; Monnier, *et al.*, *Antibodies,* **2013,** *2,* 193-208; ou em referências incorporadas no presente documento. Estruturas de proteínas de fusão dessa forma são descritas nas Patentes nos US 9.359.420, 9.340.599, 8.921.519 e 8.450.460,

cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência.

[00907] As sequências de aminoácidos para os outros domínios polipeptídicos de estrutura I-A são fornecidas na Tabela 9. O domínio Fc compreende preferencialmente um domínio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO: 31) o domínio de dobradiça completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID NO: 31) ou uma porção do domínio de dobradiça (por exemplo, aminoácidos 4-16 de SEQ ID NO: 31). Os ligantes preferenciais para conectar um anticorpo Fc terminal C podem ser selecionados a partir das modalidades fornecidas em SEQ ID NO: 32 a SEQ ID NO: 41, incluindo ligantes adequados para a fusão de polipeptídeos adicionais.

TABELA 9: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA PROTEÍNAS DE FUSÃO AGONISTAS DE TNFRSF, INCLUINDO PROTEÍNAS DE FUSÃO AGONISTAS 4-1BB, COM PROJETO DE PROTEÍNA DE FUSÃO FRAGMENTO DE ANTICORPO FC DE TERMINAL C (ESTRUTURA I-A).

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 31 Domínios de 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 ligante	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO: 33 ligante	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO: 34 ligante	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO: 35 ligante	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO: 36 ligante	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO: 37 ligante	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO: 38 ligante	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
SEQ ID NO: 39 ligante	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
SEQ ID NO: 40 ligante	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
SEQ ID NO: 41 ligante	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

[00908] As sequências de aminoácidos para os outros domínios polipeptídicos de estrutura I-B são fornecidas na Tabela 10. Se um fragmento de anticorpo Fc é fundido ao terminal N de uma proteína de fusão agonista TNRFSF como na estrutura I-B, a sequência do módulo Fc é

preferencialmente aquela mostrada na SEQ ID NO: 42, e as sequências ligantes são preferencialmente selecionadas a partir dessas modalidades estabelecidas na SED ID NO: 43 à SEQ ID NO: 45.

TABELA 10: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA PROTEÍNAS DE FUSÃO AGONISTAS DE TNFRSF, INCLUINDO PROTEÍNAS DE FUSÃO AGONISTAS 4-1BB, COM PROJETO DE PROTEÍNA DE FUSÃO FRAGMENTO DE ANTICORPO FC TERMINAL N (ESTRUTURA I-B).

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 42 Domínios de 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 ligante	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO: 44 ligante	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO: 45 ligante	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

[00909] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 4-1BB selecionados do grupo que consiste em uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de utomilumabe, uma cadeia pesada variável e uma leve variável cadeia de urelumabe, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de utomilumabe, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável selecionada a partir das cadeias pesadas variáveis e cadeias leves variáveis descritas na Tabela 10, qualquer combinação de uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável do antecedente, e fragmentos, derivados, conjugados, variantes e biossimilares dos mesmos.

[00910] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 4-1BB compreendendo uma sequência 4-1BBL. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 4-1BB compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO: 46. Em uma modalidade, uma proteína

de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 4-1BB compreendendo uma sequência solúvel de 4-1BBL. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 4-1BB compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO: 47.

[00911] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 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 estão conectados por um ligante. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 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 estão conectados por um ligante. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 4-1BB que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são pelo menos 95% idênticas às sequências V_H e V_L apresentadas na Tabela 11, em que os domínios V_H e V_L estão ligados por um ligante.

TABELA 11: DOMÍNIOS POLIPEPTÍDICOS ADICIONAIS ÚTEIS COMO DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO 4-1BB EM PROTEÍNAS DE FUSÃO OU COMO ANTICORPOS AGONISTAS SCFV 4-1BB.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
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	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
Domínio solúvel 4-1BBL	KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO: 48 cadeia pesada variável para 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 para 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 para 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 para 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 para H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO: 53 cadeia leve variável para H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[00912] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (ii) um primeiro ligante de peptídeo, (iii) um segundo domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (iv) um segundo ligante de peptídeo e (v) um terceiro 4-1BB solúvel domínio de ligação, compreendendo ainda um domínio adicional na extremidade terminal N e/ou terminal C, e em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc. Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (ii) um primeiro ligante de peptídeo, (iii) um segundo domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (iv) um segundo ligante de peptídeo e (v) um terceiro 4-1BB solúvel domínio de ligação, compreendendo ainda um domínio adicional na extremidade terminal N e/ou terminal C, em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc, em que cada um dos domínios solúveis 4-1BB carece de uma região de pedúnculo (que

contribui para trimerização e fornece uma certa distância à membrana celular, mas não faz parte do domínio de ligação 4-1BB) e o primeiro e o segundo ligantes peptídicos têm, independentemente, um comprimento de 3-8 aminoácidos.

[00913] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio de citocina da superfamília do fator de necrose tumoral solúvel (TNF), (ii) um primeiro ligante de peptídeo, (iii) um segundo domínio de citocina da superfamília de TNF solúvel, (iv) um segundo ligante de peptídeo e (v) um terceiro domínio de citocina da superfamília TNF solúvel, em que cada um dos domínios de citocina da superfamília TNF solúvel carece de uma região de pedúnculo e o primeiro e o segundo ligantes peptídicos têm, independentemente, um comprimento de 3-8 aminoácidos, e em que cada domínio de citocina da superfamília TNF é uma ligação de 4-1BB domínio.

[00914] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é um anticorpo scFv agonístico 4-1BB compreendendo qualquer um dos domínios V_H anteriores ligados a qualquer um dos domínios V_L anteriores.

[00915] Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é o anticorpo agonista BPS Bioscience 4-1BB nº do catálogo 79097-2, comercialmente disponível junto à BPS Bioscience, San Diego, CA, EUA. Em uma modalidade, o agonista 4-1BB é o anticorpo agonista Creative Biolabs 4-1BB nº do catálogo MOM-18179, comercialmente disponível junto à Creative Biolabs, Shirley, NY, EUA.

3. AGONISTAS OX40 (CD134)

[00916] Em uma modalidade, o agonista de TNFRSF é um agonista OX40 (CD134). O agonista de OX40 pode ser qualquer molécula de ligação de OX40 conhecida na técnica. A molécula de ligação de OX40 pode ser um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão capaz de se ligar a OX40 humano ou mamífero. Os agonistas OX40 ou moléculas de ligação OX40 podem

compreender uma cadeia pesada de imunoglobulina de qualquer isotipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse da molécula de imunoglobulina. O agonista OX40 ou molécula de ligação OX40 pode ter uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Tal como aqui utilizado, o termo molécula de ligação também inclui anticorpos (incluindo anticorpos de comprimento total), anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos e fragmentos de anticorpos, por exemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab′), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, fragmentos de ligação a epítopo de qualquer um dos antecedentes, e formas modificadas de anticorpos, por exemplo, moléculas de scFv, que se ligam a OX40. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de ligação ao antígeno que é um anticorpo totalmente humano. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de ligação ao antígeno que é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, os agonistas de OX40 para uso nos métodos e composições presentemente divulgados incluem anticorpos anti-OX40, anticorpos anti-OX40 humanos, anticorpos anti-OX40 de camundongo, anticorpos anti-OX40 de mamífero, anticorpos monoclonais anti-OX40, anticorpos policlonais anti-OX40, anticorpos anti-OX40 quiméricos, adnectinas anti-OX40, anticorpos de domínio anti-OX40, fragmentos anti-OX40 de cadeia única, fragmentos anti-OX40 de cadeia pesada, fragmentos anti-OX40 de cadeia leve, proteínas de fusão anti-OX40 e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos. Em uma modalidade preferencial, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal agonístico, humanizado anti-OX40 ou totalmente humano (isto é, um anticorpo derivado de uma única linha celular).

[00917] Em uma modalidade preferencial, o agonista OX40 ou

molécula de ligação OX40 também pode ser uma proteína de fusão. As proteínas de fusão 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 preferencial, um agonista OX40 multimérico, tal como um agonista OX40 trimérico ou hexamérico (com três ou seis domínios de ligação de ligante), pode induzir agrupamento de receptor superior (OX40L) e formação de complexo de sinalização celular interno em comparação com um anticorpo monoclonal agonístico, que tipicamente possui dois domínios de ligação ao ligante. Proteínas triméricas (trivalentes) ou hexaméricas (ou hexavalentes) ou proteínas de fusão superiores compreendendo três domínios de ligação TNFRSF e IgG1-Fc e opcionalmente ligando adicional de duas ou mais dessas proteínas de fusão são descritas, por exemplo, em Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* **2013,** *12,* 2735-47.

[00918] Anticorpos agonísticos OX40 e proteínas de fusão são conhecidos por induzir fortes respostas imunológicas. Curti, *et al.*, *Cancer Res.* **2013**, *73,* 7189-98. Em uma modalidade preferencial, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão que se liga especificamente ao antígeno OX40 de uma maneira suficiente para reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a toxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), por exemplo, citotoxicidade de células NK. Em algumas modalidades, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP). Em algumas modalidades, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Em algumas modalidades, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a funcionalidade da região Fc.

[00919] Em algumas modalidades, os agonistas de OX40 são caracterizados pela ligação ao OX40 humano (SEQ ID NO: 54) com alta afinidade e atividade agonística. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma molécula de ligação que se liga a OX40 humano (SEQ ID NO: 54). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma molécula de ligação que se liga a OX40 murino (SEQ ID NO: 55). As sequências de aminoácidos do antígeno OX40 às quais um agonista OX40 ou molécula de ligação se liga estão resumidas na Tabela 12.

TABELA 12: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE ANTÍGENOS OX40.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
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

[00920] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista OX40 que se liga a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 100 pM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 90 pM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 80 pM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 70 pM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 60 pM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 50 pM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 40 pM ou inferior, ou liga-se a OX40 humano ou murino com um K_D de cerca de 30 pM ou inferior.

[00921] Em algumas modalidades, as composições, processos e

métodos descritos incluem um agonista OX40 que se liga a OX40 humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 8×10^5 1/M·s ou mais rápido, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $8,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 9×10^5 1/M·s ou mais rápido, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $9,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido ou se liga a OX40 humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 1×10^6 1/M·s ou mais rápido.

[00922] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista OX40 que se liga a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de 2×10^{-5} 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou se liga a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, liga-se a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou se liga a OX40 humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de 3×10^{-5} 1/s ou mais lento.

[00923] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem agonista de OX40 que se liga a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 10 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 9 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano

ou murino com um IC_{50} de cerca de 8 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 7 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 6 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 5 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 4 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 3 nM ou inferior, liga-se a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 2 nM ou inferior ou se liga a OX40 humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 1 nM ou inferior.

[00924] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é tavolixizumabe, também conhecido como MEDI0562 ou MEDI-0562. Tavolixizumab está disponível junto à subsidiária MedImmune da AstraZeneca, Inc. Tavolixizumab é imunoglobulina G1-kappa, anti-[*Homo sapiens* TNFRSF4 (receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) membro da superfamília 4, OX40, CD134)], anticorpo monoclonal humanizado e quimérico. As sequências de aminoácidos de tavolixizumabe são apresentadas na Tabela 13. Tavolixizumab compreende locais de N-glicosilação nas posições 301 e 301", com glicanos do tipo CHO biantenários complexos fucosilados; pontes dissulfeto intracadeia de 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 em posições 22’’-95’’, 148’’-204’’, 265’’-325’’, e 371’’-429’’); pontes dissulfeto intracadeia 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 dissulfureto intercadeia cadeia pesada-cadeia pesada nas posições 230-230’’ e 233-233’’; e pontes dissulfureto intercadeia de cadeia pesada-cadeia leve em 224-214’ e 224’’-214’’’. Os ensaios clínicos atuais de tavolixizumabe em uma variedade de indicações de tumor sólido incluem identificadores do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos Clinictrials.gov NCT02318394 e NCT02705482.

[00925] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 56 e uma cadeia leve dada pela 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 variável de cadeia única (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, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves 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.

[00926] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de tavolixizumabe. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada do agonista OX40 (V_H) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 58, e a região variável da cadeia leve do agonista OX40 (V_L) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 59, e substituições conservativas 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 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.

[00927] Em uma modalidade, um agonista OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 62, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 e SEQ ID NO: 65, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas.

[00928] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista OX40 aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos com referência a tavolixizumabe. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácidos de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-tradução em comparação com o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto

medicinal de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumabe. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-tradução são selecionadas a partir de um ou mais dentre: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biosimilar é um anticorpo agonista OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumabe. O anticorpo agonista OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, como o FDA dos EUA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumabe. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou o produto biológico de referência é o tavolixizumabe.

TABELA 13: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA ANTICORPOS AGONISTAS DE OX40 RELACIONADOS COM TAVOLIXIZUMABE.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 56 cadeia pesada para 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

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
	VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO: 57 cadeia leve para 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 para tavolixizumabe	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO: 59 região variável da cadeia leve para tavolixizumabe	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO: 60 CDR1 da cadeia pesada para tavolixizumabe	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO: 61 CDR2 da cadeia pesada para tavolixizumabe	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO: 62 CDR3 da cadeia pesada para tavolixizumabe	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO: 63 CDR1 de cadeia leve para tavolixizumabe	QDISNYLN 8
SEQ ID NO: 64 CDR2 de cadeia leve para tavolixizumabe	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO: 65 CDR3 de cadeia leve para tavolixizumabe	QQGSALPW 8

[00929] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é 11D4, que é um anticorpo totalmente humano disponível junto à Pfizer, Inc. A preparação e as propriedades de 11D4 são descritas nas Patentes n^{os} US 7.960.515; 8.236.930; e 9.028.824, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As sequências de aminoácidos de 11D4 são apresentadas na Tabela 14.

[00930] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 66 e uma cadeia leve dada pela 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 variável de cadeia única (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, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves 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.

[00931] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de 11D4. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada do agonista OX40 (V_H) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 68, e a região variável da cadeia leve do agonista OX40 (V_L) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 69, e substituições conservativas 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.

[00932] Em uma modalidade, um agonista OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada com as sequências estabelecidas na SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 e SEQ ID NO: 72, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 75, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas.

[00933] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista OX40 aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos com referência a 11D4. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácidos de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-tradução em comparação com o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 11D4. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-tradução são selecionadas a partir de um ou mais dentre: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biosimilar é um anticorpo agonista OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista OX40 é fornecido em uma formulação que difere das

formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 11D4. O anticorpo agonista OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, como o FDA dos EUA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 11D4. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou o produto biológico de referência é 11D4.

TABELA 14: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA ANTICORPOS AGONISTAS OX40 RELACIONADOS A 11D4.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 66 cadeia pesada para 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 para 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

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 68 região variável da cadeia pesada para 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO: 69 região variável de cadeia leve para 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO: 70 CDR1 da cadeia pesada para 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO: 71 CDR2 da cadeia pesada para 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO: 72 CDR3 da cadeia pesada para 11D4	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO: 73 CDR1 de cadeia leve para 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO: 74 CDR2 de cadeia leve para 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO: 75 CDR3 de cadeia leve para 11D4	QQYNSYPPT 9

[00934] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é 18D8, que é um anticorpo totalmente humano disponível junto à Pfizer, Inc. A preparação e as propriedades de 18D8 são descritas nas Patentes n^{os} US 7.960.515; 8.236.930; e 9.028.824, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As sequências de aminoácidos de 18D8 são apresentadas na Tabela 15.

[00935] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 76 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 77. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves com as sequências mostradas na SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, respectivamente, ou fragmentos de ligação ao antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variável de cadeia única (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, um agonista de OX40 compreende cadeias pesadas e leves 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.

[00936] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de 18D8. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada do agonista OX40 (V_H) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 78, e a região variável da cadeia leve do agonista OX40 (V_L) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 79, e substituições conservativas 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.

[00937] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências

estabelecidas em SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 e SEQ ID NO: 82, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 e SEQ ID NO: 85, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas.

[00938] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista OX40 aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos com referência a 18D8. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácidos de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-tradução em comparação com o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 18D8. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-tradução são selecionadas a partir de um ou mais dentre: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biosimilar é um anticorpo agonista OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 18D8. O anticorpo agonista OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, como o FDA dos EUA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência,

em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 18D8. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou o produto biológico de referência é 18D8.

TABELA 15: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA ANTICORPOS AGONISTAS DE OX40 RELACIONADOS A 18D8.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 76 cadeia pesada para 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 para 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 para 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 para 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO: 80 CDR1 de cadeia pesada para 18D8	DYAMH 5
SEQ ID NO: 81 CDR2 da cadeia pesada para 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO: 82 CDR3 de cadeia pesada para 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO: 83 CDR1 de cadeia leve para 18D8	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO: 84 CDR2 de cadeia leve para 18D8	DASNRAT 7

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 85 CDR3 de cadeia leve para 18D8	QQRSNWPT 8

[00939] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é Hu119-122, que é um anticorpo humanizado disponível junto à GlaxoSmithKline plc. A preparação e as propriedades de Hu119-122 são descritas nas Patentes nºs US 9.006.399 e 9.163.085, e na Publicação de Patente Internacional nº WO 2012/027328, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As sequências de aminoácidos de Hu119-122 são apresentadas na Tabela 16.

[00940] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de Hu119-122. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada do agonista OX40 (V_H) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 86, e a região variável da cadeia leve do agonista OX40 (V_L) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 87, e substituições conservativas 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.

[00941] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os

domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 90, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92 e SEQ ID NO: 93, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas.

[00942] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista OX40 aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos com referência a Hu119-122. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácidos de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-tradução em comparação com o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-tradução são selecionadas a partir de um ou mais dentre: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biosimilar é um anticorpo agonista OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. O anticorpo agonista OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, como o FDA dos EUA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos

em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou o produto biológico de referência é Hu119-122.

TABELA 16: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA ANTICORPOS AGONISTAS DE OX40 RELACIONADOS A HU119-122.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 86 região variável da cadeia pesada para Hu119-122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO: 87 região variável de cadeia leve para Hu119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO: 88 CDR1 da cadeia pesada para Hu119-122	SHDMS 5
SEQ ID NO: 89 CDR2 da cadeia pesada para Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO: 90 CDR3 de cadeia pesada para Hu119-122	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO: 91 CDR1 de cadeia leve para Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMH 15
SEQ ID NO: 92 CDR2 de cadeia leve para Hu119-122	LASNLES 7
SEQ ID NO: 93 CDR3 de cadeia leve para Hu119-122	QHSRELPLT 9

[00943] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é Hu106-222, que é um anticorpo humanizado disponível junto à GlaxoSmithKline plc. A preparação e as propriedades de Hu106-222 são descritas nas Patentes nºs US 9.006.399 e 9.163.085, e na Publicação de Patente Internacional nº WO 2012/027328, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As sequências de aminoácidos de Hu106-222 são apresentadas na Tabela 17.

[00944] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de Hu106-222. Em

uma modalidade, a região variável da cadeia pesada do agonista OX40 (V_H) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 94, e a região variável da cadeia leve do agonista OX40 (V_L) compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 95, e substituições conservativas 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.

[00945] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 e SEQ ID NO: 98, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas, e domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências estabelecidas em SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 e SEQ ID NO: 101, respectivamente, e substituições conservativas de aminoácidos das mesmas.

[00946] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um anticorpo monoclonal biossimilar agonista OX40 aprovado pelas autoridades reguladoras de fármacos com referência a Hu106-222. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo OX40

compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácidos de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-tradução em comparação com o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-tradução são selecionadas a partir de um ou mais dentre: glicosilação, oxidação, desamidação e truncamento. Em algumas modalidades, o biosimilar é um anticorpo agonista OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista OX40 é fornecido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. O anticorpo agonista OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármacos, como o FDA dos EUA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. Em algumas modalidades, o biossimilar é fornecido como uma composição que compreende ainda um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são iguais ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou o produto biológico de referência é Hu106-222.

TABELA 17: SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA ANTICORPOS AGONISTAS DE OX40 RELACIONADOS COM HU106-222.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 94 região variável da cadeia pesada para Hu106-222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO: 95 região variável de cadeia leve para Hu106-222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 96 CDR1 da cadeia pesada para Hu106-222	DYSMH 5
SEQ ID NO: 97 CDR2 da cadeia pesada para Hu106-222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO: 98 CDR3 da cadeia pesada para Hu106-222	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO: 99 CDR1 de cadeia leve para Hu106-222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO: 100 CDR2 de cadeia leve para Hu106-222	SASYLYT 7
SEQ ID NO: 101 CDR3 de cadeia leve para Hu106-222	QQHYSTPRT 9

[00947] Em algumas modalidades, o anticorpo agonista OX40 é MEDI6469 (também referido como 9B12). MEDI6469 é um anticorpo monoclonal murino. Weinberg, *et al.*, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575 a 585. Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo produzido pelo hibridoma 9B12, depositado na Biovest Inc. (Malvern, MA, EUA), conforme descrito em Weinberg, *et al.*, *J. Immunother*. **2006**, *29*, 575-585, cuja divulgação é incorporada neste documento a título de referência em sua totalidade. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende as sequências CDR 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.

[00948] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é L106 BD (Produto Pharmingen nº 340420). Em algumas modalidades, o agonista OX40 compreende as CDRs do anticorpo L106 (Produto BD Pharmingen 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 (Produto BD Pharmingen nº

340420). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, nº de catálogo 20073). Em algumas modalidades, o agonista OX40 compreende as CDRs do anticorpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, nº de catálogo 20073). Em algumas modalidades, o agonista 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, nº de catálogo 20073). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é o anticorpo monoclonal murino anti-mCD134/mOX40 (clone OX86), disponível comercialmente junto à InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH.

[00949] Em uma modalidade, o agonista OX40 é selecionado a partir dos agonistas 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 US nºs US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 e US 2015/132288 (incluindo os clones 20E5 e 12H3); e Patentes nºs US 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, a divulgação de cada uma das quais é incorporada neste documento a título de referência em sua totalidade.

[00950] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de fusão agonística OX40 conforme representado na Estrutura I-A (proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal C) ou Estrutura I-B (proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal N), ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar do mesmo. As propriedades das estruturas I-A e I-B são descritas acima e nas Patentes nºs US 9.359.420, 9.340.599, 8.921.519 e 8.450.460, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. As sequências de aminoácidos para os domínios polipeptídicos da estrutura I-A são fornecidas na Tabela 9. O

domínio Fc compreende preferencialmente um domínio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO: 31) o domínio de dobradiça completo (aminoácidos 1-16 de SEQ ID NO: 31) ou uma porção do domínio de dobradiça (por exemplo, aminoácidos 4-16 de SEQ ID NO: 31). Os ligantes preferenciais para conectar um anticorpo Fc terminal C podem ser selecionados a partir das modalidades fornecidas em SEQ ID NO: 32 a SEQ ID NO: 41, incluindo ligantes adequados para a fusão de polipeptídeos adicionais. Da mesma forma, as sequências de aminoácidos para os domínios polipeptídicos da estrutura I-B são apresentadas na Tabela 10. Se um fragmento de anticorpo Fc é fundido ao terminal N de uma proteína de fusão TNRFSF como na estrutura I-B, a sequência do módulo Fc é preferencialmente aquela mostrada na SEQ ID NO: 42, e as sequências de ligante são preferencialmente selecionadas a partir dessas modalidades definidas adiante em SED ID NO: 43 a SEQ ID NO: 45.

[00951] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação OX40 selecionados do grupo que consiste em uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de tavolixizumabe, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de 11D4, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de 18D8, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de Hu119-122, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável de Hu106-222, uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve variável selecionada a partir da variável pesada cadeias e cadeias leves variáveis descritas na Tabela 17, qualquer combinação de uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável dos anteriores e fragmentos, derivados, conjugados, variantes e biossimilares dos mesmos.

[00952] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação OX40 compreendendo uma sequência OX40L. Em uma modalidade,

uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação OX40 compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO: 102. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação OX40 compreendendo uma sequência OX40L solúvel. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação OX40 compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO: 103. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação OX40 compreendendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO: 104.

[00953] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 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 estão conectados por um ligante. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 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 estão conectados por um ligante. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 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 estão conectados por um ligante. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo

com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 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 estão conectados por um ligante. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação 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 estão conectados por um ligante. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação OX40 que é um domínio scFv compreendendo regiões V_H e V_L que são pelo menos 95% idênticas às sequências V_H e V_L dado na Tabela 14, em que os domínios V_H e V_L estão conectados por um ligante.

TABELA 18: DOMÍNIOS POLIPEPTÍDICOS ADICIONAIS ÚTEIS COMO DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO OX40 EM PROTEÍNAS DE FUSÃO (POR EXEMPLO, ESTRUTURAS I-A E I-B) OU COMO ANTICORPOS AGONISTAS SCFV OX40.

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ SID 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 solúvel OX40L	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO: 104 domínio solúvel OX40L (alternativa)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO: 105 cadeia pesada variável para 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 106 cadeia leve variável para 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 107 cadeia pesada variável para 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO: 108 cadeia leve variável para 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 109 cadeia pesada variável para 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO: 110 cadeia leve variável para 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 111 cadeia pesada variável para 023	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO: 112 cadeia leve variável para 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 de 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 de cadeia leve	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 117 região variável da cadeia pesada do 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 do 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 do anticorpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107

Identificador	Sequência (símbolos de aminoácidos de uma letra)
SEQ ID NO: 120 região variável da cadeia leve do anticorpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 121 região variável da cadeia pesada do 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 do 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 do 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 do anticorpo humanizado	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO: 125 região variável de 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 de cadeia leve	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[00954] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de OX40 solúvel, (ii) um primeiro ligante de peptídeo, (iii) um segundo domínio de ligação de OX40 solúvel, (iv) um segundo ligante de peptídeo e (v) um terceiro domínio de ligação de OX40 solúvel, compreendendo ainda um domínio adicional na extremidade terminal N e/ou terminal C, e em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc. Em uma modalidade, o agonista OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de OX40 solúvel, (ii) um primeiro ligante de peptídeo, (iii) um segundo domínio de ligação de OX40 solúvel, (iv) um segundo ligante de peptídeo e (v) um terceiro domínio de ligação de OX40 solúvel, compreendendo ainda um domínio adicional na extremidade terminal N e/ou terminal C, em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou

Fc em que cada um dos domínios de ligação OX40 solúveis carece de uma região de pedúnculo (que contribui para a trimerização e fornece uma certa distância para o membrana celular, mas não faz parte do domínio de ligação OX40) e o primeiro e o segundo ligantes peptídicos têm, independentemente, um comprimento de 3-8 aminoácidos.

[00955] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um agonista de polipeptídeo de fusão de cadeia única de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de citocina da superfamília do fator de necrose tumoral solúvel (TNF), (ii) um primeiro ligante de peptídeo, (iii) um segundo domínio de citocina da superfamília de TNF solúvel, (iv) um segundo ligante de peptídeo e (v) um terceiro domínio de citocina da superfamília TNF solúvel, em que cada um dos domínios de citocina da superfamília TNF solúvel carece de uma região de pedúnculo e o primeiro e o segundo ligantes peptídicos têm independentemente um comprimento de 3-8 aminoácidos e em que o domínio de citocina da superfamília TNF é um domínio de ligação OX40.

[00956] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é MEDI6383. MEDI6383 é uma proteína de fusão agonística OX40 e pode ser preparada como descrito na Patente nº US 6.312.700, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência.

[00957] Em uma modalidade, o agonista OX40 é um anticorpo agonista OX40 scFv compreendendo qualquer um dos domínios V_H anteriores ligados a qualquer um dos domínios V_L anteriores.

[00958] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é anticorpo monoclonal agonista MOM-18455 da Creative Biolabs OX40, comercialmente disponível junto à Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, EUA.

[00959] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é OX40 clone de anticorpo agonístico Ber-ACT35 comercialmente disponível junto à BioLegend, Inc., San Diego, CA, EUA.

I. ANÁLISES DE VIABILIDADE DE CÉLULA OPCIONAIS

[00960] Opcionalmente, um ensaio de viabilidade celular pode ser realizado após a primeira expansão de iniciação (às vezes referida como a expansão em massa inicial), usando ensaios padrão conhecidos na técnica. Assim, em certas modalidades, o método compreende a realização de um ensaio de viabilidade celular subsequente à primeira expansão de iniciação. Por exemplo, um ensaio de exclusão de azul de tripano pode ser feito em uma amostra dos TILs em massa, que rotula seletivamente as células mortas e permite uma avaliação de viabilidade. Outros ensaios para uso no teste de viabilidade podem incluir, porém sem limitação, o ensaio de azul Alamar; e o ensaio MTT.

1. CONTAGENS DE CÉLULAS, VIABILIDADE, CITOMETRIA DE FLUXO

[00961] Em algumas modalidades, as contagens de células e/ou viabilidade são medidas. A expressão de marcadores, tais como, porém sem limitação, CD3, CD4, CD8 e CD56, bem como qualquer outro divulgado ou descrito aqui, pode ser medida por citometria de fluxo com anticorpos, por exemplo, porém sem limitação, aqueles comercialmente disponíveis junto à 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 c-chip descartável (VWR, Batavia, IL) e a viabilidade pode ser avaliada usando qualquer método conhecido na técnica, incluindo, porém sem limitação, coloração com azul de tripano. A viabilidade celular também pode ser avaliada com base no documento USSN 15/863.634, incorporada neste documento a título de referência em sua totalidade. A viabilidade celular também pode ser avaliada com base na Publicação de Patente US 2018/0280436 ou na Publicação de Patente Internacional nº WO/2018/081473, ambas incorporadas no presente documento em sua totalidade para todos os fins.

[00962] Em alguns casos, a população de TIL em massa pode ser

criopreservada imediatamente, usando os protocolos discutidos abaixo. Alternativamente, a população de TIL em massa pode ser submetida a REP e então criopreservada conforme discutido abaixo. Da mesma forma, no caso em que TILs geneticamente modificados serão usados na terapia, as populações a granel ou REP TIL podem ser submetidas a modificações genéticas para tratamentos adequados.

2. CULTURAS DE CÉLULAS

[00963] Em uma modalidade, um método para expandir TILs, incluindo aqueles discutidos acima, bem como exemplificados na Figura 1, em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C, pode incluir o uso de cerca de 5000 ml a cerca de 25000 ml de meio celular, cerca de 5000 ml a cerca de 10000 ml de meio celular, ou cerca de 5800 ml a cerca de 8700 ml de meio celular. Em algumas modalidades, o meio é um meio sem soro. Em algumas modalidades, o meio na primeira expansão de iniciação é livre de soro. Em algumas modalidades, o meio na segunda expansão é isento de soro. Em algumas modalidades, os meios na primeira expansão de iniciação e na segunda expansão (também referida como segunda expansão rápida) são ambos isentos de soro. Em uma modalidade, expandir o número de TILs não usa mais do que um tipo de meio de cultura de células. Qualquer meio de cultura de células adequado pode ser usado, por exemplo, meio de células AIM-V (L-glutamina, sulfato de estreptomicina 50 μM e sulfato de gentamicina 10 μM) meio de cultura de células (Invitrogen, Carlsbad CA). A este respeito, os métodos inventivos reduzem vantajosamente a quantidade de meio e o número de tipos de meio necessários para expandir o número de TIL. Em uma modalidade, expandir o número de TIL pode compreender alimentar as células não mais frequentemente do que a cada três ou quatro dias. Expandir o número de células em um recipiente permeável a gás simplifica os procedimentos necessários para expandir o número de células reduzindo-se a frequência de alimentação necessária para expandir as células.

[00964] Em uma modalidade, o meio de cultura de células no primeiro e/ou no segundo recipientes permeáveis a gás 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 no segundo recipiente permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME).

[00965] Em uma modalidade, a duração do método compreende obter uma amostra de tecido tumoral do mamífero; cultivar a amostra de tecido tumoral em um primeiro recipiente permeável a gás contendo meio celular incluindo IL-2, 1X células alimentadoras de apresentação de antígeno e OKT-3 por uma duração de cerca de 1 a 8 dias, por exemplo, cerca de 8 dias como uma primeira expansão de iniciação; transferir os TILs para um segundo recipiente permeável a gás e expandir o número de TILs no segundo recipiente permeável a gás contendo meio celular incluindo IL-2, 2X células alimentadoras de apresentação de antígeno e OKT-3 por um período de cerca de 7 a 9 dias, por exemplo, cerca de 7 dias, cerca de 8 dias ou cerca de 9 dias.

[00966] Em uma modalidade, a duração do método compreende a obtenção de uma amostra de tecido tumoral do mamífero; cultivar a amostra de tecido tumoral em um primeiro recipiente permeável a gás contendo meio celular incluindo IL-2, 1X células alimentadoras de antígeno e OKT-3 por uma duração de cerca de 1 a 7 dias, por exemplo, cerca de 7 dias como uma primeira expansão de iniciação; transferir os TILs para um segundo recipiente permeável a gás e expandir o número de TILs no segundo recipiente permeável a gás contendo meio celular incluindo IL-2, 2X células alimentadoras de apresentação de antígeno e OKT-3 por um período de cerca de 7 a 9 dias, por exemplo, cerca de 7 dias, cerca de 8 dias ou cerca de 9 dias.

[00967] Em uma modalidade, a duração do método compreende obter uma amostra de tecido tumoral do mamífero; cultivar a amostra de tecido tumoral em um primeiro recipiente permeável a gás contendo meio celular

incluindo IL-2, 1X células alimentadoras de antígeno e OKT-3 por uma duração de cerca de 1 a 7 dias, por exemplo, cerca de 7 dias como uma primeira expansão de iniciação; transferir os TILs para um segundo recipiente permeável a gás e expandir o número de TILs no segundo recipiente permeável a gás contendo meio celular incluindo IL-2, células alimentadoras de apresentação de antígeno 2X e OKT-3 por um período de cerca de 7 a 10 dias, por exemplo, cerca de 7 dias, cerca de 8 dias, cerca de 9 dias ou cerca de 10 dias.

[00968] Em uma modalidade, os TILs são expandidos em recipientes permeáveis ao gás. Recipientes permeáveis a gás foram usados para expandir TILs usando PBMCs usando métodos, composições e dispositivos conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente US 2005/0106717 A1, cujas divulgações são incorporadas neste documento a título de referência. Em uma modalidade, os TILs são expandidos em sacos permeáveis a gases. Em uma modalidade, os TILs são expandidos usando um sistema de expansão celular que expande os TILs em sacos permeáveis a gás, como o Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). Em uma modalidade, os TILs são expandidos usando um sistema de expansão celular que expande os TILs em sacos permeáveis a gases, 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 um saco de células permeáveis a gás com um volume selecionado do grupo que consiste em cerca de 100 ml, cerca de 200 ml, cerca de 300 ml, cerca de 400 ml, cerca de 500 ml, cerca de 600 ml, cerca de 700 ml, cerca de 800 ml, cerca de 900 ml, cerca de 1 l, cerca de 2 l, cerca de 3 l, cerca de 4 l, cerca de 5 l, cerca de 6 l, cerca de 7 l, cerca de 8 l, cerca de 9 l e cerca de 10 l.

[00969] Em uma modalidade, os TILs podem ser expandidos em frascos G-Rex (comercialmente disponíveis na Wilson Wolf Manufacturing). Tais modalidades permitem que as populações de células se expandam de

cerca de 5×10^5 células/cm^2 para entre 10×10^6 e 30×10^6 células/cm^2. Em uma modalidade, isso é sem alimentação. Em uma modalidade, isso é sem alimentação, desde que o meio resida a uma altura de cerca de 10 cm no frasco G-Rex. Em uma modalidade, isso 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 do Pedido de Patente nº US 2014/0377739A1, Publicação Internacional nº WO 2014/210036 A1, Publicação do Pedido de Patente nº US 2013/0115617 A1, Publicação Internacional nº WO 2013/188427 A1, Publicação de Pedido de Patente nº US 2011/0136228 A1, Patente nº US 8.809.050 B2, Publicação Internacional nº WO 2011/072088 A2, Publicação do Pedido de Patente nº US 2016/0208216 A1, Publicação do Pedido de Patente nº US 2012/0244133 A1, Publicação Internacional nº WO 2012/129201 A1, Publicação do Pedido de Patente US nº US 2013/0102075 A1, Patente nº US 8.956.860 B2, Publicação Internacional nº WO 2013/173835 A1, Publicação de Pedido de Patente nº US 2015/0175966 A1, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. Esses processos também são descritos em Jin *et al.*, *J. Immunotherapy,* **2012**, 35: 283-292.

J. ENGENHARIA GENÉTICA OPCIONAL DE TILS

[00970] Em algumas modalidades, os TILs expandidos da presente invenção são adicionalmente manipulados antes, durante ou após uma etapa de expansão, incluindo durante processos de fabricação estéreis fechados, cada um conforme fornecido neste documento, a fim de alterar a expressão da proteína de uma maneira transitória. Em algumas modalidades, a expressão da proteína alterada transitoriamente é devido à edição transiente do gene. 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 de proteínas nos TILs. Em algumas modalidades, os TFs e/ou outras moléculas que são capazes de alterar transitoriamente a expressão da proteína fornecem expressão alterada de antígenos tumorais e/ou uma alteração no número de células T específicas do antígeno tumoral em uma população de TILs.

[00971] 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.

[00972] Em algumas modalidades, a presente invenção inclui edição genética por meio da inserção de nucleotídeos, como por meio da inserção de ácido ribonucleico (RNA), incluindo a inserção de RNA mensageiro (mRNA) ou pequeno (ou curto) RNA de interferência (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 ambas promoções de um conjunto de proteínas com inibição de outro conjunto de proteínas.

[00973] Em algumas modalidades, os TILs expandidos da presente invenção sofrem alteração transitória da expressão da proteína. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína ocorre na população de TIL em massa antes da primeira expansão, incluindo, por exemplo, na população de TIL obtida por exemplo, Etapa A, conforme indicado na Figura 1 (particularmente na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína ocorre durante a primeira expansão, incluindo, por exemplo, na população de TIL expandida, por exemplo, na Etapa B, conforme indicado na Figura 1 (por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína ocorre após a primeira

expansão, incluindo, por exemplo, na população de TIL em transição entre a primeira e a segunda expansão (por exemplo, a segunda população de TILs como aqui descrito), a população de TIL obtida para exemplo, Etapa B e incluída na Etapa C, conforme indicado na Figura 1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína ocorre na população de TIL em massa antes da segunda expansão, incluindo, por exemplo, na população de TIL obtida por exemplo, Etapa C e antes de sua expansão na Etapa D, conforme indicado na Figura 1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína ocorre durante a segunda expansão, incluindo, por exemplo, na população de TIL expandida, por exemplo, na Etapa D conforme indicado na Figura 1 (por exemplo, a terceira população de TILs). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína ocorre após a segunda expansão, incluindo, por exemplo, na população de TIL obtida a partir da expansão, por exemplo, na Etapa D, conforme indicado na Figura 1.

[00974] Em uma modalidade, um método para alterar transitoriamente a expressão da proteína em uma população de TILs inclui a etapa de eletroporação. Os métodos de eletroporação são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Tsong, *Biophys. J.* **1991,** *60,* 297-306 e Publicação do Pedido de Patente nº US 2014/0227237 A1, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método para alterar transitoriamente a expressão da proteína na população de TILs inclui a etapa de transfecção de fosfato de cálcio. Os métodos de transfecção com fosfato de cálcio (precipitação de DNA com fosfato de cálcio, revestimento da superfície celular e endocitose) são conhecidos na técnica e são descritos em Graham e van der Eb, *Virology* **1973,** *52,* 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979,** *76,* 1373-1376; e Chen e Okayarea, *Mol. Célula. Biol.* **1987,** *7,* 2745-2752; e na Patente nº US 5.593.875, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente

documento a título de referência. Em uma modalidade, um método para alterar transitoriamente a expressão da proteína em uma população de TILs inclui a etapa de transfecção lipossomal. Métodos de transfecção lipossomal, tais como métodos que empregam uma formulação de lipossoma 1:1 (p/p) do lipídio catiônico cloreto de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*n*,*n*,*n*-trimetilamônio (DOTMA) e dioleoilfofotidiletanolamina (DOPE) em água filtrada, são conhecidos na técnica e são descritos em Rose, *et al.*, *Biotechniques* **1991,** *10,* 520-525 e Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, **1987,** *84,* 7413-7417 e nas Patentes n^{os} US 5.279.833; 5.908.635; 6.056.938; 6.110.490; 6.534.484; e 7.687.070, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método para alterar transitoriamente a expressão de proteína em uma população de TILs inclui a etapa de transfecção usando métodos descritos nas Patentes n^{os} US 5.766.902; 6.025.337; 6.410.517; 6.475.994; e 7.189.705; as divulgações de cada uma delas são incorporadas neste documento a título de referência.

[00975] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em um aumento nas células T de memória-tronco (TSCMs). Os TSCMs são os primeiros progenitores de células T de memória central com experiência em antígeno. Os TSCMs geralmente exibem as habilidades de sobrevivência, autorrenovação e multipotência de longo prazo que definem as células-tronco e são geralmente desejáveis para a geração de produtos TIL eficazes. TSCM mostrou atividade antitumoral aumentada em comparação com outros subconjuntos de células T em modelos de camundongo de transferência de células adotivas (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 da proteína resulta em uma população de TIL com uma composição que compreende uma alta proporção de TSCM. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em 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 aumento na porcentagem de TSCM. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em um aumento de pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em TSCMs na população de TIL. Em certas modalidades, a alteração transitória de expressão de proteína resulta em uma população de TIL com 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 certas modalidades, a alteração transitória de expressão de proteína resulta em uma população de TIL com 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.

[00976] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta no rejuvenescimento de células T experientes com antígeno. Em algumas modalidades, o rejuvenescimento inclui, por exemplo, aumento da proliferação, aumento da ativação de células T e/ou aumento do reconhecimento do antígeno.

[00977] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína altera a expressão em uma grande fração das células T, a fim de preservar o repertório de TCR derivado de tumor. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína não altera o repertório de TCR

derivado de tumor. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína mantém o repertório de TCR derivado de tumor.

[00978] Em algumas modalidades, a alteração transitória da proteína resulta na expressão alterada de um determinado gene. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína tem como alvo um gene incluindo, porém sem limitação, PD-1 (também referido como PDCD1 ou CC279), TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCRs (receptores coestimuladores 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 cAMP (PKA). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína tem como alvo um gene selecionado do grupo que consiste em PD-1, TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCRs (receptores coestimuladores 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 cAMP (PKA). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo PD-1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo TGFBR2. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCR4/5. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCRs (receptores coestimuladores quiméricos). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo IL-2. Em

algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo IL-12. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo IL-15. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo IL-21. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo NOTCH 1/2 ICD. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo TIM3. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo LAG3. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo TIGIT. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo TGFβ. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCR1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCR2. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCR4. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCR5. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CXCR1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CXCR2. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CSCR3. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCL2 (MCP-1). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCL3 (MIP-1α). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCL4 (MIP1-β). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCL5 (RANTES). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CXCL1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CXCL8. Em algumas modalidades, a alteração

transitória da expressão de proteína tem como alvo CCL22. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CCL17. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo VHL. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo CD44. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo PIK3CD. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo SOCS1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão de proteína tem como alvo proteína quinase cAMP A (PKA).

[00979] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de um receptor de quimiocina. Em algumas modalidades, o receptor de quimiocina que é superexpresso por expressão de proteína transitória inclui um receptor com um ligante que inclui, porém sem limitação, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22 e/ou CCL17.

[00980] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em uma diminuição e/ou expressão reduzida de PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβR2 e/ou TGFβ (incluindo resultando em, para exemplo, bloqueio da via de TGFβ). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em uma diminuição e/ou expressão reduzida de CBLB (CBL-B). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em uma diminuição e/ou expressão reduzida de CISH.

[00981] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de receptores de quimiocinas, a fim de, por exemplo, melhorar o tráfego de TIL ou movimento para o local do tumor. Em algumas modalidades, a alteração transitória da

expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de um CCR (receptor coestimulador quimérico). Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de um receptor de quimiocina selecionado do grupo que consiste em CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 e/ou CSCR3.

[00982] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de uma interleucina. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de uma interleucina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IL-12, IL-15 e/ou IL-21.

[00983] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de NOTCH 1/2 ICD. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de VHL. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de CD44. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de PIK3CD. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em aumento e/ou superexpressão de SOCS1.

[00984] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida da proteína quinase A cAMP (PKA).

[00985] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta na expressão diminuída e/ou reduzida de uma molécula selecionada do grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de duas moléculas selecionadas do grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2,

PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e uma molécula selecionada do grupo que consiste em LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e uma de LAG3, CISH, CBLB, TIM3 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e LAG3. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de PD-1 e CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de LAG3 e CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de LAG3 e CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de CISH e CBLB. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e PD-1. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e LAG3. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e CISH. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em

expressão diminuída e/ou reduzida de TIM3 e CBLB.

[00986] Em algumas modalidades, uma molécula de adesão selecionada do grupo que consiste em CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 e combinações dos mesmos, é inserida por um método gamaretroviral ou lentiviral na primeira população de TILs, segunda população de TILs ou população colhida de TILs (por exemplo, a expressão da molécula de adesão é aumentada).

[00987] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta na expressão diminuída e/ou reduzida de uma molécula selecionada do grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), e combinações dos mesmos, e expressão aumentada e/ou aumentada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína resulta em expressão diminuída e/ou reduzida de uma molécula selecionada do grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CISH, CBLB e combinações dos mesmos, e expressão aumentada e/ou aprimorada de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 e combinações dos mesmos.

[00988] Em algumas modalidades, há uma diminuição na expressão de cerca de 5%, de cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas

modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 80%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 85%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 90%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 99%.

[00989] Em algumas modalidades, há uma diminuição na expressão de cerca de 5%, de cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 80%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 85%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 90%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 95%. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de pelo menos cerca de 99%.

[00990] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína é induzida pelo tratamento dos TILs com fatores de transcrição

(TFs) e/ou outras moléculas capazes de alterar transitoriamente a expressão da proteína nos TILs. Em algumas modalidades, a plataforma microfluídica livre de vetor SQZ é empregada para distribuição intracelular dos fatores de transcrição (TFs) e/ou outras moléculas capazes de alterar transitoriamente a expressão da proteína. Tais métodos demonstram a capacidade de entregar proteínas, incluindo fatores de transcrição, a uma variedade de células humanas primárias, incluindo células T (Sharei *et al*. PNAS 2013, bem como Sharei *et al.* PLOS ONE 2015 e Greisbeck *et al.* J. Immunology vol. 195, 2015) foram descritos; consultar, por exemplo, Publicações de Patentes Internacionais WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 e WO 2017/123663A1, todos os quais são incorporados no presente documento a título de referência na sua totalidade. Tais métodos, conforme descrito nas Publicações de Patente Internacional WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 e WO 2017/123663A1, podem ser empregados com a presente invenção a fim de expor uma população de TILs a fatores de transcrição (TFs) e/ou outras moléculas capazes de induzir a expressão de proteína transitória, em que os ditos TFs e/ou outras moléculas capazes de induzir a expressão de proteína transitória fornecem expressão aumentada de antígenos tumorais e/ou um aumento no número de células T específicas do antígeno tumoral na população de TILs, resultando assim na reprogramação da população de TIL e um aumento na eficácia terapêutica da população de TIL reprogramada em comparação com uma população de TIL 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 à população de TILs anterior (isto é, antes da reprogramação), conforme descrito neste documento.

[00991] Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) inclui, porém sem limitação, 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 cultura de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), como a substituição de soro KNOCKOUT disponível comercialmente (Gibco/ThermoFisher), para induzir reprogramação de TIL adicional. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é administrado com um coquetel iPSC para induzir a reprogramação de TIL adicional. Em algumas modalidades, o fator de transcrição (TF) é administrado sem um coquetel iPSC. Em algumas modalidades, a reprogramação resulta em um aumento na porcentagem de TSCMs. Em algumas modalidades, a reprogramação resulta em um aumento na porcentagem de TSCMs de cerca de 5%, de cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95% de TSCMs.

[00992] Em algumas modalidades, um método de alteração transitória da expressão da proteína, conforme descrito acima, pode ser combinado com um método de modificação genética de uma população de TILs inclui a etapa de incorporação estável de genes para a produção de uma ou mais proteínas. Em certas modalidades, o método compreende uma etapa de modificar geneticamente 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 de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução lentiviral. Os sistemas de transdução lentiviral são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, 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 nº US 6.627.442, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral gama. Os sistemas de transdução gamaretroviral são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, Cepko e Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* **1996,** 9.9.1-9.9.16, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transferência de gene mediada por transposon. Os sistemas de transferência de genes mediados por transposons são conhecidos na técnica e incluem sistemas em que a transposase é fornecida como um vetor de expressão de DNA ou como um RNA expressável ou uma proteína de modo que a expressão de longo prazo da transposase não ocorra nas células transgênicas, por exemplo, uma transposase fornecida como um mRNA (por exemplo, um mRNA compreendendo uma capa e uma cauda poli-A). Sistemas adequados de transferência de gene mediada por transposon, incluindo a transposase semelhante a Tel do tipo salmonídeo (SB ou Sleeping Beauty transposase), como SB10, SB11 e SB100x, e enzimas modificadas com atividade enzimática aumentada, são descritos em, por exemplo, Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* **2010,** *18,* 674-83 e Patente nº US 6.489.458, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência.

[00993] Em algumas modalidades, a alteração transitória da expressão da proteína é uma redução na expressão induzida por interferência de autoentrega de RNA (sdRNA), que é um duplex de siRNA assimétrico quimicamente sintetizado com uma alta porcentagem de substituições 2'-OH (tipicamente flúor ou -OCH_3) que compreende uma fita antisense (guia) de 20 nucleotídeos e uma fita sense de 13 a 15 bases (passageira) conjugada com

colesterol em sua extremidade 3’ usando um ligante de tetraetilenoglicol (TEG). Em algumas modalidades, o método compreende a alteração transitória da expressão da proteína em uma população de TILs, compreendendo o uso de interferência de RNA de autotransmissão (sdRNA), que é um duplex de siRNA assimétrico sintetizado quimicamente com uma alta porcentagem de substituições 2'-OH (tipicamente flúor ou -OCH_3), que compreende uma fita antisense de 20 nucleótidos (de guia) e uma fita sense de 13 a 15 bases (passageira) conjugada com colesterol na sua extremidade 3' utilizando um ligante tetraetilenglicol (TEG). Métodos de uso de sdRNA foram descritos em Khvorova e 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, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TIL é realizada sem o uso de eletroporação, SQZ ou outros métodos, em vez de usar um período de 1 a 3 dias em que uma população de TIL é exposta a sdRNA a uma concentração de 1 μM/10000 TILs no meio. Em certas modalidades, o método compreende a entrega de sdRNA a uma população de TILs compreendendo a exposição da população de TILs a sdRNA a uma concentração de 1 μM/10000 TILs em meio por um período de entre 1 a 3 dias. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TIL é realizada usando um período de 1 a 3 dias em que uma população de TIL é exposta a sdRNA a uma concentração de 10 μM/10000 TILs no meio. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TIL é realizada usando um período de 1 a 3 dias em que uma população de TIL é exposta a sdRNA a uma concentração de 50 μM/10000 TILs no meio. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma população de TIL é realizada usando um período de 1 a 3 dias em que uma população de TIL é exposta a sdRNA a uma concentração entre 0,1 μM/10000 TILs e 50 μM/10000 TILs no meio. Em uma modalidade, a entrega de sdRNA a uma

população de TIL é realizada usando um período de 1 a 3 dias em que uma população de TIL é exposta a sdRNA a uma concentração de entre 0,1 µM/10000 TILs e 50 µM/10000 TILs no meio, em que a exposição ao sdRNA é realizada duas, três, quatro ou cinco vezes pela adição de sdRNA fresco aos meios. Outros processos adequados são descritos, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente nº US 2011/0039914 A1, US 2013/0131141 A1 e US 2013/0131142 A1 e Patente nº US 9.080.171, cujas divulgações são incorporadas a título de referência neste documento.

[00994] Em algumas modalidades, o sdRNA é inserido em uma população de TILs durante a fabricação. 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 cAMP (PKA), BAFF BR3, CISH e/ou CBLB. Em algumas modalidades, a redução na expressão é determinada com base em uma porcentagem de silenciamento do gene, por exemplo, conforme avaliado por citometria de fluxo e/ou qPCR. Em algumas modalidades, há uma diminuição na expressão de cerca de 5%, de cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 80%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos

cerca de 85%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 90%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 95%. Em algumas modalidades, há uma redução na expressão de pelo menos cerca de 99%.

[00995] A tecnologia de autoentrega de RNAi com base na modificação química de siRNAs pode ser empregada com os métodos da presente invenção para entregar com sucesso os sdRNAs aos TILs como aqui descrito. A combinação de modificações de estrutura principal com estrutura de siRNA assimétrica e um ligante hidrofóbico (consultor, por exemplo, Ligtenberg, *et al.*, *Mol. Therapy,* **2018** e US20160304873) permite que os sdRNAs penetrem em células de mamíferos cultivadas sem formulações e métodos adicionais por simples adição aos meios de cultura, capitalizando sobre a estabilidade da nuclease de sdRNAs. Essa estabilidade permite o suporte de níveis constantes de redução mediada por RNAi da atividade do gene alvo simplesmente mantendo-se a concentração ativa de sdRNA nos meios. Embora não seja limitado pela teoria, a estabilização da estrutura principal do sdRNA fornece redução prolongada nos efeitos da expressão do gene que podem durar meses em células que não se dividem.

[00996] Em algumas modalidades, ocorre mais de 95% de eficiência de transfecção de TILs e uma redução na expressão do alvo por vários sdRNA específicos. Em algumas modalidades, os sdRNAs contendo vários 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, uma redução no efeito de expressão é mantida por 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou 8 dias ou mais. Em algumas modalidades, a redução no efeito de expressão diminui em 10 dias ou mais após o tratamento de sdRNA dos TILs. Em algumas modalidades, mais de 70% de redução na expressão da expressão alvo é mantida. Em algumas modalidades, mais de 70% de redução na expressão da

expressão alvo é mantida TILs. Em algumas modalidades, uma redução na expressão na via PD-1/PD-L1 permite que os TILs exibam um efeito *in vivo* mais potente, que é em algumas modalidades, devido à prevenção dos efeitos supressores 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 TIL.

[00997] O RNA interferente pequeno (siRNA), às vezes conhecido como RNA interferente curto ou RNA silenciador, é uma molécula de RNA de fita dupla, geralmente com 19-25 pares de bases de comprimento. O siRNA é utilizado em RNA de interferência (RNAi), em que o mesmo interfere na expressão de genes específicos com sequências de nucleotídeos complementares.

[00998] O DNA de fita dupla (dsRNA) pode ser geralmente usado para definir qualquer molécula que compreende um par de fitas complementares de RNA, geralmente fitas sense (passageiro) e antisense (guia), e pode incluir regiões salientes de fita simples. O termo dsRNA, em contrapartida a siRNA, se refere, em geral, a uma molécula precursora que inclui a sequência de uma molécula de siRNA que é liberada da molécula de dsRNA maior pela ação de sistemas enzimáticos de clivagem, incluindo Dicer.

[00999] sdRNA (RNA de autoentrega) é uma nova classe de compostos de RNAi covalentemente modificados que não exigem um veículo de entrega para entrar nas células e têm farmacologia melhorada em comparação com siRNAs tradicionais. "RNA de autoentrega" ou "sdRNA" é um híbrido antisense de interferência de RNA hidrofobicamente modificado, que demonstrou ser altamente eficaz *in vitro* em células primárias e *in vivo* mediante administração local. Foi demonstrada uma absorção robusta e/ou silenciamento sem toxicidade. Os sdRNAs são geralmente moléculas de ácido nucleico quimicamente modificadas assimétricas com regiões de fita dupla mínimas. As moléculas de sdRNA normalmente contêm regiões de fita

simples e regiões de fita dupla e podem conter uma variedade de modificações químicas nas regiões de fita simples e dupla da molécula. Além disso, as moléculas de sdRNA podem ser ligadas a um conjugado hidrofóbico, como uma molécula convencional e avançada do tipo esterol, conforme descrito neste documento. sdRNAs e métodos associados para fazer tais sdRNAs também foram descritos extensivamente nos documentos, por exemplo, US20160304873, WO2010033246, WO2017070151, WO2009102427, WO2011119887, WO2010033247A2, WO2009045457, WO2011119852, todos os quais são incorporados no presente documento a título de referência. Para otimizar a estrutura de sdRNA, química, posição de direcionamento, preferências de sequência e semelhantes, um algoritmo proprietário foi desenvolvido e utilizado para previsão de potência de sdRNA (consultar, por exemplo, o documento US 20160304873). Com base nessas análises, as sequências de sdRNA funcionais foram geralmente definidas como tendo mais de 70% de redução na expressão em concentração de 1 μM, com uma probabilidade de mais de 40%.

[001000] Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução de 70% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução de 75% na expressão do gene alvo.

[001001] Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução de 80% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução de 85% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução de 90% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma redução de 95% na expressão do gene alvo. Em algumas modalidades, as sequências de sdRNA usadas na invenção exibem uma 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 de cerca de 0,25 μM a cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 de cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 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 cerca de 4,0 μM.

[001002] Em algumas modalidades, os agentes oligonucleotídicos compreendem uma ou mais modificações para aumentar a estabilidade e/ou eficácia do agente terapêutico e para efetuar a entrega eficiente do oligonucleotídeo às células ou tecido a ser tratado. Essas modificações podem incluir uma modificação 2'-O-metil, uma modificação 2’-O-Fluor, uma modificação difosforotioato, nucleotídeo modificado 2 'F, a2'-O-metil modificado e/ou um nucleotídeo 2'desoxi. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é modificado para incluir uma ou mais modificações hidrofóbicas incluindo, por exemplo, esterol, colesterol, vitamina D, naftil, isobutil, benzil, indol, triptofano e/ou fenil. Em uma modalidade particular adicional, os nucleotídeos quimicamente modificados são combinações de fosforotioatos, 2'-O-metil, 2'desoxi, modificações hidrofóbicas e fosforotioatos. Em algumas modalidades, os açúcares podem ser modificados e os açúcares modificados podem incluir, porém sem limitação, D-ribose, 2'-O-alquil (incluindo 2'-O-metil e 2'-0-etil), ou seja, 2'-alcoxi, 2'-amino, 2'-S-alquil, 2'-halo (incluindo 2'-fluoro), T-metoxietoxi, 2'-aliloxi (-$OCH_2CH=CH_2$), 2'-propargil, 2'-propil, etinil, etenil, propenil e ciano e

semelhantes. Em uma modalidade, a porção química de açúcar pode ser uma hexose e incorporada em um oligonucleotídeo conforme descrito (Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18: 4711 (1992)).

[001003] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo de fita dupla da invenção é de fita dupla ao longo de todo o seu comprimento, isto é, sem nenhuma sequência de fita simples saliente em nenhuma das extremidades da molécula, isto é, tem extremidades cegas. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico individuais podem ter comprimentos diferentes. Em outras palavras, um oligonucleótido de cadeia dupla do invento não é de cadeia dupla ao longo de todo o seu comprimento. Por exemplo, quando duas moléculas de ácido nucleico separadas são usadas, uma das moléculas, por exemplo, a primeira molécula compreendendo uma sequência antisense, pode ser mais longa do que a segunda molécula que hibridiza com a mesma (deixando uma porção da molécula de fita simples). Em algumas modalidades, quando uma única molécula de ácido nucleico é usada, uma porção da molécula em cada extremidade pode permanecer de fita simples.

[001004] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de fita dupla da invenção contém incompatibilidades e/ou loops ou protuberâncias, mas é de fita dupla em pelo menos cerca de 70% do comprimento do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de fita dupla da invenção é de fita dupla em pelo menos cerca de 80% do comprimento do oligonucleotídeo. Em outra modalidade, um oligonucleotídeo de fita dupla da invenção é de fita dupla ao longo de pelo menos cerca de 90%-95% do comprimento do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de fita dupla da invenção é de fita dupla ao longo de pelo menos cerca de 96%-98% do comprimento do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo de fita dupla da invenção contém pelo menos ou até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 incompatibilidades.

[001005] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo pode ser substancialmente protegido de nucleases, por exemplo, modificando-se as ligações 3’ ou 5' (por exemplo, Patentes nos US 5.849.902 e WO 98/13526). Por exemplo, os oligonucleotídeos podem ser tornados resistentes pela inclusão de um "grupo de bloqueio". O termo "grupo de bloqueio", tal como aqui utilizado, se refere a substituintes (por exemplo, diferentes dos grupos OH) que podem ser ligados a oligonucleotídeos ou nucleomonômeros, como grupos de proteção ou grupos de acoplamento para síntese (por exemplo, FITC, propil (CH_2-CH_2-CH_3), glicol (-0-CH_2-CH_2-O-) fosfato ($PO_3^{2"}$), hidrogenofosfonato ou fosforamidita). "Grupos de bloqueio" também podem incluir "grupos de bloqueio de extremidade" ou "grupos de bloqueio de exonuclease" que protegem os terminais 5’ e 3' do oligonucleotídeo, incluindo nucleotídeos modificados e estruturas não nucleotídicas resistentes à exonuclease.

[001006] Em algumas modalidades, pelo menos uma porção dos polinucleotídeos contíguos dentro do sdRNA são ligados por uma ligação substituta, por exemplo, uma ligação fosforotioato.

[001007] Em algumas modalidades, a modificação química pode levar a pelo menos 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 melhoramentos 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 contém 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.

[001008] Em algumas modalidades, o sdRNA ou sd-rxRNAs exibem liberação endossômica aprimorada de moléculas de sd-rxRNA por meio da incorporação de aminas protonáveis. Em algumas modalidades, as aminas protonáveis são incorporadas na fita sense (na parte da molécula que é descartada após o carregamento de RISC). Em algumas modalidades, os compostos de sdRNA da invenção compreendem um composto assimétrico compreendendo uma região duplex (necessária para entrada RISC eficiente de 10-15 bases de comprimento) e região de fita simples de 4-12 nucleotídeos de comprimento; com um duplex de 13 nucleotídeos. Em algumas modalidades, uma região de fita simples de 6 nucleotídeos é empregada. Em algumas modalidades, a região de fita simples do sdRNA compreende 2-12 ligações de intemucleotídeo fosforotioato (referidas como modificações de fosforotioato). Em algumas modalidades, ligações intemucleotídicas de 6-8 fosforotioato são empregadas. Em algumas modalidades, os compostos de sdRNA da invenção também incluem um padrão de modificação química único, que fornece estabilidade e é compatível com a entrada de RISC.

[001009] A fita guia, por exemplo, também pode ser modificada por qualquer modificação química que confirme a estabilidade sem interferir com a entrada de RISC. Em algumas modalidades, o padrão de modificação química na fita guia inclui a maioria dos nucleotídeos C e U sendo modificados em 2’ F e a extremidade 5' sendo fosforilada.

[001010] 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.

[001011] Em algumas modalidades, as moléculas de sdRNA têm regiões mínimas de fita dupla. Em algumas modalidades, a região da molécula que é de fita dupla varia de 8-15 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região da molécula que é de fita dupla tem 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região de fita dupla tem 13 nucleotídeos de comprimento. Pode haver 100% de complementaridade entre as fitas guia e passageira, ou pode haver uma ou mais incompatibilidades entre as fitas guia e passageira. Em algumas modalidades, em uma extremidade da molécula de fita dupla, a molécula é de extremidade cega ou tem uma saliência de um nucleotídeo. A região de fita simples da molécula tem, em algumas modalidades, entre 4-12 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região de fita simples pode ter 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região de fita simples também pode ter menos de 4 ou mais de 12 nucleotídeos de comprimento. Em certas modalidades, a região de fita simples tem 6 ou 7 nucleotídeos de comprimento.

[001012] Em algumas modalidades, as moléculas de sdRNA aumentaram a estabilidade. Em alguns casos, uma molécula de sdRNA ou sd-rxRNA quimicamente modificada tem uma meia-vida no meio que é 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 uma meia-vida no meio que é superior a 12 horas.

[001013] Em algumas modalidades, o sdRNA é otimizado para maior potência e/ou toxicidade reduzida. Em algumas modalidades, o comprimento de nucleotídeo da fita guia e/ou passageira e/ou o número de modificações de fosforotioato na fita guia e/ou passageira podem, em alguns aspectos,

influenciar a potência da molécula de RNA, ao substituir modificações em 2'-fluoro (2'F) por modificações em 2'-0-metil (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 reduz a toxicidade da molécula. Em algumas modalidades, o número de modificações de 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 em 2'F e ainda são caracterizados por igual eficácia na captação celular e penetração no tecido.

[001014] Em algumas modalidades, uma fita guia tem aproximadamente 18-19 nucleotídeos de comprimento e tem aproximadamente 2-14 modificações de 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 com fosfato. A fita guia pode conter uma ou mais modificações que conferem maior estabilidade sem interferir na entrada de RISC. Os nucleotídeos modificados com fosfato, tais como nucleotídeos modificados com fosforotioato, podem estar na extremidade 3', extremidade 5' ou espalhados ao longo da fita guia. Em algumas modalidades, os 10 nucleotídeos do terminal 3’ da fita guia contêm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos modificados com fosforotioato. A fita guia também pode conter modificações 2'F e/ou 2'OMe, que podem estar localizadas em 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. Os nucleotídeos C e U dentro da fita guia podem ser modificados em 2'F. Por exemplo, os nucleotídeos C e U nas posições 2-10 de uma fita guia de 19 nt (ou posições correspondentes em uma fita guia de um comprimento diferente) podem ser modificados em 2'F. Os nucleotídeos C e U dentro da fita guia também podem ser modificados em 2'OMe. Por exemplo, os nucleotídeos C e

U nas posições 11-18 de uma fita guia 19 nt (ou posições correspondentes em uma fita guia de um comprimento diferente) podem ser modificados em 2'OMe. Em algumas modalidades, o nucleotídeo na extremidade 3’ da fita guia não é modificado. Em certas modalidades, a maioria dos Cs e Us dentro da fita-guia são modificados em 2'F e a extremidade 5’ da fita-guia é fosforilada. Em outras modalidades, a posição 1 e o Cs ou Us nas posições 11-18 são modificados em 2'OMe e a extremidade 5’ da fita guia é fosforilada. Em outras modalidades, a posição 1 e o Cs ou Us nas posições 11-18 são modificados em 2'OMe, a extremidade 5’ da fita guia é fosforilada e os Cs ou Us na posição 2-10 são modificados em 2'F.

[001015] A tecnologia de autoentrega de RNAi fornece um método de transfecção direta de células com o agente de RNAi, sem a necessidade de formulações ou técnicas adicionais. A capacidade de transfectar linhas celulares difíceis de transfectar, alta atividade *in vivo* e simplicidade de uso são características das composições e métodos que apresentam vantagens funcionais significativas sobre as técnicas tradicionais baseadas em siRNA e, como tal, os métodos de sdRNA são empregados em várias modalidades relacionadas com os métodos de redução da expressão do gene alvo nos TILs da presente invenção. Os métodos sdRNAi permitem a entrega direta de compostos sintetizados quimicamente a uma ampla gama de células e tecidos primários, tanto *ex-vivo* quanto *in vivo*. Os sdRNAs descritos em algumas modalidades da invenção neste documento estão disponíveis comercialmente junto à Advirna LLC, Worcester, MA, USA.

[001016] Os sdRNA são formados como estruturas híbridas de oligonucleotídeo antisense de siRNA modificados hidrofobicamente e são divulgados, por exemplo, em Byrne et al., Dezembro de 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29 (10): 855-864, incorporado no presente documento a título de referência na sua totalidade.

[001017] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de sdRNA

podem ser entregues aos TILs aqui descritos usando eletroporação estéril. Em certas modalidades, o método compreende eletroporação estéril de uma população de TILs para entregar oligonucleotídeos de sdRNA.

[001018] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos podem ser entregues às células em combinação com um sistema de entrega transmembrana. Em algumas modalidades, este sistema de distribuição transmembrana compreende lipídios, vetores virais e semelhantes. Em algumas modalidades, o agente oligonucleotídeo é um agente de autoentrega de RNAi, que não exige nenhum agente de entrega. Em certas modalidades, o método compreende o uso de um sistema de entrega transmembrana para entregar oligonucleotídeos de sdRNA a uma população de TILs.

[001019] Os oligonucleotídeos e as composições de oligonucleotídeos são colocados em contato com (por exemplo, "colocados em contato com" também é referido aqui como "administrado" ou "entregue a") e absorvidos pelos TILs aqui descritos, incluindo através da absorção passiva pelos TILs. O sdRNA pode ser adicionado aos TILs conforme descrito neste documento durante a primeira expansão, por exemplo, Etapa B, após a primeira expansão, por exemplo, durante a Etapa C, antes de ou durante a segunda expansão, por exemplo, antes de ou durante a Etapa D, após a Etapa D e antes da colheita na Etapa E, durante ou após a colheita na Etapa F, antes de ou durante a formulação final e/ou transferência para o Saco de infusão na Etapa F, bem como antes de qualquer etapa de criopreservação opcional na Etapa F. Ademais, o sdRNA pode ser adicionado após descongelamento de qualquer etapa de criopreservação na Etapa F. Em uma modalidade, um ou mais genes de direcionamento de sdRNAs conforme descrito neste documento, incluindo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB, podem ser adicionados a meios de cultura de células compreendendo TILs e outros agentes em concentrações selecionadas do 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 genes de direcionamento de sdRNAs aqui descritos, incluindo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB, podem ser adicionados a meios de cultura de células compreendendo TILs e outros agentes em quantidades selecionadas do grupo consistindo em 0,1 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio, 0,5 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio, 0,75 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio, 1 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio, 1,25 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio, 1,5 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio, 2 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio, 5 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio ou 10 μM de sdRNA/10000 TILs/100 μl de meio. Em uma modalidade, um ou mais genes de direcionamento de sdRNAs conforme descrito neste documento, incluindo PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB, podem ser adicionados a culturas TIL durante os estágios pré-REP ou REP duas vezes ao dia, uma vez por 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.

[001020] As composições de oligonucleotídeos da invenção, incluindo sdRNA, podem ser postas em contato com TILs conforme descrito neste documento durante o processo de expansão, por exemplo dissolvendo-se sdRNA em altas concentrações em meios de cultura de células e permitindo tempo suficiente para a absorção passiva ocorrer. Em certas modalidades, o método da presente invenção compreende o contato de uma população de TILs com uma composição de oligonucleotídeo como aqui descrito. Em certas modalidades, o método compreende a dissolução de um oligonucleotídeo, por exemplo, sdRNA em um meio de cultura de células e o contato do meio de cultura de células com uma população de TILs. Os TILs podem ser uma primeira população, uma segunda população e/ou uma terceira população, conforme descrito neste documento.

[001021] Em algumas modalidades, a entrega de oligonucleotídeos nas células pode ser aumentada por métodos adequados reconhecidos na técnica, incluindo fosfato de cálcio, DMSO, glicerol ou dextrano, eletroporação ou por

transfecção, por exemplo, usando composições lipídicas catiônicas, aniônicas ou neutras ou lipossomas usando métodos conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, os documentos WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; Patente nº US 4.897.355; Bergan et a 1993. Nucleic acids research. 21: 3567).

[001022] Em algumas modalidades, mais de um sdRNA é usado para reduzir a expressão de um gene alvo. Em algumas modalidades, um ou mais dentre PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 e/ou sdRNAs direcionados a CISH são usados juntos. Em algumas modalidades, um sdRNA PD-1 é usado com um ou mais dentre TIM-3, CBLB, LAG3 e/ou CISH a fim de reduzir a expressão de mais de um gene alvo. Em algumas modalidades, um sdRNA de LAG3 é usado em combinação com um sdRNA de direcionamento 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 neste documento estão disponíveis comercialmente junto à Advirna LLC, Worcester, MA, USA.

[001023] Em algumas modalidades, o sdRNA tem como alvo um gene selecionado do grupo que consiste em PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o sdRNA tem como alvo um gene selecionado do 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 tem como alvo PD-1 e outro sdRNA tem como alvo um gene selecionado do grupo que consiste em LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o sdRNA tem como alvo um gene selecionado dentre PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o sdRNA tem como alvo um gene selecionado dentre PD-1 e um de LAG3, CISH, CBLB, TIM3 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo PD-1 e

um sdRNA tem como alvo LAG3. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo PD-1 e um sdRNA tem como alvo CISH. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo PD-1 e um sdRNA tem como alvo CBLB. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo LAG3 e um sdRNA tem como alvo CISH. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo LAG3 e um sdRNA tem como alvo CBLB. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo CISH e um sdRNA tem como alvo CBLB. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo TIM3 e um sdRNA tem como alvo PD-1. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo TIM3 e um sdRNA tem como alvo LAG3. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo TIM3 e um sdRNA tem como alvo CISH. Em algumas modalidades, um sdRNA tem como alvo TIM3 e um sdRNA tem como alvo CBLB.

[001024] Conforme discutido acima, as modalidades da presente invenção fornecem linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que foram geneticamente modificados por meio de edição de genes para aumentar seu efeito terapêutico. As modalidades da presente invenção abrangem a edição genética por meio da inserção de nucleotídeos (RNA ou DNA) em uma população de TILs para promoção da expressão de uma ou mais proteínas e inibição da expressão de uma ou mais proteínas, bem como suas combinações. As modalidades da presente invenção também fornecem métodos para expandir TILs em uma população terapêutica, em que os métodos compreendem a edição de genes dos TILs. Existem várias tecnologias de edição de genes que podem ser usadas para modificar geneticamente uma população de TILs, que são adequadas para uso de acordo com a presente invenção.

[001025] Em algumas modalidades, o método compreende um método de modificar geneticamente uma população de TILs que inclui a etapa de incorporação estável de genes para a produção de uma ou mais proteínas. Em

uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução lentiviral. Os sistemas de transdução lentiviral são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, 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 nº US 6.627.442, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral gama. Os sistemas de transdução gamaretroviral são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, Cepko e Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* **1996,** 9.9.1-9.9.16, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transferência de gene mediada por transposon. Os sistemas de transferência de genes mediados por transposons são conhecidos na técnica e incluem sistemas em que a transposase é fornecida como um vetor de expressão de DNA ou como um RNA expressável ou uma proteína de modo que a expressão de longo prazo da transposase não ocorra nas células transgênicas, por exemplo, uma transposase fornecida como um mRNA (por exemplo, um mRNA compreendendo uma capa e uma cauda poli-A). Sistemas adequados de transferência de gene mediada por transposon, incluindo a transposase semelhante a Tel do tipo salmonídeo (SB ou Sleeping Beauty transposase), como SB10, SB11 e SB100x, e enzimas modificadas com atividade enzimática aumentada, são descritos em, por exemplo, Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* **2010,** *18,* 674-83 e Patente nº US 6.489.458, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência.

[001026] Em uma modalidade, o método compreende um método para

modificar geneticamente uma população de TILs, por exemplo uma primeira população, uma segunda população e/ou uma terceira população, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade, um método de modificação genética de uma população de TILs inclui a etapa de incorporação estável de genes para produção ou inibição (por exemplo, silenciamento) de uma ou mais proteínas. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de eletroporação. Os métodos de eletroporação são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Tsong, *Biophys. J.* **1991,** *60,* 297-306 e Publicação do Pedido de Patente nº US 2014/0227237 A1, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência. Outros métodos de eletroporação conhecidos na técnica, tais como aqueles descritos nas Patentes nºs US 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, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de 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 que compreende as etapas de tratamento de TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicação de uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos CC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, tendo intensidades de campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que a sequência de pelo menos três pulsos elétricos CC tem uma, dias ou três das seguintes características: (1) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem uns dos outros na amplitude do pulso; (2) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na largura de pulso; e (3) um primeiro intervalo de pulso para um

primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente de um segundo intervalo de pulso para um segundo conjunto de dois dos pelo menos três pulsos. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada que compreende as etapas de tratamento de TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicação de uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos CC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com intensidades de campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na amplitude do pulso. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada que compreende as etapas de tratamento de TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicação de uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos CC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com intensidades de campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem entre si na largura de pulso. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada que compreende as etapas de tratamento de TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicação de uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos CC únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, com intensidades de campo iguais ou superiores a 100 V/cm, aos TILs, em que um primeiro intervalo de pulso para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente de um segundo intervalo de pulso para um segundo conjunto de dois dos pelo menos três pulsos. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de

eletroporação pulsado que compreende as etapas de tratamento de TILs com campos elétricos pulsados para induzir a formação de poros nos TILs, compreendendo a etapa de aplicação de uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos CC, tendo intensidades de campo iguais a ou superior a 100 V/cm, a TILs, em que a sequência de pelo menos três pulsos elétricos CC tem uma, duas ou três das seguintes características: (1) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro em amplitude de pulso; (2) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na largura de pulso; e (3) um primeiro intervalo de pulso para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente de um segundo intervalo de pulso para um segundo conjunto de dois dos pelo menos três pulsos, de modo que os poros induzidos são sustentados por um período relativamente longo período de tempo, e de forma que a viabilidade dos TILs seja mantida. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção de fosfato de cálcio. Os métodos de transfecção com fosfato de cálcio (precipitação de DNA com fosfato de cálcio, revestimento da superfície celular e endocitose) são conhecidos na técnica e são descritos em Graham e van der Eb, *Virology* **1973,** *52,* 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979,** *76,* 1373-1376; e Chen e Okayarea, *Mol. Célula. Biol.* **1987,** *7,* 2745-2752; e na Patente nº US 5.593.875, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção lipossomal. Métodos de transfecção lipossomal, tais como métodos que empregam uma formulação de lipossoma 1:1 (p/p) do lipídio catiônico cloreto de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*n*,*n*,*n*-trimetilamônio (DOTMA) e dioleoilfofotidiletanolamina (DOPE) em água filtrada, são conhecidos na técnica e são descritos em Rose, *et al.*, *Biotechniques* **1991,** *10,* 520-525 e Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, **1987,** *84,* 7413-7417 e nas

Patentes nos US 5.279.833; 5.908.635; 6.056.938; 6.110.490; 6.534.484; e 7.687.070, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um método para modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção usando métodos descritos nas Patentes nos US 5.766.902; 6.025.337; 6.410.517; 6.475.994; e 7.189.705; cujas divulgações são incorporadas neste documento a título de referência. Os TILs podem ser uma primeira população, uma segunda população e/ou uma terceira população de TILs conforme descrito neste documento.

[001027] De acordo com uma modalidade, o processo de edição de genes pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma quebra de fita dupla ou de fita simples em um ou mais genes de ponto de verificação imunológico. Essas nucleases programáveis permitem a edição precisa do genoma introduzindo-se quebras em loci genômicos específicos, ou seja, as mesmas contam com o reconhecimento de uma sequência de DNA específica dentro do genoma para direcionar um domínio de nuclease para esse local e mediar a geração de uma quebra de fita dupla na sequência alvo. Uma quebra de fita dupla no DNA subsequentemente recruta maquinário de reparo endógeno para o local de quebra para mediar a edição do genoma por junção de extremidade não homóloga (NHEJ) ou reparo direcionado por homologia (HDR). Assim, o reparo da quebra pode resultar na introdução de mutações de inserção/exclusão que interrompem (por exemplo, silenciam, reprimem ou aumentam) o produto do gene alvo.

[001028] As principais classes de nucleases que foram desenvolvidas para permitir a edição genômica específica do local incluem nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e nucleases associadas a CRISPR (por exemplo, CRISPR/Cas9). Esses sistemas de nuclease podem ser amplamente classificados em duas categorias com base em seu modo de reconhecimento de DNA: ZFNs e

TALENs alcançam ligação de DNA específica por meio de interações proteína-DNA, enquanto sistemas CRISPR, como Cas9, são direcionados para sequências de DNA específicas por um guia curto de RNA molécula que forma pares de bases diretamente com o DNA alvo e por interações proteína-DNA. Consultar, por exemplo, Cox *et al.*, *Nature Medicine,* 2015, vol. 21, nº 2.

[001029] Exemplos não limitativos de métodos de edição de genes que podem ser usados de acordo com métodos de expansão de TIL da presente invenção incluem métodos CRISPR, métodos TALE e métodos ZFN, que são descritos em mais detalhes abaixo. De acordo com uma modalidade, um método para expandir TILs em uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, processo GEN 3) ou conforme descrito nos documentos PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605, ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição de genes de pelo menos uma porção dos TILs por um ou mais de um método CRISPR, um método TALE ou um método ZFN, a fim de gerar TILs que podem fornecer um efeito terapêutico. De acordo com uma modalidade, os TILs editados por genes podem ser avaliados para um efeito terapêutico melhorado comparando-os com os TILs não modificados *in vitro*, por exemplo, avaliando a função efetora *in vitro*, perfis de citocinas, etc. em comparação com 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.

[001030] Em algumas modalidades da presente invenção, a eletroporação é usada para a entrega de um sistema de edição de gene, como sistemas CRISPR, TALEN e ZFN. Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação é um sistema de eletroporação de fluxo. Um exemplo de um sistema de eletroporação de fluxo adequado para uso com algumas modalidades da presente invenção é o sistema MaxCyte STX

disponível comercialmente. Existem vários instrumentos alternativos de eletroporação disponíveis comercialmente que podem ser adequados para uso com a presente invenção, tais como o sistema AgilePulse ou ECM 830 disponível junto à 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 e estéril com o restante do método de expansão TIL. Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação é um sistema de eletroporação pulsado como aqui descrito e forma um sistema fechado estéril com o restante do método de expansão TIL.

[001031] Um método para expandir TILs em uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, processo GEN 3) ou conforme descrito nos documentos PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição de genes pelo menos uma porção dos TILs por um método CRISPR (por exemplo, CRISPR/Cas9 ou CRISPR/Cpf1). De acordo com modalidades particulares, o uso de um método CRISPR durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes de ponto de controle imunológico seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método CRISPR durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes de ponto de verificação imunológico seja aumentada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[001032] CRISPR significa “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”. Um método de uso de um sistema CRISPR para edição de genes também é referido aqui como um 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.

[001033] A tecnologia CRISPR foi adaptada dos mecanismos naturais de defesa de bactérias e arqueias (o domínio dos microrganismos unicelulares). Esses organismos usam RNA derivado de CRISPR e várias proteínas Cas, incluindo Cas9, para impedir ataques de vírus e outros corpos estranhos cortando-se e destruindo-se o DNA de um invasor estranho. Uma CRISPR é uma região especializada do DNA com duas características distintas: a presença de repetições de nucleotídeos e espaçadores. Sequências repetidas de nucleotídeos são distribuídas ao longo de 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 aos loci genômicos CRISPR e transcritos e processados em RNA CRISPR curto (crRNA). Esses crRNAs se anelam para transativar crRNAs (tracrRNAs) e direcionam a clivagem específica para a sequência e o silenciamento do DNA patogênico pelas proteínas Cas. O reconhecimento do alvo pela proteína Cas9 exige uma sequência de "semente" dentro do crRNA e uma sequência conservada do motivo adjacente do protoespaçador contendo um dinucleotídeo (PAM) a montante da região de ligação ao crRNA. O sistema CRISPR/Cas pode, assim, ser redirecionado para clivar virtualmente qualquer sequência de DNA redesenhando 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 em engenharia genética. O sistema CRISPR/Cas é diretamente portátil para células humanas por coentrega de plasmídeos que expressam a endo-nuclease Cas9 e os componentes de crRNA necessários. Diferentes variantes de proteínas Cas podem ser usadas para reduzir as limitações de direcionamento (por exemplo, ortólogos de Cas9, como Cpf1).

[001034] Exemplos não limitativos de genes que podem ser silenciados ou inibidos por TILs de edição permanente de genes por meio 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.

[001035] Exemplos não limitativos de genes que podem ser aumentados por TILs de edição permanente de genes por meio de um método CRISPR incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

[001036] Exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método CRISPR, e que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos nas Patentes nºs US 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, que são incorporados no presente documento a título de referência. Recursos para realizar métodos CRISPR, como plasmídeos para expressar CRISPR/Cas9 e CRISPR/Cpf1, estão disponíveis comercialmente junto a empresas como a GenScript.

[001037] Em uma modalidade, as modificações genéticas de populações de TILs, conforme descrito neste documento, podem ser realizadas usando o sistema CRISPR/Cpf1 conforme descrito na Patente nº US 9790490, cuja divulgação é incorporada neste documento a título de referência.

[001038] Um método para expandir TILs em uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, processo 2A) ou conforme descrito nos documentos

PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição de genes de pelo menos uma porção dos TILs por um método TALE. De acordo com modalidades particulares, o uso de um método TALE durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes de ponto de controle imunológico seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método TALE durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes de ponto de verificação imunológico seja aumentada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[001039] TALE significa proteínas "Transcription Activator-Like Effector", que incluem TALENs ("Transcription Activator-Like Effector Nucleases"). Um método de uso de um sistema TALE para edição de genes também pode ser referido aqui como um método TALE. TALEs são proteínas de ocorrência natural do gênero *Xanthomonas* de bactérias patogênicas de plantas e contêm domínios de ligação de DNA compostos por uma série de domínios de repetição de 33-35 aminoácidos, cada um reconhecendo um único par de bases. A especificidade TALE é determinada por dois aminoácidos hipervariáveis que são conhecidos como os di-resíduos variáveis de repetição (RVDs). Repetições modulares de TALE são ligadas entre si para reconhecer sequências de DNA contíguas. Um RVD específico no domínio de ligação ao DNA reconhece uma base no locus alvo, fornecendo uma característica estrutural para montar domínios de ligação ao DNA previsíveis. Os domínios de ligação ao DNA de um TALE são fundidos ao domínio catalítico de uma endonuclease FokI do tipo IIS para fazer uma nuclease TALE direcionável. Para induzir a mutação específica do local, dois braços TALEN individuais, separados por uma região espaçadora de 14-20 pares de bases, trazem os monômeros FokI em estreita proximidade para dimerizar e produzir uma quebra de fita dupla direcionada.

[001040] Vários estudos grandes e sistemáticos utilizando vários métodos de montagem indicaram que as repetições do TALE podem ser combinadas para reconhecer virtualmente qualquer sequência definida pelo usuário. Matrizes TALE projetadas sob medida também estão disponíveis comercialmente junto a Cellectis Bioresearch (Paris, França), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, EUA) e Life Technologies (Grand Island, NY, EUA). Os métodos TALE e TALEN adequados para utilização na presente invenção são descritos na Publicação do Pedido de Patente n^{os} US 2011/0201118 A1; US 2013/0117869 A1; US 2013/0315884 A1; US 2015/0203871 A1 e US 2016/0120906 A1, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência.

[001041] Exemplos não limitativos de genes que podem ser silenciados ou inibidos por TILs de edição permanente de genes por meio 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.

[001042] Exemplos não limitativos de genes que podem ser aumentados por TILs de edição permanente de genes por meio de um método TALE incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

[001043] Exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método TALE, e que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos na Patente nº US 8.586.526, que é incorporada a título de referência no presente documento.

[001044] Um método para expandir TILs em uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, processo GEN 3) ou conforme descrito nos documentos PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende ainda a edição de genes de pelo menos uma porção dos TILs por um método de dedo de zinco ou de nuclease de dedo de zinco. De acordo com modalidades particulares, o uso de um método de dedo de zinco durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes de ponto de controle imunológico seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método de dedo de zinco durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes de ponto de verificação imunológico seja aumentada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[001045] Um dedo de zinco individual contém aproximadamente 30 aminoácidos em uma configuração ββα conservada. Vários aminoácidos na superfície da hélice α normalmente entram em contato com 3 pb no sulco principal do DNA, com níveis variados de seletividade. Os dedos de zinco têm dois domínios de proteína. O primeiro domínio é o domínio de ligação ao DNA, que inclui fatores de transcrição eucarióticos e contém o dedo de zinco. O segundo domínio é o domínio da nuclease, que inclui a enzima de restrição FokI e é responsável pela clivagem catalítica do DNA.

[001046] Os domínios de ligação de DNA de ZFNs individuais normalmente contêm entre três e seis repetições de dedo de zinco individuais e podem, cada uma, reconhecer entre 9 e 18 pares de bases. Se os domínios de dedo de zinco forem específicos para o local de destino pretendido, mesmo um par de ZFNs de 3 dedos que reconhecem um total de 18 pares de bases pode, em teoria, ter como alvo um único locus em um genoma de mamífero. Um método para gerar novas matrizes de dedos de zinco é combinar

"módulos" menores de dedos de zinco de especificidade conhecida. O processo de montagem modular mais comum envolve a combinação de três dedos de zinco separados que podem cada um reconhecer uma sequência de DNA de 3 pares de bases para gerar uma matriz de 3 dedos que pode reconhecer um local alvo de 9 pares de bases. Alternativamente, abordagens baseadas em seleção, como engenharia de pool oligomerizada (OPEN) podem ser usadas para selecionar novas matrizes de dedo de zinco de bibliotecas aleatórias que levam em consideração as interações dependentes do contexto entre dedos vizinhos. Dedos de zinco projetados estão disponíveis comercialmente; A Sangamo Biosciences (Richmond, CA, EUA) desenvolveu uma plataforma própria (CompoZr®) para construção de dedos de zinco em parceria com a Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

[001047] Exemplos não limitativos de genes que podem ser silenciados ou inibidos por TILs de edição permanente de genes por meio de um método de dedo de zinco 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.

[001048] Exemplos não limitativos de genes que podem ser aumentados por TILs de edição permanente de genes por meio de um método de dedo de zinco incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL12, IL-15 e IL-21.

[001049] Exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método de dedo de zinco, que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos nas Patentes n^{os} US 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, que são incorporados neste documento a título de referência.

[001050] Outros exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método de dedo de zinco, que podem ser usados de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos em Beane, *et al.*, *Mol. Therapy*, **2015,** 23 1380-1390, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência.

[001051] Em algumas modalidades, os TILs são opcionalmente geneticamente modificados para incluir funcionalidades adicionais, incluindo, porém sem limitação, um receptor de células T de alta afinidade (TCR), por exemplo, um TCR direcionado a um antígeno associado a tumor, como MAGE-1, HER2, ou NY-ESO-1, ou um receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a uma molécula de superfície celular associada a tumor (por exemplo, mesotelina) ou molécula de superfície celular restrita por linhagem (por exemplo, CD19). Em certas modalidades, o método compreende a engenharia genética de uma população de TILs para incluir um receptor de células T de alta afinidade (TCR), por exemplo, um TCR direcionado a um antígeno associado a tumor, como MAGE-1, HER2 ou NY-ESO-1, ou um receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a uma molécula de superfície celular associada a tumor (por exemplo, mesotelina) ou molécula de superfície celular restrita por linhagem (por exemplo, CD19). Apropriadamente, a população de TILs pode ser uma primeira população, uma segunda população e/ou uma terceira população, conforme descrito neste documento.

K. SISTEMAS FECHADOS PARA FABRICAÇÃO DE TIL

[001052] A presente invenção fornece o uso de sistemas fechados durante o processo de cultura TIL. Esses sistemas fechados permitem a prevenção e/ou redução da contaminação microbiana, permitem o uso de

menos frascos e permitem reduções de custos. Em algumas modalidades, o sistema fechado usa dois recipientees.

[001053] Esses 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.

[001054] Dispositivos de conexão estéreis (STCDs) produzem soldas estéreis entre duas peças de tubos compatíveis. Esse procedimento permite a conexão estéril de uma variedade de recipientes e diâmetros de tubo. Em algumas modalidades, os sistemas fechados incluem sistemas de luer lock e vedados a quente, conforme descrito, por exemplo, no Exemplo G. Em algumas modalidades, o sistema fechado é acessado por meio de seringas em condições estéreis, a fim de manter a esterilidade e a natureza fechada do sistema. Em algumas modalidades, um sistema fechado conforme descrito no Exemplo G é empregado. Em algumas modalidades, os TILs são formulados em um recipiente de formulação de produto final de acordo com o método descrito no Exemplo G, seção "Formulação e Preenchimento Final".

[001055] Em algumas modalidades, o sistema fechado usa um recipiente a partir do momento em que os fragmentos de tumor são obtidos até que os TILs estejam prontos para administração ao paciente ou criopreservação. 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 um saco 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 HypoThermosol. Um sistema fechado ou sistema fechado de cultura de células TIL é caracterizado pelo fato de que uma vez que a amostra de tumor e/ou fragmentos de tumor foram adicionados, o sistema é hermeticamente vedado do lado de fora para

formar um ambiente fechado livre da invasão de bactérias, fungos e/ou qualquer outra contaminação microbiana.

[001056] Em algumas modalidades, a redução da contaminação microbiana está entre cerca de 5% e cerca de 100%. Em algumas modalidades, a redução da contaminação microbiana está entre cerca de 5% e cerca de 95%. Em algumas modalidades, a redução da contaminação microbiana está entre cerca de 5% e cerca de 90%. Em algumas modalidades, a redução da contaminação microbiana está entre cerca de 10% e cerca de 90%. Em algumas modalidades, a redução da contaminação microbiana está entre cerca de 15% e cerca de 85%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou cerca de 100%.

[001057] O sistema fechado permite o crescimento de TIL na ausência e/ou com uma redução significativa da contaminação microbiana.

[001058] Além disso, o pH, a pressão parcial de dióxido de carbono e a pressão parcial de oxigênio do ambiente de cultura de células TIL variam conforme as células são cultivadas. Consequentemente, mesmo que um meio apropriado para cultura de células seja circulado, o ambiente fechado ainda precisa ser constantemente mantido como um ambiente ideal para a proliferação de TIL. Para tanto, é desejável que os fatores físicos de pH, pressão parcial de dióxido de carbono e pressão parcial de oxigênio no líquido de cultivo do ambiente fechado sejam monitorados por meio de um sensor, cujo sinal é utilizado para controlar um trocador de gases instalado na entrada do ambiente de cultura e que a pressão parcial de gás do ambiente fechado deve ser ajustada em tempo real de acordo com as mudanças no líquido de cultura de forma a otimizar o ambiente de cultura de células. Em algumas

modalidades, a presente invenção fornece um sistema fechado de cultura de células que incorpora na entrada para o ambiente fechado um trocador de gás equipado com um dispositivo de monitoramento que mede o pH, pressão parcial de dióxido de carbono e pressão parcial de oxigênio do ambiente fechado e otimiza o ambiente de cultura de células ajustando-se automaticamente as concentrações de gás com base nos sinais do dispositivo de monitoramento.

[001059] Em algumas modalidades, a pressão dentro do ambiente fechado é controlada de forma contínua ou intermitente. Ou seja, a pressão no ambiente fechado pode ser variada por meio de um dispositivo de manutenção de pressão, por exemplo, garantindo, portanto, que o espaço seja adequado para o crescimento de TILs em um estado de pressão positiva ou promovendo a exsudação de fluido em um estado de pressão negativa e promovendo assim a proliferação celular. Além disso, ao aplicar pressão negativa de forma intermitente, é possível substituir de maneira uniforme e eficiente o líquido circulante no ambiente fechado por meio de uma redução temporária do volume do ambiente fechado.

[001060] Em algumas modalidades, os componentes de cultura ideais para a proliferação dos TILs podem ser substituídos ou adicionados, e incluindo fatores como IL-2 e/ou OKT3, bem como combinações, podem ser adicionados.

L. CRIOPRESERVAÇÃO OPCIONAL DE TILS

[001061] Tanto a população em massa de TILs (por exemplo, a segunda população de TILs) ou a população expandida de TILs (por exemplo, a terceira população de TILs) pode ser opcionalmente criopreservada. Em algumas modalidades, a criopreservação ocorre na população de TIL terapêutica. Em algumas modalidades, a criopreservação ocorre nos TILs colhidos após a segunda expansão. Em algumas modalidades, a criopreservação ocorre nos TILs na Etapa F exemplificativa da Figura 1 (em

particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados na bolsa de infusão. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados antes da colocação em uma bolsa de infusão. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados e não colocados em uma bolsa de infusão. Em algumas modalidades, a criopreservação é realizada usando um meio de criopreservação. Em algumas modalidades, o meio de criopreservação contém dimetilsulfóxido (DMSO). Isso é geralmente realizado colocando a população de TIL em uma solução de congelamento, por exemplo, soro AB inativado com complemento a 85% e dimetilsulfóxido a 15% (DMSO). As células em solução são colocadas em frascos criogênicos e armazenadas por 24 horas a -80 ºC, com transferência opcional para freezers de nitrogênio gasoso para criopreservação. Consultar, Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986.

[001062] Quando apropriado, as células são removidas do congelador e descongeladas em banho-maria a 37 ºC até aproximadamente 4/5 da solução serem descongeladas. As células são geralmente ressuspensas 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.

[001063] Em uma modalidade preferencial, uma população de TILs é criopreservada usando meio de criopreservação CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). Em uma modalidade preferencial, uma população de TILs é criopreservada usando um meio de criopreservação contendo dimetilsulfóxido (DMSO). Em uma modalidade preferencial, uma população de TILs é criopreservada usando uma razão de 1:1 (vol:vol) de CS10 e meio de cultura de células. Em uma modalidade preferencial, uma população de TILs é criopreservada usando uma razão de cerca de 1:1 (vol:vol) de CS10 e meio de cultura de células, compreendendo ainda IL-2 adicional.

[001064] Conforme discutido acima, e exemplificado nas etapas A a E,

conforme fornecido na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), a criopreservação pode ocorrer em vários pontos ao longo do processo de expansão de TIL. Em algumas modalidades, a população expandida de TILs após a segunda expansão (conforme fornecido, por exemplo, de acordo com a Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) pode ser criopreservada. A criopreservação pode ser geralmente realizada colocando a população de TIL em uma solução de congelamento, por exemplo, soro AB inativado por complemento a 85% e dimetilsulfóxido a 15% (DMSO). As células em solução são colocadas em frascos criogênicos e armazenadas por 24 horas a -80 ºC, com transferência opcional para freezers de nitrogênio gasoso para criopreservação. Consultar Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados em DMSO a 5%. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados em meios de cultura de células mais DMSO a 5%. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados de acordo com os métodos fornecidos no Exemplo D.

[001065] Quando apropriado, as células são removidas do congelador e descongeladas em banho-maria a 37 ºC até aproximadamente 4/5 da solução serem descongeladas. As células são geralmente ressuspensas 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.

[001066] Em alguns casos, a população da Etapa B TIL pode ser criopreservada imediatamente, usando os protocolos discutidos abaixo. Alternativamente, a população de TIL em massa pode ser submetida à Etapa C e à Etapa D e, em seguida, criopreservada após a Etapa D. De forma similar, no caso em que TILs geneticamente modificados serão usados em terapia, as populações TIL da Etapa B ou Etapa D podem ser submetidas à modificações genéticas para tratamentos adequados.

M. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE TILS EXPANDIDOS

[001067] Em algumas modalidades, os TILs são analisados quanto à expressão de numerosos marcadores de fenótipo após a expansão, incluindo aqueles descritos neste documento 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 após a 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 após a criopreservação. Em algumas modalidades, as características fenotípicas dos TILs são analisadas após a segunda expansão de acordo com a Etapa D. Em algumas modalidades, as características fenotípicas dos TILs são analisadas após duas ou mais expansões de acordo com a Etapa D.

[001068] Em algumas modalidades, o marcador é selecionado do 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 com outros processos (por exemplo, o processo Gen 3 conforme fornecido, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), em comparação com o processo 2A conforme fornecido, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a expressão de CD8 é maior em TILs produzidos de acordo com o processo da invenção atual, em comparação com outros processos (por exemplo, o processo Gen 3, conforme fornecido, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), em comparação com o processo 2A, conforme fornecido, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na

Figura 1C). Em algumas modalidades, a expressão de CD28 é maior em TILs produzidos de acordo com o processo da invenção atual, em comparação com outros processos (por exemplo, o processo Gen 3, conforme fornecido por exemplo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), em comparação com o processo 2A, conforme fornecido, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, Figura 1A)). Em algumas modalidades, a alta expressão de CD28 é indicativa de um fenótipo TIL mais jovem e mais persistente. Em uma modalidade, a expressão de um ou mais marcadores reguladores é medida.

[001069] Em uma modalidade, nenhuma seleção da primeira população de TILs, da segunda população de TILs, da terceira população de TILs ou da população de TIL colhida com base na expressão de CD8 e/ou CD28 é realizada durante qualquer uma das etapas para o método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) aqui descritos.

[001070] Em algumas modalidades, a porcentagem de células de memória central é maior em TILs produzidos de acordo com o processo da presente invenção, em comparação com outros processos (por exemplo, o processo Gen 3, conforme fornecido por exemplo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), em comparação com o processo 2A como fornecido, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, Figura 1A)). Em algumas modalidades, o marcador de memória para células de memória central é selecionado do grupo que consiste em CCR7 e CD62L.

[001071] Em algumas modalidades, os subconjuntos de memória TIL CD4+ e/ou CD8+ podem ser divididos em diferentes subconjuntos de memória. Em algumas modalidades, os TILs CD4+ e/ou CD8+ compreendem os TILS (CD45RA+CD62L+) virgens. Em algumas modalidades, os TILs CD4+ e/ou CD8+ compreendem os TILs de memória central (CM; CD45RA-CD62L+). Em algumas modalidades, os TILs CD4+ e/ou CD8+

compreendem os TILs de memória efetora (EM; CD45RA-CD62L-). Em algumas modalidades, os TILs CD4+ e/ou CD8+ compreendem os TILs de memória efetora RA+/efetor (TEMRA/TEFF; CD45RA+CD62L+). Em algumas modalidades, há uma % maior de CD8+ em comparação com a população CD4+.

[001072] Em algumas modalidades, os TILs expressam mais um marcador selecionado do grupo que consiste em granzima B, perforina e granulisina. Em algumas modalidades, os TILs expressam granzima B. Em algumas modalidades, os TILs expressam perforina. Em algumas modalidades, os TILs expressam granulisina.

[001073] Em uma modalidade, os TILs reestimulados também podem ser avaliados quanto à liberação de citocinas, usando ensaios de liberação de citocinas. Em algumas modalidades, os 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 após a segunda etapa de expansão rápida, após a Etapa D, conforme fornecido, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a saúde de TIL 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, um ensaio de potência para a produção de IFN-γ é empregado. 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 TIL estimulado com anticorpos para CD3, CD28 e CD137/4-1BB. Os níveis de IFN-γ nos meios desses TIL estimulados podem ser determinados usando a medição da liberação de IFN-γ. Em algumas modalidades, um aumento na produção de IFN-γ na, por exemplo, Etapa D no processo Gen 3, conforme fornecido na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) de TILs em comparação com, por exemplo,

Etapa D no 2A processo conforme fornecido na Figura 1 (em particular, por exemplo, Figura 1A) 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 mais. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada uma vez. Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada em 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, métodos da Figura 1B.

[001074] Em algumas modalidades, os TILs capazes de secreção de IFN-γ pelo menos uma, duas vezes, três vezes, quatro vezes ou cinco vezes ou mais são TILs produzidos pelos métodos de expansão da presente invenção, incluindo, por exemplo, métodos da Figura 1B e/ou Figura 1C. Em algumas modalidades, os TILs capazes de pelo menos uma vez mais secreção de IFN-γ são TILs produzidos pelos métodos de expansão da presente invenção, incluindo, por exemplo, métodos da Figura 1B e/ou Figura 1C. Em algumas modalidades, os TILs capazes de pelo menos duas vezes mais secreção de IFN-γ são TILs produzidos pelos métodos de expansão da presente invenção, incluindo, por exemplo, métodos da Figura 1B e/ou Figura 1C. Em algumas modalidades, os TILs capazes de pelo menos três vezes mais secreção de IFN-γ são os TILs produzidos pelos métodos de expansão da presente invenção, incluindo, por exemplo, métodos da Figura 1B e/ou Figura 1C. Em algumas modalidades, os TILs capazes de pelo menos quatro vezes mais secreção de IFN-γ são TILs produzidos pelos métodos de expansão da

presente invenção, incluindo, por exemplo, métodos da Figura 1B e/ou Figura 1C. Em algumas modalidades, os TILs capazes de pelo menos cinco vezes mais secreção de IFN-γ são TILs produzidos pelos métodos de expansão da presente invenção, incluindo, por exemplo, métodos da Figura 1B e/ou Figura 1C.

[001075] Os diversos receptores de antígenos dos linfócitos T e B são produzidos pela recombinação somática de um número limitado, mas um grande número de segmentos gênicos. Esses segmentos gênicos: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e as aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de células T (TCRs). A presente invenção fornece 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 em comparação com TILs recém-colhidos e/ou TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método exibem um aumento na diversidade do repertório de células T em comparação com TILs recém-colhidos e/ou TILs preparados usando métodos referidos como processo 2A, conforme exemplificado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1A). Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, o aumento na diversidade é um aumento na diversidade da imunoglobulina e/ou na diversidade do receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está na imunoglobulina, está na cadeia pesada de imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está na

imunoglobulina, está na cadeia leve da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está no receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está em um dos receptores de células T selecionados do grupo que consiste em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do 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 conforme descrito neste documento (por exemplo, o processo Gen 3) mostra maior diversidade clonal em comparação com outros processos, por exemplo, o processo referido como Gen 2 com base no número de CDRs de peptídeo único dentro da amostra (consultar, por exemplo, as Figuras 12-14).

[001076] Em algumas modalidades, a ativação e exaustão de TILs podem ser determinadas examinando um ou mais marcadores. Em algumas modalidades, a ativação e exaustão podem ser determinadas usando citometria de fluxo multicolor. Em algumas modalidades, a ativação e exaustão de marcadores incluem, porém sem limitação, um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em CD3, PD-1, 2B4/CD244, CD8, CD25, BTLA, KLRG, TIM-3, CD194/CCR4, CD4, TIGIT, CD183, CD69, CD95, CD127, CD103 e/ou LAG-3). Em algumas modalidades, a ativação e exaustão de marcadores incluem, porém sem limitação, um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1, TIGIT e/ou TIM-3. Em algumas modalidades, a ativação e exaustão de marcadores incluem, porém sem limitação, um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, CD103 +/CD69 +, CD103 +/CD69-, PD-1, TIGIT e/ou TIM-3. Em algumas modalidades, os marcadores de células T (incluindo marcadores

de ativação e exaustão) podem ser determinados e/ou analisados para examinar a ativação, inibição ou função de células T. Em algumas modalidades, os marcadores de células T podem incluir, porém sem limitação, um ou mais marcadores selecionados do grupo que consiste em TIGIT, CD3, FoxP3, Tim-3, PD-1, CD103, CTLA-4, LAG-3, BTLA-4, ICOS, Ki67, CD8, CD25, CD45, CD4 e/ou CD59.

[001077] Em algumas modalidades, a caracterização fenotípica é examinada após a criopreservação.

N. MODALIDADES ADICIONAIS DE PROCESSO

[001078] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende: (a) obter uma primeira população de TILs de um tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor; (b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células que compreende IL-2 e OKT-3, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por cerca de 1 a 8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs; (c) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células que compreende IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno exógeno (APCs) para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por cerca de 1 a 10 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 obtida na etapa (c). Em algumas modalidades, a etapa de segunda expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena

em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 to 4 dias, e então (2) efetuar a transferência da segunda população de TILs da cultura de escala pequena para um segundo recipiente maior que o primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 500MCS, em que no segundo recipiente a segunda população de TILs da cultura de escala pequena é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 8 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma primeira cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma segunda cultura de escala pequena por um período de cerca de 4 a 8 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 to 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs transferidos da

cultura de escala pequena para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 8 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena em e dentre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs transferidos da cultura de escala pequena para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 5 a 7 dias.

[001079] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende: (a) obter uma primeira população de TILs de um tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor; (b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células que compreende IL-2 e OKT-3, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por cerca de 1 a 8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs; (c) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células que compreende IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno exógeno (APCs) para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por cerca de 1 a 8 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 obtida na etapa (c). Em algumas modalidades, a etapa de segunda expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 to 4 dias, e então (2) efetuar a transferência da segunda população de TILs da cultura de escala pequena para um segundo recipiente maior que o primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 500MCS, em que no segundo recipiente a segunda população de TILs da cultura de escala pequena é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 8 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma primeira cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 to 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma segunda cultura de escala pequena por um período de cerca de 4 a 6 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 to 4 dias, e então (2) efetuar a

transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs transferidos da cultura de escala pequena para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 6 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena em e dentre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs transferidos da cultura de escala pequena para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 5 dias.

[001080] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende: (a) obter uma primeira população de TILs de um tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor; (b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células que compreende IL-2 e OKT-3, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por cerca de 1 a 7 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs; (c) realizar uma segunda expansão

rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células que compreende IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno exógeno (APCs) para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por cerca de 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) colher 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 alcançar um aumento de escala da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (2) efetuar a transferência da segunda população de TILs da cultura de escala pequena para um segundo recipiente maior que o primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 500MCS, em que no segundo recipiente a segunda população de TILs da cultura de escala pequena é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma primeira cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma segunda cultura de escala pequena por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de

expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs transferidos da cultura de escala pequena para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (1) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a segunda população de TILs em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 4 dias, e então (2) efetuar a transferência e a repartição da segunda população de TILs da primeira cultura de escala pequena em e dentre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção da segunda população de TILs transferidos da cultura de escala pequena para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 5 dias.

[001081] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada colocando-se a primeira população de TILs em contato com um meio de cultura que compreende ainda células de apresentação de antígeno

(APCs) exógenas, em que o número de APCs no meio de cultura na etapa (c) é maior do que o número de APCs no meio de cultura na etapa (b).

[001082] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) o meio de cultura seja suplementado com APCs exógenos adicionais.

[001083] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 20:1.

[001084] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 10:1.

[001085] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 9:1.

[001086] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 8:1.

[001087] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda

expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 7:1.

[001088] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 6:1.

[001089] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 5:1.

[001090] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 4:1.

[001091] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 3:1.

[001092] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,9:1.

[001093] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,8:1.

[001094] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,7:1.

[001095] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,6:1.

[001096] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,5:1.

[001097] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,4:1.

[001098] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,3:1.

[001099] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,2:1.

[001100] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2,1:1.

[001101] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 1,1:1 a ou cerca de 2:1.

[001102] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a, ou cerca de, 10:1.

[001103] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a, ou cerca de, 5:1.

[001104] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 4:1.

[001105] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a, ou cerca de, 3:1.

[001106] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a, ou cerca de, 2,9:1.

[001107] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a, ou cerca de, 2,8:1.

[001108] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,7:1.

[001109] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,6:1.

[001110] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em

uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,5:1.

[001111] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,4:1.

[001112] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a, ou cerca de, 2,3:1.

[001113] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,2:1.

[001114] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) esteja em uma faixa de ou cerca de 2:1 a ou cerca de 2,1:1.

[001115] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida e o número de APCs adicionado na etapa (b) seja igual ou cerca de 2:1.

[001116] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão do número de APCs adicionado na segunda

expansão rápida para o número de APCs adicionado na etapa (b) seja igual 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.

[001117] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número de APCs adicionado na primeira expansão primária seja de ou cerca de 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 de modo que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida seja de ou cerca de $3,5 \times 10^8$, $3,6 \times 10^8$, $3,7 \times 10^8$, $3,8 \times 10^8$, $3,9 \times 10^8$, 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.

[001118] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número de APCs adicionado na primeira expansão primária esteja na faixa de ou cerca de 1×10^8 APCs a cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs, e em que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs a ou cerca de 1×10^9 APCs.

[001119] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número de APCs adicionado na primeira expansão primária esteja na faixa de ou cerca de $1,5 \times 10^8$ APCs a ou cerca de 3×10^8 APCs, e em que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de 4×10^8 APCs a ou cerca de $7,5 \times 10^8$ APCs.

[001120] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número de APCs adicionado na primeira expansão primária esteja na faixa de ou cerca de 2×10^8 APCs a ou cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs, e em que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida está na faixa de ou cerca de $4,5 \times 10^8$ APCs a ou cerca de $5,5 \times 10^8$ APCs.

[001121] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que, ou cerca de, $2,5 \times 10^8$ APCs sejam adicionadas à primeira expansão primária e, ou cerca de, 5×10^8 APCs sejam adicionadas à segunda expansão rápida.

[001122] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as células apresentadoras de antígeno sejam células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

[001123] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os múltiplos fragmentos de tumor sejam distribuídos em uma pluralidade de recipientes separados, em que em cada um dos 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 de recipientes na etapa (c) são combinadas com produzir a população de TIL colhida da etapa (d).

[001124] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os tumores múltiplos sejam distribuídos uniformemente na pluralidade de recipientes separados.

[001125] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a pluralidade de recipientes separados compreende pelo menos dois recipientes separados.

[001126] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a vinte recipientes separados.

[001127] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a quinze recipientes separados.

[001128] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a pluralidade de recipientes separados compreenda de dois a dez recipientes separados.

[001129] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a cinco recipientes separados.

[001130] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de 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.

[001131] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que para cada recipiente em que a primeira expansão de iniciação 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 produzida a partir dessa primeira população de TILs.

[001132] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que cada um dos recipientes separados compreende uma primeira área de superfície permeável a gás.

[001133] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos de tumor múltiplos sejam distribuídos em um único recipiente.

[001134] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o único recipiente compreenda uma primeira área de superfície permeável a gás.

[001135] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que na etapa (b) as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de uma camada de células a ou cerca de três camadas de células.

[001136] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 1,5 camada de células a, ou cerca de, 2,5 camadas de células.

[001137] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 2 camadas de células.

[001138] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca 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.

[001139] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 3 camadas de células a, ou cerca de, 10 camadas de células.

[001140] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 4 camadas de células a, ou cerca de, 8 camadas de células.

[001141] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas

sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[001142] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca 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.

[001143] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão de iniciação seja realizada em um primeiro recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás e na etapa (c) a segunda expansão rápida seja realizada em um segundo recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás.

[001144] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o segundo recipiente seja maior do que o primeiro.

[001145] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que na etapa (b) as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de uma camada de células a ou cerca de três camadas de células.

[001146] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 1,5 camada de células a, ou cerca de, 2,5 camadas de células.

[001147] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 2 camadas de células.

[001148] Em outra modalidade, a invenção fornece o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca 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.

[001149] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 3 camadas de células a, ou cerca de, 10 camadas de células.

[001150] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 4 camadas de células a, ou cerca de, 8 camadas de células.

[001151] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas

sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[001152] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca 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.

[001153] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão de iniciação seja realizada em um primeiro recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás e na etapa (c) a segunda expansão rápida é realizada no primeiro recipiente.

[001154] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que na etapa (b) as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de uma camada de células a ou cerca de três camadas de células.

[001155] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média

de ou cerca de 1,5 camada de células a, ou cerca de, 2,5 camadas de células.

[001156] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 2 camadas de células.

[001157] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca 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.

[001158] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 3 camadas de células a, ou cerca de, 10 camadas de células.

[001159] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 4 camadas de células a, ou cerca de, 8 camadas de células.

[001160] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 camadas de células.

[001161] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que na etapa (c) as APCs sejam colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de ou cerca 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.

[001162] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:10.

[001163] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:9.

[001164] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da

primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:8.

[001165] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:7.

[001166] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:6.

[001167] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja

realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:5.

[001168] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:4.

[001169] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:3.

[001170] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,1 a ou cerca de 1:2.

[001171] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,2 a ou cerca de 1:8.

[001172] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,3 a ou cerca de 1:7.

[001173] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,4 a ou cerca de 1:6.

[001174] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,5 a ou cerca de 1:5.

[001175] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,6 a ou cerca de 1:4.

[001176] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,7 a ou cerca de 1:3,5.

[001177] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada suplementando o meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,8 a ou cerca de 1:3.

[001178] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:1,9 a ou cerca de 1:2,5.

[001179] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) está na faixa de ou cerca de 1:2.

[001180] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira expansão primária seja realizada por meio da suplementação do meio de cultura de células da primeira população de TILs com apresentação de antígeno adicional células (APCs), em que o número de APCs adicionado na etapa (c) é maior do que o número de APCs adicionado na etapa (b), e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (b) para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa (c) é selecionado de ou cerca de 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.

[001181] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número de TILs na segunda

população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs seja igual ou próximo a 1,5:1 a ou cerca de 100:1.

[001182] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs seja igual ou próximo a 50:1.

[001183] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs seja igual ou próximo a 25:1.

[001184] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs seja igual ou próximo a 20:1.

[001185] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs seja igual ou próximo a 10:1.

[001186] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a segunda população de TILs seja pelo menos pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs.

[001187] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a segunda população de TILs seja pelo menos de ou

cerca 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 ou 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs.

[001188] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que em ou cerca de 2 dias ou em ou cerca de 3 dias após o início do segundo período na etapa (c), o meio de cultura de células seja suplementado com IL-2 adicional.

[001189] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado para compreender ainda a etapa de criopreservação da população de TIL colhida na etapa (d) usando um processo de criopreservação.

[001190] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado para compreender a realização após a etapa (d) da etapa adicional de (e) transferir a população de TIL colhida da etapa (d) para um saco de infusão que opcionalmente contém HypoThermosol.

[001191] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado para compreender a etapa de criopreservação do saco de infusão que compreende a população de TIL colhida na etapa (e) usando um processo de criopreservação.

[001192] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o processo de criopreservação seja realizado usando uma razão de 1:1 da população de TIL colhida para o meio de criopreservação.

[001193] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as células apresentadoras de antígeno sejam células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

[001194] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as PBMCs sejam irradiadas e alogênicas.

[001195] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número total de APCs adicionadas à cultura de células na etapa (b) seja $2,5 \times 10^8$.

[001196] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número total de APCs adicionadas à cultura de células na etapa (c) seja 5×10^8.

[001197] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as APCs sejam PBMCs.

[001198] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as PBMCs sejam irradiadas e alogênicas.

[001199] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as células apresentadoras de antígeno sejam células apresentadoras de antígeno artificiais.

[001200] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a colheita na etapa (d) seja realizada usando um sistema de processamento de células baseado em membrana.

[001201] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a colheita na etapa (d) seja realizada usando um sistema de processamento de células LOVO.

[001202] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 5 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001203] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 10 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001204] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 15 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001205] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 20 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001206] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam, cerca de, 25 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001207] Em outra modalidade, a invenção fornece o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 30 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001208] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 35 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001209] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 40 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001210] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam cerca de 45 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001211] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 50 a, ou cerca de, 60 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001212] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca 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 fragmentos por recipiente na etapa (b).

[001213] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 27 mm^3.

[001214] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 20 mm^3 a, ou cerca de, 50 mm^3.

[001215] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 21 mm^3 a, ou cerca de, 30 mm^3.

[001216] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 22 mm^3 a, ou cerca de, 29,5 mm^3.

[001217] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 23 mm^3 a, ou cerca de, 29 mm^3.

[001218] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 24 mm^3 a, ou cerca de, 28,5 mm^3.

[001219] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 25 mm^3 a, ou cerca de, 28 mm^3.

[001220] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que cada fragmento tenha um volume de, ou cerca de, 26,5 mm^3 a, ou cerca de, 27,5 mm^3.

[001221] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que cada fragmento tenha um volume de ou cerca de 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 mm^3.

[001222] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 30 a, ou cerca de, 60 fragmentos com um volume total de, ou cerca de, 1300 mm^3 a ou cerca de 1500 mm^3.

[001223] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que os múltiplos fragmentos compreendam de, ou cerca de, 50 fragmentos com um volume total igual a ou cerca de 1350 mm^3.

[001224] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos múltiplos compreendam de, ou cerca de, 50 fragmentos com uma massa total de, ou cerca de, 1 grama a, ou cerca de, 1,5 grama.

[001225] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o meio de cultura de células seja fornecido em um recipiente que é um recipiente G ou um saco de células Xuri.

[001226] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a concentração de IL-2 no meio de cultura de células seja de cerca de 10000 UI/ml a cerca de 5000 UI/ml.

[001227] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a concentração de IL-2 no meio de cultura de células seja de cerca de 6000 UI/ml.

[001228] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o meio de criopreservação compreenda

dimetilsulfóxido (DMSO).

[001229] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o meio de criopreservação compreenda DMSO a 7% a 10%.

[001230] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o primeiro período na etapa (b) seja realizado dentro de um período de ou cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

[001231] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o segundo período na etapa (c) seja realizado dentro de um período de ou cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias ou 11 dias.

[001232] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) sejam, cada um individualmente, realizados dentro de um período de, ou cerca de, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

[001233] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) sejam, cada um individualmente, realizados dentro de um período de, ou cerca de, 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

[001234] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) sejam, cada um individualmente, realizados dentro de um período

de, ou cerca de, 7 dias.

[001235] Em outra modalidade, a invenção fornece o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 14 dias a, ou cerca de, 18 dias.

[001236] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 15 dias a, ou cerca de, 18 dias.

[001237] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 16 dias a, ou cerca de, 18 dias.

[001238] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 17 dias a, ou cerca de, 18 dias.

[001239] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 14 dias a, ou cerca de, 17 dias.

[001240] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 15 dias a, ou cerca de, 17 dias.

[001241] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 16 dias a, ou cerca de, 17 dias.

[001242] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 14 dias a, ou cerca de, 16 dias.

[001243] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 15 dias a, ou cerca de, 16 dias.

[001244] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 14 dias.

[001245] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 15 dias.

[001246] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 16 dias.

[001247] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 17 dias.

[001248] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 18 dias.

[001249] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 14 dias ou menos.

[001250] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 15 dias ou menos.

[001251] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 16 dias ou menos.

[001252] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 17 dias ou menos.

[001253] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as etapas (a) a (d) sejam realizadas em um total de, ou cerca de, 18 dias ou menos.

[001254] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a população terapêutica de TILs colhida na etapa (d) compreende TILs suficientes para uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs.

[001255] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número de TILs suficiente para uma dosagem terapeuticamente eficaz seja de, ou cerca de, $2,3 \times 10^{10}$ a, ou cerca de, $13,7 \times 10^{10}$.

[001256] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a terceira população de TILs na etapa (c) fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade.

[001257] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a terceira população de TILs na etapa (c) forneça pelo menos uma produção de uma a cinco vezes ou mais de interferon-gama em comparação com os TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

[001258] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a terceira população de TILs na etapa (c) forneça pelo menos uma produção de uma a cinco vezes ou mais de interferon-gama em comparação com os TILs preparados por um processo de mais de 17 dias.

[001259] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a terceira população de TILs na etapa (c) forneça pelo menos uma produção de uma a cinco vezes ou mais de interferon-gama em comparação com os TILs preparados por um processo de mais de 18 dias.

[001260] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da terceira população de TILs da etapa (c) exibam expressão aumentada de CD8 e CD28 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da segunda população de células etapa (b).

[001261] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que cada recipiente recitado no método seja um recipiente fechado.

[001262] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que cada recipiente recitado no método seja um recipiente G.

[001263] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que cada recipiente recitado no método seja um GREX-10.

[001264] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que cada recipiente recitado no método seja um GREX-100.

[001265] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que cada recipiente recitado no método seja um GREX-500.

[001266] Em outra modalidade, a invenção fornece a população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) feita pelo método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima.

[001267] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer adição de células apresentadoras de antígeno (APCs) ou OKT3.

[001268] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população

terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer adição de células apresentadoras de antígeno (APCs).

[001269] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

[001270] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem adição de células apresentadoras de antígeno (APCs) e sem adição de OKT3.

[001271] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade em comparação com TILs preparados por um processo por um processo mais longo do que 16 dias.

[001272] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs

fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade em comparação com TILs preparados por um processo por um processo com mais de 17 dias.

[001273] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) preparados a partir de tecido tumoral de um paciente, em que a população terapêutica de TILs fornece maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade em comparação com TILs preparados por um processo por um processo com mais de 18 dias.

[001274] Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, que fornece uma produção aumentada de interferon-gama.

[001275] Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, que fornece policlonalidade aumentada.

[001276] Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, que fornece maior eficácia.

[001277] Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias. Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 17 dias. Em outra

modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 18 dias. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, como descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001278] Em outra modalidade, a invenção fornece a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias. Em outra modalidade, a invenção fornece a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 17 dias. Em outra modalidade, a invenção fornece a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 18 dias. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de produzir pelo menos duas vezes mais interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, conforme descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por

exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001279] Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias. Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 17 dias. Em outra modalidade, a invenção fornece para a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que a população terapêutica de TILs seja capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 18 dias. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, como descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001280] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer células apresentadoras de antígeno (APCs) adicionadas. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, como descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo

com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001281] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, como descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001282] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de TILs que é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de produzir pelo menos duas vezes mais interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, conforme descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001283] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de TILs que é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de produzir pelo menos duas vezes mais interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, conforme descrito nas Etapas A a F acima ou de

acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001284] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de TILs que é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, como descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001285] Em outra modalidade, a invenção fornece uma população terapêutica de TILs que é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado. Em algumas modalidades, os TILs são tornados capazes de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama devido ao processo de expansão aqui descrito, por exemplo, como descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)).

[001286] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos de tumor sejam pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias de agulha de núcleo ou aspirados de agulha fina.

[001287] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos de tumor sejam biópsias de núcleo.

[001288] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos de tumor sejam aspirados com agulha fina.

[001289] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos de tumor sejam pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção).

[001290] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que os fragmentos de tumor sejam biópsias com agulha de núcleo.

[001291] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que (i) o método compreenda a obtenção da primeira população de TILs de uma ou mais biópsias pequenas (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias de agulha central ou aspirados de agulha fina de tecido tumoral do sujeito, (ii) o método compreenda a realização da etapa de cultura da primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2 por um período de cerca de 3 dias antes de realizar a etapa da primeira expansão de iniciação, (iii) o método compreenda a realização da primeira expansão de iniciação por um período de cerca de 8 dias, e (iv) o método compreenda a realização da segunda expansão rápida por um período de cerca de 11 dias. Em algumas das modalidades anteriores, as etapas do método são concluídas em cerca de 22 dias.

[001292] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que (i) o método compreenda a obtenção da primeira

população de TILs de uma ou mais biópsias pequenas (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias de agulha central ou aspirados de agulha fina de tecido tumoral do sujeito, (ii) o método compreenda a realização da etapa de cultura da primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2 por um período de cerca de 3 dias antes de realizar a etapa da primeira expansão de iniciação, (iii) o método compreenda a realização da primeira expansão de iniciação por um período de cerca de 8 dias, e (iv) o método compreenda a realização da segunda expansão rápida cultivando-se a cultura da segunda população de TILs por cerca de 5 dias, dividindo a cultura em até 5 subculturas e cultivando as subculturas por cerca de 6 dias. Em algumas das modalidades anteriores, as até 5 subculturas são, cada uma, cultivadas em um recipiente que é do mesmo tamanho ou maior que o recipiente no qual a cultura da segunda população de TILs é iniciada na segunda expansão rápida. Em algumas das modalidades anteriores, a cultura da segunda população de TILs é igualmente dividida entre as até 5 subculturas. Em algumas das modalidades anteriores, as etapas do método são concluídas em cerca de 22 dias.

[001293] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias com agulha grossa ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001294] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias centrais, biópsias por agulha central ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001295] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias centrais, biópsias com agulha central ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001296] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias de agulha de núcleo ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001297] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 20 biópsias de núcleo de tecido tumoral do sujeito.

[001298] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 10 biópsias de núcleo de tecido tumoral do sujeito.

[001299] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 biópsias de núcleo de tecido tumoral do sujeito.

[001300] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 núcleos biópsias de tecido tumoral do sujeito.

[001301] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 20 aspirados de agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001302] Os parágrafos conforme aplicável acima modificados de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 10 aspirados de agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001303] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aspirados com agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001304] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aspirados com agulha fina de tecido tumoral do sujeito.

[001305] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 20 biópsias de agulha de núcleo de tecido tumoral do sujeito.

[001306] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 10 biópsias de agulha de núcleo de tecido tumoral do sujeito.

[001307] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 biópsias com agulha de núcleo de tecido tumoral do sujeito.

[001308] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 núcleos biópsias de agulha de tecido tumoral do sujeito.

[001309] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do sujeito.

[001310] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida de 1 a cerca de 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral de o sujeito.

[001311] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do sujeito.

[001312] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de TILs seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do sujeito.

[001313] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que (i) o método compreenda a obtenção da primeira população de TILs de 1 a cerca de 10 biópsias centrais de tecido tumoral do sujeito, (ii) o método compreenda a realização da etapa de cultura da primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2 por um período de cerca de 3 dias antes de realizar a etapa da primeira expansão de iniciação, (iii) o método compreenda a realização da iniciação primeira etapa de expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura compreendendo IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs) por um período de cerca de 8 dias para obter a segunda população de TILs, e (iv) o método compreenda a realização da segunda etapa de expansão rápida através da cultura da segunda população de TILs em um meio de cultura compreendendo IL-2, OKT-3 e APCs por um período de cerca de 11 dias. Em algumas das modalidades anteriores, as etapas do método são concluídas em cerca de 22 dias.

[001314] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que (i) o método compreenda a obtenção da primeira população de TILs de 1 a cerca de 10 biópsias centrais de tecido tumoral do sujeito, (ii) o método compreenda a realização da etapa de cultura da primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2 por um período de cerca de 3 dias antes de realizar a etapa da primeira expansão de iniciação, (iii) o método compreenda a realização da iniciação primeira etapa de expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura compreendendo IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs) por um período de cerca de 8 dias para obter a segunda população de TILs, e (iv) o método compreenda a realização da segunda expansão rápida através da cultura da cultura da segunda população de TILs em um meio de cultura compreendendo IL-2, OKT-3 e APCs por cerca de 5

dias, dividindo a cultura em até 5 subculturas e cultivar cada uma das subculturas em um meio de cultura compreendendo IL-2 por cerca de 6 dias. Em algumas das modalidades anteriores, as até 5 subculturas são, cada uma, cultivadas em um recipiente que é do mesmo tamanho ou maior que o recipiente no qual a cultura da segunda população de TILs é iniciada na segunda expansão rápida. Em algumas das modalidades anteriores, a cultura da segunda população de TILs é igualmente dividida entre as até 5 subculturas. Em algumas das modalidades anteriores, as etapas do método são concluídas em cerca de 22 dias.

[001315] Em outra modalidade, a invenção fornece o método descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de tal modo que (i) o método compreenda a obtenção da primeira população de TILs de 1 a cerca de 10 biópsias centrais de tecido tumoral do sujeito, (ii) o método compreenda a realização da etapa de cultura da primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo 6000 UI IL-2/ml em 0,5 l de meio de cultura CM1 em um frasco G-Rex 100M por um período de cerca de 3 dias antes de realizar a etapa da primeira expansão de iniciação, (iii) o método compreenda a realização da primeira expansão de iniciação adicionando-se 0,5 l de meio de cultura CM1 contendo 6000 UI/ml de IL-2, 30 ng/ml OKT-3 e cerca de 10^8 células alimentadoras e cultivando-se por um período de cerca de 8 dias, e (iv) o método compreenda a realização da segunda expansão rápida (a) transferindo-se a segunda população de TILs para um frasco G-Rex 500MCS contendo 5 l de meio de cultura CM2 com 3000 UI/ml de IL-2, 30 ng/ml OKT-3 e 5 x 10^9 células alimentadoras e cultivando-se por cerca de 5 dias (b) dividindo a cultura em até 5 subculturas por transferência de 10^9 TILs em cada um de até 5 frascos G-Rex 500MCS contendo 5 l de meio AIM-V com 3000 UI/ml de IL-2 e cultivando-se as subculturas por cerca de 6 dias. Em algumas das modalidades anteriores, as etapas do método são concluídas em cerca de 22 dias.

[001316] Em outra modalidade, a invenção fornece um método de expansão de células T compreendendo: (a) realizar uma primeira expansão de iniciação de uma primeira população de células T obtida de um doador cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e iniciar uma ativação da primeira população de células T; (b) após a ativação da primeira população de células T iniciadas na etapa (a) começar a decair, realizar uma segunda expansão rápida da primeira população de células T cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e aumentar a ativação da primeira população de células T para obter uma segunda população de células T; e (c) colher a segunda população de células T. Em outra modalidade, a etapa de segunda expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para atingir um aumento de escala da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se a primeira população de células T em uma cultura de pequena escala em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuando-se a transferência da primeira população de células T da cultura em pequena escala para um segundo recipiente maior do que o primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 500MCS e cultivando-se a primeira população de células T da cultura em pequena escala em uma cultura em grande escala no segundo recipiente por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em outra modalidade, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se a primeira população de células T em uma primeira cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuando-se a transferência e repartição da primeira população de células T da primeira cultura em pequena escala em 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 que são iguais em tamanho ao primeiro

recipiente, em que em cada segundo recipiente a porção 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 cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuando-se a transferência e a repartição das células T da cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 4 a 7 dias. Em algumas modalidades, a etapa de expansão rápida é dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 4 dias, e então (b) efetuando-se a transferência e a repartição das células T da cultura de escala pequena em e dentre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 5 dias.

[001317] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a etapa de segunda expansão rápida seja dividida em

uma pluralidade de etapas para atingir um aumento de escala da cultura: (a) realizando a segunda expansão rápida cultivando-se a primeira população de células T em uma cultura de pequena escala em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 a 4 dias, e então (b) efetuar a transferência do primeira população de células T da cultura em pequena escala para um segundo recipiente maior do que o primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 500MCS e cultura da primeira população de células T da cultura em pequena escala em uma cultura em maior escala no segundo recipiente por um período de cerca de 5 a 7 dias.

[001318] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável, modificado de modo que a etapa de expansão rápida seja dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se a primeira população de células T em uma primeira cultura em pequena escala em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 a 4 dias, e então (b) efetuando-se a transferência e repartição da primeira população de células T da primeira cultura em pequena escala em 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 que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, em que em cada segundo recipiente a porção 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 cerca de 5 a 7 dias.

[001319] Em algumas modalidades, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável, modificado de modo que a etapa de expansão rápida seja dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se células

T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 2 a 4 dias, e então (b) efetuando-se a transferência e a repartição das células T da cultura de escala pequena para e dentre 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 5 a 7 dias.

[001320] Em algumas modalidades, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável, modificado de modo que a etapa de expansão rápida seja dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuando-se a transferência e a repartição das células T da cultura de escala pequena em e dentre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 5 a 6 dias.

[001321] Em algumas modalidades, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável, modificado de modo que a etapa de expansão rápida seja dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar um aumento de escala e uma distribuição da cultura: (a) realizando-se a segunda expansão rápida cultivando-se células T em uma cultura de escala pequena em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e

então (b) efetuando-se a transferência e a repartição das células T da cultura de escala pequena em e dentre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são iguais em tamanho ao primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção das células T da cultura de escala pequena transferida para tal segundo recipiente é cultivada em uma cultura de escala maior por um período de cerca de 5 dias.

[001322] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a etapa de expansão rápida seja dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar uma ampliação e ampliação da cultura por: (a) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a primeira população de células T em uma cultura de pequena escala em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuar a transferência e repartição da primeira população de células T da cultura em pequena escala em e entre 2, 3 ou 4 segundos recipientes que são maiores em tamanho do que o primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção de a primeira população de células T da cultura em pequena escala transferida para esse segundo recipiente é cultivada em uma cultura em grande escala por um período de cerca de 6 dias.

[001323] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a etapa de expansão rápida seja dividida em uma pluralidade de etapas para alcançar uma ampliação e ampliação da cultura por: (a) realizar a segunda expansão rápida cultivando-se a primeira população de células T em uma cultura de pequena escala em um primeiro recipiente, por exemplo, um recipiente G-REX 100MCS, por um período de cerca de 3 a 4 dias, e então (b) efetuar a transferência e repartição da primeira população de células T da cultura em pequena escala em e entre 2, 3 ou 4

segundos recipientes que são maiores em tamanho do que o primeiro recipiente, por exemplo, recipientes G-REX 500MCS, em que em cada segundo recipiente a porção de a primeira população de células T da cultura em pequena escala transferida para esse segundo recipiente é cultivada em uma cultura em grande escala por um período de cerca de 7 dias.

[001324] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira expansão de iniciação da etapa (a) seja realizada durante um período de até 7 dias.

[001325] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a segunda expansão rápida da etapa (b) seja realizada durante um período de até 8 dias.

[001326] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a segunda expansão rápida da etapa (b) seja realizada durante um período de até 9 dias.

[001327] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a segunda expansão rápida da etapa (b) seja realizada durante um período de até 10 dias.

[001328] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a segunda expansão rápida da etapa (b) seja realizada durante um período de até 11 dias.

[001329] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira expansão de iniciação na etapa (a) seja realizada durante um período de 7 dias e a segunda expansão rápida da etapa

(b) é realizado durante um período de até 9 dias.

[001330] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira expansão de iniciação na etapa (a) seja realizada durante um período de 7 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizado durante um período de até 10 dias.

[001331] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira expansão de iniciação na etapa (a) seja realizada durante um período de 7 dias ou 8 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizado durante um período de até 9 dias.

[001332] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira expansão de iniciação na etapa (a) seja realizada durante um período de 7 dias ou 8 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizado por um período de até 10 dias.

[001333] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira expansão de iniciação na etapa (a) seja realizada durante um período de 8 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizado durante um período de até 9 dias.

[001334] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira expansão de iniciação na etapa (a) seja realizada durante um período de 8 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizado durante um período de até 8 dias.

[001335] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de células T seja

cultivada em um primeiro meio de cultura compreendendo OKT-3 e IL-2.

[001336] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o primeiro meio de cultura compreende agonista 4-1BB, OKT-3 e IL-2.

[001337] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o primeiro meio de cultura compreende OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

[001338] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o primeiro meio de cultura compreende agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

[001339] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a primeira população de células T seja cultivada em um segundo meio de cultura compreendendo OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

[001340] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o segundo meio de cultura compreende agonista 4-1BB, OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

[001341] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de células T seja cultivada em um primeiro meio de cultura em um recipiente que compreende uma primeira superfície permeável a gás, em que o primeiro meio de cultura compreende OKT-3, IL-2 e uma primeira população de células apresentadoras de antígeno (APCs), em que a primeira população de APCs é exógena ao

doador da primeira população de células T e a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás, 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 ao doador da primeira população de células T e a segunda população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás e em que a segunda população de APCs é maior que a primeira população de APCs.

[001342] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de células T seja cultivada em um primeiro meio de cultura em um recipiente que compreende uma primeira superfície permeável a gás, em que o primeiro meio de cultura compreende agonsta 4-1BB, OKT-3, IL-2 e uma primeira população de células apresentadoras de antígeno (APCs), em que a primeira população de APCs é exógena ao doador da primeira população de células T e a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás, 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 ao doador da primeira população de células T e a segunda população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás e em que a segunda população de APCs é maior que a primeira população de APCs.

[001343] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de células T seja cultivada em um primeiro meio de cultura em um recipiente que compreende

uma primeira superfície permeável a gás, em que o primeiro meio de cultura compreende OKT-3, IL-2 e uma primeira população de células apresentadoras de antígeno (APCs), em que a primeira população de APCs é exógena ao doador da primeira população de células T e a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás, 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 agonista 4-1BB OKT-3, IL-2 e uma segunda população de APCs, em que a segunda população de APCs é exógena ao doador da primeira população de células T e a segunda população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás e em que a segunda população de APCs é maior que a primeira população de APCs.

[001344] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de células T seja cultivada em um primeiro meio de cultura em um recipiente que compreende uma primeira superfície permeável a gás, em que o primeiro meio de cultura compreende agonista 4-1BB OKT-3, IL-2 e uma primeira população de células apresentadoras de antígeno (APCs), em que a primeira população de APCs é exógena ao doador da primeira população de células T e a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás, 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 agonista 4-1BB OKT-3, IL-2 e uma segunda população de APCs, em que a segunda população de APCs é exógena ao doador da primeira população de células T e a segunda população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás e em que a segunda população de APCs é maior que a primeira população de APCs.

[001345] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito

em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número de APCs na segunda população de APCs e o número de APCs na primeira população de APCs seja de cerca de 2:1.

[001346] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o número de APCs na primeira população de APCs seja de cerca de 2,5 x 10^8 e o número de APCs na segunda população de APCs seja cerca de 5 x 10^8.

[001347] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás com uma espessura média de 2 camadas de APCs.

[001348] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a segunda população de APCs seja colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás com uma espessura média na faixa de 4 a 8 camadas de APCs.

[001349] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás na etapa (b) o número médio de camadas de APCs em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás na etapa (a) é 2:1.

[001350] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de

ou cerca de $1,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001351] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $1,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001352] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $2,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $3,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001353] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade de ou cerca de $2,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001354] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a segunda população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $2,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001355] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a segunda população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $6,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001356] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a segunda população de APCs seja

semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $4,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $5,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001357] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (b) a segunda população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade de ou cerca de $4,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001358] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $1,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 e na etapa (b) a segunda população de APCs é semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $2,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001359] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $1,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 e na etapa (b) a segunda população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $6,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001360] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $2,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $3,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 e na etapa (b) a segunda população de APCs seja semeada na primeira superfície

permeável a gás a uma densidade na faixa de ou cerca de $4,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a ou cerca de $5,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001361] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que na etapa (a) a primeira população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade de ou cerca de $2,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 e na etapa (b) a segunda população de APCs seja semeada na primeira superfície permeável a gás a uma densidade de ou cerca de $4,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

[001362] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as APCs sejam células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

[001363] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as PBMCs sejam irradiadas e exógenas ao doador da primeira população de células T.

[001364] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as células T sejam linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

[001365] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as células T sejam linfócitos infiltrantes da medula (MILs).

[001366] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que as células T sejam linfócitos de sangue periférico (PBLs).

[001367] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida por separação do sangue total do doador.

[001368] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida por separação do produto de aférese do doador.

[001369] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja separada do sangue total ou produto de aférese do doador por seleção positiva ou negativa de um fenótipo de célula T.

[001370] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que o fenótipo de células T seja CD3+ e CD45+.

[001371] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que, antes de realizar a primeira expansão de iniciação da primeira população de células T, as células T sejam separadas das células NK. Em outra modalidade, as células T são separadas das células NK na primeira população de células T por remoção de células CD3- CD56+ da primeira população de células T. Em outra modalidade, as células CD3- CD56+ são removidas da primeira população de células T submetendo-se a primeira população de células T à classificação de células usando uma estratégia de bloqueio que remove a fração de células CD3- CD56+ e recupera a fração negativa. Em outra modalidade, o método anterior é utilizado para a expansão de células T em uma primeira população de células T caracterizada por uma alta porcentagem de células NK. Em outra

modalidade, o método anterior é utilizado para a expansão de células T em uma primeira população de células T caracterizada por uma alta porcentagem de células CD3- CD56+. Em outra modalidade, o método anterior é utilizado para a expansão de células T em tecido tumoral caracterizado pela presença de um elevado número de células NK. Em outra modalidade, o método anterior é utilizado para a expansão de células T em tecido tumoral caracterizado por um alto número de células CD3- CD56+. Em outra modalidade, o método anterior é utilizado para a expansão de células T em tecido tumoral obtido de um paciente que sofre de um tumor caracterizado pela presença de um elevado número de células NK. Em outra modalidade, o método anterior é utilizado para a expansão de células T em tecido tumoral obtido de um paciente que sofre de um tumor caracterizado pela presença de um alto número de células CD3- CD56+. Em outra modalidade, o método anterior é utilizado para a expansão de células T em tecido tumoral obtido de uma paciente que sofre de câncer de ovário.

[001372] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que 1×10^7 células T, ou cerca de 1×10^7 células T, da primeira população de células T sejam semeadas em um recipiente para iniciar a primeira cultura de expansão primária em tal recipiente.

[001373] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja distribuída em uma pluralidade de recipientes e em cada recipiente 1×10^7 células T, ou cerca de 1×10^7 células T, da primeira população de células T sejam semeadas para iniciar a primeira cultura de expansão primária em tal recipiente.

[001374] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que a segunda população de células T colhidas na etapa (c) seja uma população terapêutica de TILs.

[001375] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de uma ou mais biópsias pequenas (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias com agulha grossa ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001376] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias com agulha grossa ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001377] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias de núcleo, biópsias com agulha grossa ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001378] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias centrais, biópsias com agulha central ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001379] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção), biópsias centrais, biópsias com agulha fina ou aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001380] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de uma ou mais biópsias de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001381] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 20 biópsias de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001382] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 10 biópsias de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001383] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 biópsias de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001384] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 biópsias de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001385] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de um

ou mais aspirados de agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001386] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 20 aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001387] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 10 aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001388] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001389] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aspirados com agulha fina de tecido tumoral do doador.

[001390] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de uma ou mais pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do doador.

[001391] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do doador.

[001392] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do doador.

[001393] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do doador.

[001394] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 pequenas biópsias (incluindo, por exemplo, uma biópsia por punção) de tecido tumoral do doador.

[001395] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de uma ou mais biópsias com agulha de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001396] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 20 biópsias com agulha de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001397] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida de 1 a 10 biópsias de agulha de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001398] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 biópsias com agulha de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001399] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que a primeira população de células T seja obtida a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 biópsias com agulha de núcleo de tecido tumoral do doador.

[001400] Em outra modalidade, a invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende: i) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de uma amostra de tumor obtida de uma ou mais biópsias pequenas, núcleo biópsias ou biópsias de agulha de um tumor em um sujeito cultivando-se a amostra de tumor em um primeiro meio de cultura de células que compreende IL-2 por cerca de 3 dias; (ii) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um segundo meio de cultura de células que compreende IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 7 ou 8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs; (iii) realizar uma segunda expansão rápida suplementando-se o segundo meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de

APCs adicionados na etapa (ii), em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 11 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 rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás; (iv) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (iii); e (v) transferir a população de TIL colhida da etapa (iv) para um saco de infusão.

[001401] Em outra modalidade, a invenção fornece um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs que compreende: (i) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de uma amostra de tumor obtida de uma ou mais pequenas biópsias, biópsias de núcleo ou biópsias de agulha de um tumor em um sujeito cultivando-se a amostra de tumor em um primeiro meio de cultura de células que compreende IL-2 por cerca de 3 dias; (ii) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um segundo meio de cultura de células que compreende IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada durante o primeiro período de cerca de 7 ou 8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs; (iii) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um terceiro meio de cultura de células que compreende IL-2, OKT-3 e APCs, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada para um segundo período de cerca de 11 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e (iv) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (iii).

[001402] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima,

modificado de modo que após o dia 5 do segundo período a cultura seja dividida em 2 ou mais subculturas e cada subcultura seja suplementada com uma quantidade adicional de terceiro meio de cultura e cultivada por cerca de 6 dias.

[001403] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que após o dia 5 do segundo período a cultura seja dividida em 2 ou mais subculturas e cada subcultura seja suplementada com um quarto meio de cultura compreendendo IL-2 e cultivada por cerca de 6 dias.

[001404] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que após o dia 5 do segundo período a cultura seja dividida em até 5 subculturas.

[001405] Em outra modalidade, a invenção fornece o método, descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que todas as etapas do método sejam concluídas em cerca de 22 dias.

[001406] Em outra modalidade, a invenção fornece um método de expansão de células T compreendendo: (i) realizar uma primeira expansão de iniciação de uma primeira população de células T a partir de uma amostra de tumor obtida a partir de uma ou mais pequenas biópsias, biópsias de núcleo ou biópsias de agulha de um tumor em um doador cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e para iniciar uma ativação da primeira população de células T; (ii) após a ativação da primeira população de células T iniciadas na etapa (a) começa a decair, realizar uma segunda expansão rápida da primeira população de células T cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e aumentar a ativação da primeira população de células T para obter uma segunda população de células

T; e (iv) colher a segunda população de células T. Em algumas modalidades, a amostra de tumor é obtida a partir de uma pluralidade de biópsias centrais. Em algumas modalidades, a pluralidade de biópsias centrais é selecionada a partir do grupo que consiste em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 biópsias centrais.

III. PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DE TIL (MODALIDADES DO PROCESSO 2A COM MEIOS DEFINIDOS)

[001407] Um processo de TIL exemplificativo conhecido como processo 2A contendo algumas dessas características é representado na Figura 1A e 109 (tal processo também é descrito na Publicação de Patente Internacional WO/2018/182817).

[001408] Conforme discutido neste documento, a presente invenção pode incluir uma etapa relacionada à nova estimulação de TILs criopreservados para aumentar sua atividade metabólica e, assim, a saúde relativa antes do transplante em um paciente e métodos de teste da dita saúde metabólica. Como geralmente descrito neste documento, os TILs são geralmente retirados de uma amostra de paciente e manipulados para expandir seu número antes do transplante em um paciente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser opcionalmente manipulados geneticamente, conforme discutido abaixo.

[001409] Em algumas modalidades, os TILs podem ser criopreservados. Uma vez descongelados, eles também podem ser estimulados novamente para aumentar seu metabolismo antes da infusão em um paciente.

[001410] Em algumas modalidades, a primeira expansão (incluindo processos referidos como pré-REP, bem como processos mostrados na Figura 109 como Etapa A) é encurtada para 3 a 14 dias e a segunda expansão (incluindo processos referidos como REP, bem como processos mostrado na Figura 109 como Etapa B) é encurtado para 7 a 14 dias, conforme discutido em detalhes abaixo, bem como nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão (por exemplo, uma expansão descrita como

Etapa B na Figura 109) é encurtada para 11 dias e a segunda expansão (por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa D na Figura 109) é encurtada para 11 dias. Em algumas modalidades, a combinação da primeira expansão e da segunda expansão (por exemplo, expansões descritas como Etapa B e Etapa D na Figura 109) é encurtada para 22 dias, conforme discutido em detalhes abaixo e nos exemplos e figuras.

[001411] As designações de "etapa" A, B, C, etc., abaixo são em referência à Figura 109 e em referência a certas modalidades aqui descritas. A ordenação das etapas abaixo e na Figura 109 é exemplificativa e qualquer combinação ou ordem de etapas, bem como etapas adicionais, repetição de etapas e/ou omissão de etapas é contemplada pelo presente pedido e pelos métodos aqui divulgados.

A. ETAPA A: OBTER UMA AMOSTRA DE TUMOR DO PACIENTE

[001412] Em geral, os TILs são obtidos inicialmente de uma amostra de tumor de paciente ("TILs primários") e, em seguida, expandidos em uma população maior para manipulação adicional, conforme descrito neste documento, opcionalmente criopreservados, reestimulados conforme descrito neste documento e opcionalmente avaliados para fenótipo e parâmetros metabólicos como uma indicação de saúde TIL.

[001413] Uma amostra de tumor de paciente pode ser obtida usando métodos conhecidos na técnica, geralmente por meio de ressecção cirúrgica, biópsia por agulha ou outros meios para obter uma amostra que contém uma mistura de tumor e células TIL. Em geral, a amostra de tumor pode ser de qualquer tumor sólido, incluindo tumores primários, tumores invasivos ou tumores metastáticos. A amostra de tumor também pode ser um tumor líquido, como um tumor obtido de uma malignidade hematológica. O tumor sólido pode ser de qualquer tipo de câncer, incluindo, porém sem limitação, mama, pâncreas, próstata, colorretal, pulmão, cérebro, renal, estômago e pele (incluindo, porém sem limitação, carcinoma de células escamosas, carcinoma

de células basais e melanoma). Em algumas modalidades, TILs úteis são obtidos a partir de tumores de melanoma maligno, uma vez que foi relatado que estes têm níveis particularmente elevados de TILs.

[001414] O termo "tumor sólido" se refere a uma massa anormal de tecido que geralmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo "câncer de tumor sólido" se refere a tumores sólidos malignos, neoplásicos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, porém sem limitação, sarcomas, carcinomas e linfomas, tais como cânceres de pulmão, mama, câncer de mama triplo negativo, próstata, cólon, reto e bexiga. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado de câncer cervical, câncer de cabeça e pescoço (incluindo, por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)) glioblastoma, câncer de ovário, sarcoma, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer de mama, triplo negativo câncer de mama e carcinoma de células não pequenas do pulmão. A estrutura do tecido de tumores sólidos inclui compartimentos de tecido interdependentes, incluindo o parênquima (células cancerosas) e as células estromais de suporte nas quais as células cancerosas estão dispersas e que podem fornecer um microambiente de suporte.

[001415] O termo "malignidade hematológica" se refere a cânceres e tumores de mamíferos dos tecidos hematopoiéticos e linfoides, incluindo, porém sem limitação, tecidos do sangue, medula óssea, nódulos linfáticos e sistema linfático. Malignidades hematológicas também são chamadas de "tumores líquidos". As malignidades hematológicas incluem, porém sem limitação, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma linfocítico crônico (LLC), linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia monocítica aguda (AMoL), Linfoma de Hodgkin e linfomas não Hodgkin. O termo "malignidade hematológica de células B" se refere a doenças malignas hematológicas que

afetam as células B.

[001416] Uma vez obtida, a amostra de tumor é geralmente fragmentada utilizando dissecção cortante em pedaços pequenos de entre 1 a cerca de 8 $mm^{3,}$ com cerca de 2 a 3 mm^3 sendo particularmente útil. Os TILs são cultivados a partir desses fragmentos usando digestão enzimática de tumor. Esses tumores digeridos podem ser produzidos por incubação em meio enzimático (por exemplo, tampão 1640 do Roswell Park Memorial Institute (RPMI), glutamato a 2 mM, gentamicina a 10 mcg/ml, 30 unidades/ml de DNase e 1,0 mg/ml de colagenase) seguido por dissociação mecânica (por exemplo, usando um dissociador de tecido). A digestão do tumor pode ser produzida colocando-se o tumor em meio enzimático e dissociando mecanicamente o tumor por aproximadamente 1 minuto, seguido de incubação por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 a 5%, seguido por ciclos repetidos de dissociação mecânica e incubação sob as condições anteriores até que apenas pequenos pedaços de tecido estejam presentes. No final desse processo, se a suspensão de células contiver um grande número de glóbulos vermelhos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade usando polissacarídeo hidrofílico ramificado FICOLL pode ser realizada para remover essas células. Métodos alternativos conhecidos na técnica podem ser usados, tais como aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente nº US 2012/0244133 A1, cuja divulgação é incorporada no presente documento a título de referência. Qualquer um dos métodos anteriores pode ser usado em qualquer uma das modalidades aqui descritas para métodos de expansão de TILs ou métodos de tratamento de um câncer.

[001417] Em geral, a suspensão de células colhidas é chamada de "população de células primárias" ou população de células "recém-colhidas".

[001418] Em algumas modalidades, a fragmentação inclui fragmentação física, incluindo, por exemplo, dissecção, bem como digestão. Em algumas modalidades, a fragmentação é fragmentação física. Em algumas

modalidades, a fragmentação é dissecção. Em algumas modalidades, a fragmentação é por digestão. Em algumas modalidades, os TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de digestão enzimática de tumor e fragmentos de tumor obtidos de pacientes. Em uma modalidade, os TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de digestão enzimática de tumor e fragmentos de tumor obtidos de pacientes.

[001419] Em algumas modalidades, quando o tumor é um tumor sólido, o tumor sofre fragmentação física após a amostra do tumor ser obtida, por exemplo, na Etapa A (conforme fornecido na Figura 109). Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre antes da criopreservação. Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre após a criopreservação. Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre após a obtenção do tumor e na ausência de qualquer criopreservação. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 10, 20, 30, 40 ou mais fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 30 ou 40 fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 40 fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 4 a cerca de 50 fragmentos, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm^3. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm^3 a cerca de 1500 mm^3. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1350 mm^3. Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama. Em algumas modalidades, os múltiplos fragmentos compreendem cerca de 4 fragmentos.

[001420] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos a partir de

fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, o fragmento do tumor é obtido por dissecção afiada. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 10 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 8 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 1 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 2 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 3 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 4 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 5 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 6 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 7 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 8 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 9 mm^3. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor tem cerca de 10 mm^3.

[001421] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos a partir de digestão de tumor. Em algumas modalidades, a digestão do tumor foi gerada por incubação em meio enzimático, por exemplo, porém sem limitação, RPMI 1640, GlutaMAX a 2 mM, 10 mg/ml de gentamicina, 30 U/ml de DNase e 1,0 mg/ml de colagenase, seguido por dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de colocar o tumor em meio enzimático, 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 a 5% e então mecanicamente interrompida novamente por aproximadamente 1 minuto. Depois de ser incubado novamente por 30 minutos a 37 ºC em CO_2 a 5%, o tumor pode ser interrompido mecanicamente uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, após a terceira interrupção mecânica se grandes pedaços de tecido estivessem presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais foram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos

adicionais de incubação a 37 ºC em CO_2 a 5%. Em algumas modalidades, no fim da incubação final, se a suspensão de células contiver um grande número de glóbulos vermelhos ou células mortas, uma separação por gradiente de densidade usando Ficoll pode ser realizada para remover essas células.

[001422] Em algumas modalidades, a suspensão de células colhidas antes da primeira etapa de expansão é chamada de "população de células primárias" ou população de células "recém-colhidas".

[001423] Em algumas modalidades, as células podem ser opcionalmente congeladas após a colheita da amostra e armazenadas congeladas antes da entrada na expansão descrita na Etapa B, que é descrita em mais detalhes abaixo, bem como exemplificada na Figura 109.

B. ETAPA B: PRIMEIRA EXPANSÃO

1. TILS JOVENS

[001424] Em algumas modalidades, os presentes métodos proporcionam a obtenção de TILs jovens, que são capazes de aumentar os ciclos de replicação mediante administração a um sujeito/paciente e, como tal, podem fornecer benefícios terapêuticos adicionais em relação aos TILs mais antigos (ou seja, TILs que passaram por mais rodadas de replicação antes da administração a um sujeito/paciente). As características de jovens TILs 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 incorporados no presente documento a título de referência na sua totalidade.

[001425] Os diversos receptores de antígenos dos linfócitos T e B são

produzidos pela recombinação somática de um número limitado, mas um grande número de segmentos gênicos. Esses segmentos gênicos: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e as aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de células T (TCRs). A presente invenção fornece 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 em comparação com TILs e/ou TILs recém-colhidos e/ou TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 109. Em algumas modalidades, os TILs obtidos na primeira expansão exibem um aumento na diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, o aumento na diversidade é um aumento na diversidade da imunoglobulina e/ou na diversidade do receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está na imunoglobulina, está na cadeia pesada de imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está na imunoglobulina, está na cadeia leve da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está no receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está em um dos receptores de células T selecionados do grupo que consiste em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de TCRab (ou seja, TCRα/β).

[001426] Após a dissecção ou digestão de fragmentos de tumor, por exemplo, tal como descrito na Etapa A da Figura 109, as células resultantes

são cultivadas em soro contendo IL-2 sob condições que favorecem o crescimento de TILs sobre o tumor e outras células. Em algumas modalidades, a digestão do tumor é incubada em poços 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 3 a 14 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 7 a 14 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de 10 a 14 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. Em algumas modalidades, essa população de células primárias é cultivada por um período de cerca de 11 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa.

[001427] Em uma modalidade preferencial, a expansão de TILs pode ser realizada usando uma etapa de expansão de TIL em massa inicial (por exemplo, como aquelas descritas na Etapa B da Figura 109, que podem incluir processos referidos como pré-REP), conforme descrito abaixo e aqui, seguido por uma segunda expansão (Etapa D, incluindo processos referidos como etapas de protocolo de expansão rápida (REP)), conforme descrito abaixo na Etapa D e aqui, seguida por criopreservação opcional e seguida por uma segunda Etapa D (incluindo processos referidos como nova estimulação REP etapas) conforme descrito abaixo e aqui. Os TILs obtidos a partir desse processo podem ser opcionalmente caracterizados quanto às características fenotípicas e parâmetros metabólicos, conforme descrito neste documento.

[001428] Em modalidades em que as culturas TIL são iniciadas em placas de 24 poços, por exemplo, usando um agrupamento de cultura de células em 24 poços da Costar, fundo plano (Corning Incorporated, Corning,

NY, cada poço pode ser semeado com 1×10^6 células de digestão de tumor ou um fragmento de tumor em 2 ml de meio completo (CM) com IL-2 (6000 UI/ml; Chiron Corp., Emeryville, CA). Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 10 mm^3.

[001429] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão é referido como "CM", uma abreviatura para meios de cultura. Em algumas modalidades, CM para a Etapa B consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano a 10%, Hepes a 25 mM e 10 mg/ml de gentamicina. Em modalidades em que as culturas são iniciadas em frascos permeáveis ao gás com uma capacidade de 40 ml e um fundo de silício permeável a gás de 10 cm^2 (por exemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Figura 1), cada o frasco foi carregado com $10–40 \times 10^6$ células de digestão tumoral viáveis ou 5–30 fragmentos de tumor em 10–40 ml de CM com IL-2. Ambas as placas G-Rex10 e de 24 poços foram incubadas em uma incubadora umidificada a 37 ºC em CO_2 a 5% e 5 dias após o início da cultura, metade do meio foi removido e substituído por CM e IL-2 frescos e após o dia 5, metade do meio foi trocada a cada 2-3 dias.

[001430] Após a preparação dos fragmentos de tumor, as células resultantes (isto é, fragmentos) são cultivadas em soro contendo IL-2 sob condições que favorecem o crescimento de TILs sobre o tumor e outras células. Em algumas modalidades, a digestão do tumor é incubada em poços de 2 ml em meio compreendendo soro AB humano inativado (ou, em alguns casos, conforme descrito neste documento, na presença de uma 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 10 a 14 dias, resultando em uma população de TIL em massa, geralmente cerca de 1×10^8 células TIL em massa. 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 a 30×10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20×10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 25×10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 30×10^6 UI/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 4 a 8×10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 5 a 7×10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 tem uma concentração final de 6×10^6 UI/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução estoque de IL-2 é preparada conforme descrito no Exemplo 4. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 10000 UI/ml de IL-2, cerca de 9000 UI/ml de IL-2, cerca de 8000 UI/ml de IL-2, cerca de 7000 UI/ml de IL-2, cerca de 6000 UI/ml de IL-2 ou cerca de 5000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 9000 UI/ml de IL-2 a cerca de 5000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 8000 UI/ml de IL-2 a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 7000 UI/ml de IL-2 a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-2. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células compreende cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o meio de

cultura de células 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 de células 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.

[001431] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de 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 primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 500 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 400 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 300 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 200 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-15. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15.

[001432] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21, cerca de 15 UI/ml de IL-21, cerca de 12 UI/ml de IL-21, cerca de 10 UI/ml de IL-21, cerca de 5 UI/ml de IL-21, cerca de 4 UI/ml de IL-21, cerca de 3 UI/ml de IL-21, cerca de 2

UI/ml de IL-21, cerca de 1 UI/ml de IL-21 ou cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 15 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 12 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 10 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 5 UI/ml de IL-21 a cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 2 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-21. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21.

[001433] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão é referido como "CM", uma abreviatura para meios de cultura. Em algumas modalidades, o mesmo é referido como CM1 (meio de cultura 1). Em algumas modalidades, CM consiste em RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com soro AB humano a 10%, Hepes a 25 mM e gentamicina 10 mg/ml. Em modalidades em que as culturas são iniciadas em frascos permeáveis ao gás com uma capacidade de 40 ml e um fundo de silicone permeável a gás 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 de digestão de tumor viáveis ou 5–30 fragmentos de tumor em 10–40ml de CM com IL-2. Ambas as placas G-Rex10 e de 24 poços foram incubadas em uma incubadora umidificada a 37 ºC em CO_2 a 5%

e 5 dias após o início da cultura, metade do meio foi removido e substituído por CM e IL-2 frescos e após o dia 5, metade do meio foi trocada a cada 2-3 dias. Em algumas modalidades, o CM é o CM1 descrito nos Exemplos, consultar Exemplo 5. Em algumas modalidades, a primeira expansão ocorre em um meio de cultura de células inicial ou um primeiro meio de cultura de células. Em algumas modalidades, o meio de cultivo de células inicial ou o primeiro meio de cultivo de células compreende IL-2.

[001434] Em algumas modalidades, o primeiro processo de expansão (incluindo processos como, por exemplo, aqueles descritos na Etapa B da Figura 109, que podem incluir aqueles às vezes referidos como o pré-REP) é encurtado para 3-14 dias, conforme discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão (incluindo processos como, por exemplo, aqueles descritos na Etapa B da Figura 109, que podem incluir aqueles às vezes referidos como pré-REP) é encurtada para 7 a 14 dias, conforme discutido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4 e 5, bem como incluindo, por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa B da Figura 109. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 10-14 dias, conforme discutido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4 e 5. Em algumas modalidades, a primeira expansão é encurtada para 11 dias, bem como incluindo, por exemplo, uma expansão conforme descrito na Etapa B da Figura 109.

[001435] Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL 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 ou 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 1 dia a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 3 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 4 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira

expansão de TIL pode prosseguir por 5 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 6 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 7 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 8 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 9 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 10 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 11 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 12 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 13 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 1 dia a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 3 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 4 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 5 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 6 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 7 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 8 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 9 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 10 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 11 dias.

[001436] 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 dos mesmos, podem ser incluídos durante a primeira expansão, incluindo, por exemplo, durante um processo da Etapa B de acordo com a Figura 109, como 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 os processos da Etapa B de acordo com a Figura 109 e conforme descrito aqui.

[001437] Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão (incluindo processos referidos como o pré-REP; por exemplo, Etapa B de acordo com a Figura 109) é encurtado para 3 a 14 dias, conforme discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 7 a 14 dias, conforme discutido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4 e 5. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 10 a 14 dias, conforme discutido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4, 5 e 27. Em algumas modalidades, a primeira expansão é reduzida para 11 dias.

[001438] Em algumas modalidades, a primeira expansão, por exemplo, a Etapa B de acordo com a Figura 109, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o biorreator único empregado é, por exemplo, um G-REX -10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

C. ETAPA C: TRANSIÇÃO DA PRIMEIRA EXPANSÃO PARA A SEGUNDA EXPANSÃO

[001439] Em alguns casos, a população de TIL em massa obtida a partir da primeira expansão, incluindo por exemplo a população de TIL obtida a

partir, por exemplo, da Etapa B como indicado na Figura 109, pode ser criopreservada imediatamente, usando os protocolos discutidos aqui abaixo. Alternativamente, a população de TIL obtida a partir da primeira expansão, referida como a segunda população de TIL, pode ser submetida a uma segunda expansão (que pode incluir expansões às vezes referidas como REP) e então criopreservada conforme discutido abaixo. Da mesma forma, no caso em que TILs geneticamente modificados serão usados na terapia, a primeira população de TIL (às vezes referida como a população de TIL em massa) ou a segunda população de TIL (que pode, em algumas modalidades, incluir populações referidas como populações REP TIL) pode ser submetida a modificações genéticas para tratamentos adequados antes da expansão ou após a primeira expansão e antes da segunda expansão.

[001440] Em algumas modalidades, os TILs obtidos a partir da primeira expansão (por exemplo, a partir da Etapa B, conforme indicado na Figura 109) são armazenados até fenotipados para seleção. Em algumas modalidades, os TILs obtidos da primeira expansão (por exemplo, da Etapa B, conforme indicado na Figura 109) não são armazenados e prosseguem diretamente para a segunda expansão. Em algumas modalidades, os TILs obtidos da primeira expansão não são criopreservados após a primeira expansão e antes da segunda expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 3 dias, 4, dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 3 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 4 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 4 dias a 10 dias a partir de quando ocorre a

fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 7 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação.

[001441] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 1 dia a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 3 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 4 a 14 dias a partir do momento em que ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 5 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 6 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 7 a 14 dias a partir do momento em que ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 8 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 9 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 10 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição

da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 11 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 12 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 13 dias a 14 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 14 dias a partir do momento em que ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 1 dia a 11 dias a partir do momento em que ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 2 dias a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 3 dias a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 4 a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 5 dias a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 6 dias a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 7 a 11 dias a partir do momento em que ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 8 dias a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 9 dias a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre de 10 dias a 11 dias a partir de quando ocorre a fragmentação. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão

para a segunda expansão ocorre de 11 dias a partir do momento em que ocorre a fragmentação.

[001442] Em algumas modalidades, os TILs não são armazenados após a primeira expansão e antes da segunda expansão, e os TILs procedem diretamente para a segunda expansão (por exemplo, em algumas modalidades, não há armazenamento durante a transição da Etapa B para a Etapa D conforme mostrado na Figura 109). Em algumas modalidades, a transição ocorre em sistema fechado, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, os TILs da primeira expansão, a segunda população de TILs, procedem diretamente para a segunda expansão sem período de transição.

[001443] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão, por exemplo, a Etapa C de acordo com a Figura 109, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o biorreator único empregado é, por exemplo, um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

[001444] Em algumas modalidades, o meio de cultura usado nos processos de expansão aqui divulgados é um meio sem soro ou um meio definido. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é usado para prevenir e/ou diminuir a variação experimental devido em parte à variação lote a lote de meios contendo soro.

[001445] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou reposição de soro. Em algumas modalidades, o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™

OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001446] Em algumas modalidades, o suplemento de soro ou substituição de soro inclui, porém sem limitação, um ou mais de suplemento sérico de expansão de células T CTS™ OpTmizer, substituição de soro celular imune CTS™, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

[001447] Em algumas modalidades, a substituição de soro celular imune de células T CTS™OpTmizer™ é usada com meios de crescimento convencionais, incluindo, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de

Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001448] Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro (% em volume) no meio sem soro ou no meio definido é de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio definido ou livre de soro total. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 3% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 5% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 10% do volume total do meio sem soro ou definido.

[001449] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM.

[001450] Em algumas modalidades, o meio definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio

CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de

expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2.

[001451] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM, ou 4 mM a cerca de 5 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

[001452] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM, ou cerca de 65 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro

ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

[001453] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos na Publicação PCT Internacional nº WO/1998/030679, que é incorporada no presente documento a título de referência, são úteis na presente invenção. Nessa publicação, são descritos meios de cultura de células eucarióticas sem soro. O meio de cultura de células eucarióticas sem soro inclui um meio de cultura de células basais suplementado com um suplemento sem soro capaz de suportar o crescimento de células em cultura sem soro. O suplemento de meio de cultura de células eucarióticas sem soro compreende ou é obtido pela combinação de um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais elementos traço e um ou mais antibióticos. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou beta-mercaptoetanol. Em algumas modalidades, o meio definido compreende uma albumina ou um substituto da albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, um ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+},

Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio de células basais é selecionado a partir do grupo que consiste no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), no meio mínimo essencial (MEM), no meio basal de Eagle (BME), em RPMI 1640, em F-10, em F-12, no meio mínimo essencial (αMEM), no meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), no meio de crescimento RPMI e no meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001454] Em algumas modalidades, a concentração de glicina no meio definido está na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-histidina é de cerca de 5 a 250 mg/l, a concentração de L-isoleucina é de cerca de 5 a 300 mg/l, a concentração de L-metionina é de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-fenilalanina é de cerca de 5 a 400 mg/l, a concentração de L-prolina é de cerca de 1 a 1000 mg/l, a concentração de L-hidroxiprolina é de cerca de 1 a 45 mg/l, a concentração de L-serina é de cerca de 1 a 250 mg/l, a concentração de L-treonina é de cerca de 10 a 500-mg/l, a concentração de L-triptofano é de cerca de 2 a 110 mg/l, a concentração de L-tirosina é de cerca de 3 a 175 mg/l, a concentração de L-valina é de cerca de 5 a 500 mg/l, a concentração de tiamina é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de glutationa reduzida é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de ácido L-ascórbico-2-fosfato é de cerca de 1 a 200 mg/l, a concentração de transferrina saturada de ferro é de cerca de 1 a 50 mg/l, a concentração de insulina é de cerca 1 a 100 mg/l, a concentração de selenita de sódio é de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e a concentração de albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) é de cerca de 5000 a 50000 mg/l.

[001455] Em algumas modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração em 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas

concentrações finais listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial de 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, o meio definido é um meio de células basais que compreende um suplemento sem soro. Em algumas dessas modalidades, o suplemento sem soro compreende ingredientes da porção química não-traço do tipo e nas concentrações listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial no suplemento" na Tabela A abaixo.

TABELA A: CONCENTRAÇÕES DE INGREDIENTES DE PORÇÃO QUÍMICA DE ELEMENTO NÃO-TRAÇO

Ingrediente	Uma modalidade preferencial em suplemento (mg/l) (Cerca de)	Faixa de concentração em 1X meio (mg/l) (Cerca de)	Uma modalidade preferencial em 1X meio (mg/l) (Cerca de)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-fenilalanina	1800	5-400	336
L-Prolina	4000	1-1000	600
L-hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-treonina	2200	10-500	425
L-triptofano	440	2-110	82
L-tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutationa Reduzida	10	1-20	1,5
Ácido ascórbico-2-PO_4 (sal de Mg)	330	1-200	50
Transferrina (ferro saturado)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenita de Sódio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83000	5000-50000	12500

[001456] Em algumas modalidades, a osmolaridade do meio definido está entre cerca de 260 e 350 mOsmol. Em algumas modalidades, a osmolaridade está entre cerca de 280 e 310 mOsmol. Em algumas modalidades, o meio definido é suplementado com até cerca de 3,7 g/l, ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio. O meio definido pode ser suplementado com L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM), 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

[001457] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos em Smith, *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement", *Clin Transl Immunology*, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) são úteis na presente invenção. Resumidamente, RPMI ou CTS™ OpTmizer™ foi usado como o meio de células basais e suplementado com substituição de soro celular imune CTS™ a 0, 2%, 5% ou 10%.

[001458] Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou segundo recipiente permeável a gás 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 permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

D. ETAPA D: SEGUNDA EXPANSÃO

[001459] Em algumas modalidades, a população de células TIL é expandida em número após a colheita e o processamento em massa inicial, por exemplo, após a Etapa A e a Etapa B, e a transição referida como Etapa C, conforme indicado na Figura 109). Esta expansão adicional é referida neste documento como a segunda expansão, que pode incluir processos de expansão geralmente referidos na técnica como um processo de expansão rápida (REP; bem como processos indicados na Etapa D da Figura 109). A segunda expansão é geralmente realizada usando um meio de cultura compreendendo uma série de componentes, incluindo células alimentadoras, uma fonte de citocina e um anticorpo anti-CD3, em um recipiente permeável a gás.

[001460] Em algumas modalidades, a segunda expansão ou segunda expansão de TIL (que pode incluir expansões às vezes referidas como REP; bem como processos conforme indicado na Etapa D da Figura 109) de TIL pode ser realizada usando quaisquer frascos TIL ou recipientes conhecidos

por aqueles de habilidade na técnica. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 7 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 8 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 9 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 10 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 11 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 12 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 13 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 14 dias.

[001461] Em uma modalidade, a segunda expansão pode ser realizada em um recipiente permeável a gás usando os métodos da presente divulgação (incluindo, por exemplo, expansões referidas como REP; bem como processos indicados na Etapa D da Figura 109). Por exemplo, os TILs podem ser expandidos rapidamente usando estimulação não específica do receptor de células T na presença de interleucina-2 (IL-2) ou interleucina-15 (IL-15). O estímulo do receptor de células T não específico pode incluir, por exemplo, um anticorpo anti-CD3, tal como cerca de 30 ng/ml de OKT3, um anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD3 (comercialmente disponível junto à Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA) ou UHCT-1 (comercialmente disponível junto à BioLegend, San Diego, CA, EUA). Os 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 (ou epítopos) do câncer,

que pode ser opcionalmente expresso a partir de um vetor, tal como um peptídeo de ligação ao antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), por exemplo, MART-1 a 0,3 μM: 26-35 (27 l) ou gpl 00:209-217 (210 M), opcionalmente na presença de um fator de crescimento de células T, como 300 UI/ml de IL-2 ou IL-15. Outros antígenos adequados podem incluir, por exemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno de câncer de tirosinase, MAGE-A3, SSX-2 e VEGFR2 ou porções antigênicas dos mesmos. O TIL também pode ser rapidamente expandido por nova estimulação com o mesmo antígeno (ou antígenos) do câncer pulsado nas células apresentadoras de antígeno que expressam HLA-A2. Alternativamente, os TILs podem ser ainda re-estimulados com, por exemplo, linfócitos autólogos irradiados ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2. Em algumas modalidades, a nova estimulação 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.

[001462] Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de células 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 de células 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.

[001463] Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende anticorpo OKT3. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células

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

[001464] 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 dos mesmos, podem ser incluídos durante a segunda expansão, incluindo, por exemplo, durante um processo da Etapa D de acordo com a Figura 109, 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 os processos da Etapa D de acordo com a Figura 109 e conforme descrito aqui.

[001465] Em algumas modalidades, a segunda expansão pode ser conduzida em um meio de cultura de células suplementado compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras de apresentação de antígeno. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura de células suplementado. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células suplementado compreende IL-2, OKT-3 e células alimentadoras de

apresentação de antígeno. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de células compreende IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs; também referidas como células alimentadoras de apresentação de antígeno). Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras de apresentação de antígeno (isto é, células de apresentação de antígeno).

[001466] Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de 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 segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 500 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 400 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 300 UI/ml de IL-15 a cerca de 100 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 200 UI/ml de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-15. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células compreende cerca de 180 UI/ml de IL-15.

[001467] Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21, cerca de 15 UI/ml de IL-21, cerca de 12 UI/ml de IL-21, cerca de 10 UI/ml de IL-21, cerca de 5 UI/ml de IL-21, cerca de 4 UI/ml de IL-21, cerca de 3 UI/ml de IL-21, cerca de 2 UI/ml de IL-21, cerca de 1 UI/ml de IL-21 ou cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão

compreende cerca de 20 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 15 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 12 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 10 UI/ml de IL-21 a cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 5 UI/ml de IL-21 a cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de expansão compreende cerca de 2 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de células compreende cerca de 0,5 UI/ml de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura de células compreende ainda IL-21. Em uma modalidade preferencial, o meio de cultura de células compreende cerca de 1 UI/ml de IL-21.

[001468] Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno (APCs) são PBMCs. Em uma modalidade, a razão entre TILs e PBMCs e/ou células apresentadoras de antígeno na expansão rápida e/ou na segunda expansão é de cerca de 1 a 25, cerca de 1 a 50, cerca de 1 a 100, cerca de 1 a 125, cerca de 1 a 150, cerca de 1 a 175, cerca de 1 a 200, cerca de 1 a 225, cerca de 1 a 250, cerca de 1 a 275, cerca de 1 a 300, cerca de 1 a 325, cerca de 1 a 350, cerca de 1 a 375, cerca de 1 a 400, ou cerca de 1 a 500. Em uma modalidade, a razão entre TILs e PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 e 50 e de 1 a 300. Em uma modalidade, a razão entre TILs e PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 e 100 e de 1 a 200.

[001469] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão é realizada em frascos com os TILs em massa sendo misturados com um excesso de 100 ou 200 vezes de células alimentadoras inativadas, 30 mg/ml

de anticorpo anti-CD3 OKT3 e 3000 UI/ml de IL-2 em 150 ml de meio. A substituição do meio é feita (geralmente substituição de 2/3 do meio por meio de respiração com meio fresco) até que as células sejam transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. Câmaras de crescimento alternativas incluem frascos G-REX e recipientes permeáveis a gás, conforme discutido mais detalhadamente abaixo.

[001470] Em algumas modalidades, a segunda expansão (que pode incluir processos referidos como o processo REP) é encurtada para 7 a 14 dias, conforme discutido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a segunda expansão é reduzida para 11 dias.

[001471] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão podem ser realizadas usando frascos T-175 e sacos permeáveis a gás como descrito anteriormente (Tran, *et al.*, *J. Immunother.* **2008,** *31,* 742-51; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003,** *26,* 332-42) ou utensílios de 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 podem ser adicionados a cada frasco T-175. Os TILs podem ser cultivados em uma mistura de 1 para 1 de meio CM e 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 5% de CO_2. Metade do meio pode ser trocada no dia 5 usando meio 50/50 com 3000 UI por ml de IL-2. Em algumas modalidades, no dia 7, células de dois frascos T-175 podem ser combinadas em um saco de 3 l e 300 ml de AIM V com soro AB humano a 5% e 3000 UI por ml de IL-2 foram adicionados aos 300 ml de suspensão de TIL. O número de células em cada saco foi contado a cada dois dias e o meio fresco foi adicionado para manter a contagem de células entre 0,5 e 2,0 x 10^6 células/ml.

[001472] Em uma modalidade, a segunda expansão (que pode incluir expansões referidas como REP, bem como aquelas referidas na Etapa D da

Figura 109) pode ser realizada em frascos permeáveis a gás com capacidade de 500 ml com fundos de silício permeáveis a gás de 100 cm (G-Rex 100, comercialmente disponível junto à Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, EUA), 5×10^6 ou 10×10^6 TILs podem ser cultivados com PBMCs em 400 ml de meio 50/50, suplementados com soro de AB humano a 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 de CO_2 a 5%. No dia 5, 250 ml de sobrenadante podem ser removidos e colocados em garrafas de centrífuga e centrifugados a 1500 rpm (491 × g) por 10 minutos. Os péletes de TIL podem ser ressuspensos com 150 ml de meio fresco com soro AB humano a 5%, 3000 UI por ml de IL-2, e adicionados de volta aos frascos G-Rex 100 originais. Quando os TILs são expandidos em série em frascos de G-Rex 100, no dia 7 o TIL em cada G-Rex 100 pode ser suspenso nos 300 ml de meio presente em cada frasco e a suspensão de células pode ser dividida em 3 alíquotas de 100 ml que podem ser usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Em seguida, 150 ml de AIM-V com soro AB humano a 5% e 3000 UI por ml de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37 ºC em CO_2 a 5%, e após 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 colhidas no dia 14 de cultura.

[001473] Em uma modalidade, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) é realizada em frascos com os TILs em massa sendo misturados com um excesso de 100 ou 200 vezes de células alimentadoras inativadas, 30 mg/ml de anticorpo anti-CD3 OKT3 e 3000 UI/ml de IL-2 em 150 ml de meio. Em algumas modalidades, a substituição do meio é feita até que as células sejam transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. Em algumas modalidades, 2/3 do meio são substituídos pela respiração com meio fresco. Em algumas modalidades, as câmaras de crescimento alternativas incluem frascos G-REX e recipientes

permeáveis a gás, conforme discutido mais detalhadamente abaixo.

[001474] Em uma modalidade, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) é realizada e compreende ainda uma etapa em que os TILs são selecionados para reatividade tumoral superior. Qualquer método de seleção conhecido na técnica pode ser usado. Por exemplo, os métodos descritos na Publicação do Pedido de Patente nº US 2016/0010058 A1, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência, podem ser usados para a seleção de TILs para reatividade tumoral superior.

[001475] Opcionalmente, um ensaio de viabilidade celular pode ser realizado após a segunda expansão (incluindo expansões referidas como a expansão REP), usando ensaios padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, um ensaio de exclusão de azul de tripano pode ser feito em uma amostra dos TILs em massa, que rotula seletivamente as células mortas e permite uma avaliação de viabilidade. Em algumas modalidades, as amostras TIL podem ser contadas e a viabilidade determinada usando um contador de células automatizado 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 descrito, por exemplo, no Exemplo 15.

[001476] Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) de TIL pode ser realizada usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gás, conforme 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 gás. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando frascos. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando frascos G-Rex permeáveis a gás. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada em frascos T-175, e cerca de 1 x

10^6 TIL são suspensos em cerca de 150 ml de meio e isso é adicionado a cada frasco T-175. Os TIL são cultivados com PBMC alogênicas irradiadas (50 Gy) como células "alimentadoras" em uma razão de 1 para 100 e as células foram cultivadas em uma mistura de 1 para 1 de meio CM e 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 a 5%. Em algumas modalidades, metade do meio é alterada no dia 5 usando 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 um saco de 3 l e 300 ml de AIM-V com soro AB humano a 5% e 3000 UI/ml de IL-2 são adicionados aos 300 ml de suspensão de TIL. O número de células em cada saco pode ser contado a cada dia ou dois, e meio fresco pode ser adicionado para manter a contagem de células entre cerca de 0,5 e cerca de 2,0 x 10^6 células/ml.

[001477] Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo expansões referidas como REP) são realizadas em frascos de 500 ml de capacidade com fundos de silício permeáveis a gás de 100 cm^2 (G-Rex 100, Wilson Wolf) (Figura 1), cerca de 5 x 10^6 ou 10 x 10^6 TILs são cultivados com PBMC alogênicas irradiadas a uma razão de 1 a 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-Rex 100 são incubados a 37 ºC em CO_2 a 5%. Em algumas modalidades, no dia 5, 250 ml de sobrenadante são removidos e colocados em garrafas de centrífuga e centrifugados a 1500 rpm (491 g) por 10 minutos. Os péletes de TIL 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-Rex 100 originais. Em modalidades em que os TILs são expandidos em série em frascos de G-Rex 100, no dia 7 os TIL em cada G-Rex 100 são suspensos nos 300 ml de meio presente em cada frasco e a suspensão de células foi dividida em três alíquotas de 100 ml que são usados para semear 3 frascos G-Rex 100. Em seguida, 150 ml de AIM-V com soro AB humano a 5% e 3000 UI/ml de

IL-2 são adicionados a cada frasco. Os 100 frascos G-Rex são incubados a 37 ºC em CO_2 a 5% e depois de 4 dias a 150 ml de AIM-V com 3000 UI/ml de IL-2 é adicionada a cada frasco G-Rex 100. As células são colhidas no dia 14 de cultura.

[001478] Os diversos receptores de antígenos dos linfócitos T e B são produzidos pela recombinação somática de um número limitado, mas um grande número de segmentos gênicos. Esses segmentos gênicos: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e as aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de células T (TCRs). A presente invenção fornece 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 na diversidade é um aumento na diversidade da imunoglobulina e/ou na diversidade do receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está na imunoglobulina, está na cadeia pesada de imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está na imunoglobulina, está na cadeia leve da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está no receptor de células T. Em algumas modalidades, a diversidade está em um dos receptores de células T selecionados do grupo que consiste em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de células T (TCR) beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de TCRab (ou seja, TCRα/β).

[001479] Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de

expansão (por exemplo, às vezes referido como CM2 ou o segundo meio de cultura de células) compreende IL-2, OKT-3, bem como as células alimentadoras de apresentação de antígeno (APCs), conforme discutido em mais detalhes abaixo.

[001480] Em algumas modalidades, a segunda expansão, por exemplo, Etapa D de acordo com a Figura 109, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o biorreator único empregado é, por exemplo, um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

[001481] Em algumas modalidades, o meio de cultura usado nos processos de expansão aqui divulgados é um meio sem soro ou um meio definido. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é usado para prevenir e/ou diminuir a variação experimental devido em parte à variação lote a lote de meios contendo soro.

[001482] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou reposição de soro. Em algumas modalidades, o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de

Dulbecco modificado por Iscove.

[001483] Em algumas modalidades, o suplemento de soro ou substituição de soro inclui, porém sem limitação, um ou mais de suplemento sérico de expansão de células T CTS™ OpTmizer, substituição de soro celular imune CTS™, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

[001484] Em algumas modalidades, a substituição de soro celular imune de células T CTS™OpTmizer™ é usada com meios de crescimento convencionais, incluindo, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001485] Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de

soro (% em volume) no meio sem soro ou no meio definido é de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio definido ou livre de soro total. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 3% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 5% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 10% do volume total do meio sem soro ou definido.

[001486] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM.

[001487] Em algumas modalidades, o meio definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™

OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e

cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2.

[001488] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM, ou 4 mM a cerca de 5 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

[001489] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM, ou cerca de 65 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

[001490] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos na Publicação PCT Internacional nº WO/1998/030679, que é incorporada no presente documento a título de referência, são úteis na presente invenção. Nessa publicação, são descritos meios de cultura de células eucarióticas sem

soro. O meio de cultura de células eucarióticas sem soro inclui um meio de cultura de células basais suplementado com um suplemento sem soro capaz de suportar o crescimento de células em cultura sem soro. O suplemento de meio de cultura de células eucarióticas sem soro compreende ou é obtido pela combinação de um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais elementos traço e um ou mais antibióticos. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou beta-mercaptoetanol. Em algumas modalidades, o meio definido compreende uma albumina ou um substituto da albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, um ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio de células basais é selecionado a partir do grupo que consiste no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), no meio mínimo essencial (MEM), no meio basal de Eagle (BME), em RPMI 1640, em F-10, em F-12, no meio mínimo essencial (αMEM), no meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), no meio de crescimento RPMI e no

meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001491] Em algumas modalidades, a concentração de glicina no meio definido está na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-histidina é de cerca de 5 a 250 mg/l, a concentração de L-isoleucina é de cerca de 5 a 300 mg/l, a concentração de L-metionina é de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-fenilalanina é de cerca de 5 a 400 mg/l, a concentração de L-prolina é de cerca de 1 a 1000 mg/l, a concentração de L-hidroxiprolina é de cerca de 1 a 45 mg/l, a concentração de L-serina é de cerca de 1 a 250 mg/l, a concentração de L-treonina é de cerca de 10 a 500 mg/l, a concentração de L-triptofano é de cerca de 2 a 110 mg/l, a concentração de L-tirosina é de cerca de 3 a 175 mg/l, a concentração de L-valina é de cerca de 5 a 500 mg/l, a concentração de tiamina é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de glutationa reduzida é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de ácido L-ascórbico-2-fosfato é de cerca de 1 a 200 mg/l, a concentração de transferrina saturada de ferro é de cerca de 1 a 50 mg/l, a concentração de insulina é de cerca 1 a 100 mg/l, a concentração de selenita de sódio é de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e a concentração de albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) é de cerca de 5000 a 50000 mg/l.

[001492] Em algumas modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração em 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas concentrações finais listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial de 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, o meio definido é um meio de células basais que compreende um suplemento sem soro. Em algumas dessas modalidades, o suplemento sem soro compreende ingredientes da porção química não-traço do tipo e nas concentrações listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial no suplemento" na

Tabela A abaixo.

TABELA A: CONCENTRAÇÕES DE INGREDIENTES DE PORÇÃO QUÍMICA DE ELEMENTO NÃO-TRAÇO

Ingrediente	Uma modalidade preferencial em suplemento (mg/l) (Cerca de)	Faixa de concentração em 1X meio (mg/l) (Cerca de)	Uma modalidade preferencial em 1X meio (mg/l) (Cerca de)
Glicina	150	5-200	53
L-Histidina	940	5-250	183
L-isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-fenilalanina	1800	5-400	336
L-Prolina	4000	1-1000	600
L-hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-treonina	2200	10-500	425
L-triptofano	440	2-110	82
L-tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutationa Reduzida	10	1-20	1,5
Ácido ascórbico-2-PO_4 (sal de Mg)	330	1-200	50
Transferrina (ferro saturado)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenita de Sódio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83000	5000-50000	12500

[001493] Em algumas modalidades, a osmolaridade do meio definido está entre cerca de 260 e 350 mOsmol. Em algumas modalidades, a osmolaridade está entre cerca de 280 e 310 mOsmol. Em algumas modalidades, o meio definido é suplementado com até cerca de 3,7 g/l, ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio. O meio definido pode ser suplementado com L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM), 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

[001494] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos em Smith, *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement", *Clin Transl Immunology*, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) são úteis na presente invenção. Resumidamente, RPMI ou CTS™ OpTmizer™ foi usado como o meio de células basais e suplementado com

substituição de soro celular imune CTS™ a 0, 2%, 5% ou 10%.

[001495] Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou segundo recipiente permeável a gás 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 permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

1. CÉLULAS ALIMENTADORAS E CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

[001496] Em uma modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos (por exemplo, incluindo expansão, tal como aqueles descritos na Etapa D da Figura 109, bem como aqueles referidos como REP) exigem um excesso de células alimentadoras durante a expansão REP TIL e/ou durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de unidades de sangue total padrão de doadores de sangue saudáveis. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão, como separação por gradiente Ficoll-Paque.

[001497] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos REP, conforme descrito nos exemplos, em particular no exemplo 14, que fornece um protocolo exemplificativo para avaliar a incompetência de replicação de PBMCs alogênicas irradiadas.

[001498] Em algumas modalidades, PBMCs são consideradas incompetentes para replicação e aceitas para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis no dia 14 for menor do que o número 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). Consultar, por exemplo, Exemplo 14.

[001499] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para a replicação e aceitas para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14 não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocado em cultura no dia 0 do REP e/ou no 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 ng/ml de anticorpo OKT3 e 3000 UI/ml de IL-2. Consultar, por exemplo, Exemplo 13.

[001500] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes para a replicação e aceitas para uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no dia 7 e no dia 14 não tiver aumentado desde o número inicial de células viáveis colocado em cultura no dia 0 do REP e/ou no dia 0 da segunda expansão (ou seja, o dia de início da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 5-60 ng/ml de anticorpo OKT3 e 1000-6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de anticorpo OKT3 10-50 ng/ml e 2000-5000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 20-40 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2000-4000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 25-35 ng/ml de anticorpo OKT3 e 2500-3500 UI/ml de IL-2.

[001501] Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno são PBMCs. Em algumas modalidades, as células alimentadoras de apresentação de antígeno são células alimentadoras artificiais de apresentação de antígeno. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão é cerca de 1 a 25, cerca de 1 a 50, cerca de 1 a 100, cerca de 1 a 125, cerca de

1 a 150, cerca de 1 a 175, cerca de 1 a 200, cerca de 1 a 225, cerca de 1 a 250, cerca de 1 a 275, cerca de 1 a 300, cerca de 1 a 325, cerca de 1 a 350, cerca de 1 a 375, cerca de 1 a 400 ou cerca de 1 a 500. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão está entre 1 e 50 e de 1 a 300. Em uma modalidade, a razão entre TILs e células alimentadoras apresentadoras de antígeno na segunda expansão está entre 1 e 100 e de 1 a 200.

[001502] Em uma modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem uma razão de cerca de 2,5 x 10^9 células alimentadoras para cerca de 100 x 10^6 TILs. Em outra modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem uma razão de cerca de 2,5 x 10^9 células alimentadoras para cerca de 50 x 10^6 TILs. Em ainda outra modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem cerca de 2,5 x 10^9 células alimentadoras a cerca de 25 x 10^6 TILs.

[001503] Em uma modalidade, os segundos procedimentos de expansão aqui descritos exigem um excesso de células alimentadoras durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células alimentadoras são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de unidades de sangue total padrão de doadores de sangue saudáveis. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão, como separação por gradiente Ficoll-Paque. Em uma modalidade, células apresentadoras de antígeno artificial (aAPC) são usadas no lugar de PBMCs.

[001504] Em geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por irradiação ou tratamento térmico, e usadas nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos.

[001505] Em uma modalidade, células de apresentação de antígeno artificial são usadas na segunda expansão como uma substituição para, ou em combinação com, PBMCs.

2. CITOCINAS

[001506] Os métodos de expansão aqui descritos geralmente usam meios de cultura com altas doses de uma citocina, em particular IL-2, como é conhecido na técnica.

[001507] Alternativamente, o uso de combinações de citocinas para a expansão rápida e/ou segunda expansão de TILS é adicionalmente possível, com combinações de duas ou mais de IL-2, IL-15 e IL-21, como é geralmente descrito na Publicação Internacional nº WO 2015/189356 e Publicação Internacional nº W WO 2015/189357, aqui expressamente incorporada a título de referência em sua totalidade. Assim, as combinações possíveis incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e IL-21, com o último encontrando uso particular em muitas modalidades. A utilização de combinações de citocinas favorece especificamente a geração de linfócitos e, em particular, de células T, conforme descrito no presente documento.

3. ANTICORPOS ANTI-CD3

[001508] Em algumas modalidades, o meio de cultura usado em métodos de expansão aqui descritos (incluindo aqueles referidos como REP, consultar, por exemplo, a Figura 109) 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 TIL. Este efeito pode ser observado com anticorpos de comprimento total, bem como fragmentos Fab e F(ab')2, sendo o primeiro geralmente preferencial; consultar, por exemplo, Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985,** *135,* 1719, incorporado no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[001509] Como será apreciado por aqueles na técnica, há uma série de anticorpos CD3 anti-humanos adequados que encontram uso na invenção, incluindo anticorpos policlonais e monoclonais de CD3 anti-humanos de vários mamíferos, incluindo, porém sem limitação, murino, anticorpos humanos, primatas, ratos e caninos. Em modalidades particulares, o anticorpo anti-CD3 OKT3 é usado (comercialmente disponível junto à Ortho-McNeil,

Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

E. ETAPA E: COLHER TILS

[001510] Após a segunda etapa de expansão, as células podem ser colhidas. Em algumas modalidades, os TILs são colhidos após uma, duas, três, quatro ou mais etapas de expansão, por exemplo, conforme fornecido na Figura 109. Em algumas modalidades, os TILs são colhidos após duas etapas de expansão, por exemplo, conforme fornecido na Figura 109.

[001511] Os TILs podem ser colhidos de qualquer maneira apropriada e estéril, incluindo, por exemplo, por centrifugação. Os métodos para a colheita de TIL são bem conhecidos na técnica e quaisquer desses métodos conhecidos podem ser empregados com o presente processo. Em algumas modalidades, os TILS são colhidos usando um sistema automatizado.

[001512] Coletores de células e/ou sistemas de processamento de células estão comercialmente disponíveis a partir de uma variedade de fontes, incluindo, por exemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer e Inotech Biosystems International, Inc. Qualquer coletor baseado em células pode ser empregado com os presentes métodos. Em algumas modalidades, o coletor de células e/ou sistemas de processamento de células é um coletor de células baseado em membrana. Em algumas modalidades, a colheita de células é feita por meio de um sistema de processamento de células, como o sistema LOVO (fabricado pela Fresenius Kabi). O termo "sistema de processamento de células LOVO" também se refere a qualquer instrumento ou dispositivo fabricado por qualquer fornecedor que pode bombear uma solução compreendendo células através de uma membrana ou filtro, como uma membrana giratória ou filtro giratório em um ambiente de sistema estéril e/ou fechado, permitindo fluxo contínuo e processamento de células para remover o sobrenadante ou meio de cultura de células sem peletização. Em algumas modalidades, o coletor de células e/ou sistema de processamento de células pode realizar separação de células, lavagem, troca de fluidos,

concentração e/ou outras etapas de processamento de células em um sistema estéril fechado.

[001513] Em algumas modalidades, a colheita, por exemplo, a Etapa E de acordo com a Figura 109, é realizada a partir de um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é empregado para a expansão de TIL, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, um único biorreator é empregado. Em algumas modalidades, o biorreator único empregado é, por exemplo, um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

F. ETAPA F: FORMULAÇÃO FINAL/TRANSFERÊNCIA PARA BOLSA DE INFUSÃO

[001514] Após as etapas de A a E, conforme fornecido em uma ordem exemplificativa na Figura 109 e conforme descrito em detalhes acima e aqui estarem completas, as células são transferidas para um recipiente para uso na administração a um paciente. Em algumas modalidades, uma vez que um número terapeuticamente suficiente de TILs é obtido usando os métodos de expansão descritos acima, eles são transferidos para um recipiente para uso na administração a um paciente.

[001515] Em uma modalidade, os TILs expandidos usando APCs da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. Os TILs expandidos usando PBMCs da presente divulgação podem ser administrados por qualquer via adequada, conforme conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas como uma única infusão intra-arterial ou intravenosa, que preferencialmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias de administração adequadas incluem intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

1. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, DOSAGENS E REGIMES DE DOSAGEM

[001516] Em uma modalidade, os TILs expandidos usando os métodos da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. Os TILs expandidos usando PBMCs da presente divulgação podem ser administrados por qualquer via adequada, conforme conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas como uma única infusão intra-arterial ou intravenosa, que preferencialmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias de administração adequadas incluem administração intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[001517] Qualquer dose adequada de TILs pode ser administrada. Em algumas modalidades, de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$ TILs são administrados, com uma média de cerca de $7,8 \times 10^{10}$ TILs, particularmente se o câncer for melanoma. Em uma modalidade, são administrados cerca de $1,2 \times 10^{10}$ a cerca de $4,3 \times 10^{10}$ de TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 3×10^{10} a cerca de 12×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 4×10^{10} a cerca de 10×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 5×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 6×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 7×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $7,8 \times 10^{10}$ TILs, particularmente se câncer é melanoma. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $1,2 \times 10^{10}$ a cerca de $4,3 \times 10^{10}$ de TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 3×10^{10} a cerca de 12×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a

dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 4×10^{10} a cerca de 10×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 5×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 6×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 7×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs.

[001518] Em algumas modalidades, o número de TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é de cerca de 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} e 9×10^{13}. Em uma modalidade, o número de TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de 1×10^6 a 5×10^6, 5×10^6 a 1×10^7, 1×10^7 a 5×10^7, 5×10^7 a 1×10^8, 1×10^8 a 5×10^8, 5×10^8 a 1×10^9, 1×10^9 a 5×10^9, 5×10^9 a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12}, 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[001519] 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% em p/p, p/v ou v/v da composição

farmacêutica.

[001520] 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% em p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001521] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,0001% a cerca de 50%, cerca de 0,001% a cerca de 40%, cerca de 0,01% a cerca de 30%, cerca de 0,02% a cerca de 29%, cerca de 0,03% a cerca de 28%, cerca de 0,04% a cerca de 27%, cerca de 0,05% a cerca de 26%, cerca de 0,06% a cerca de 25%, cerca de 0,07% a cerca de 24%, cerca de 0,08% a cerca de 23%, cerca de 0,09% a cerca de 22%, cerca de 0,1% a cerca de 21%, cerca de 0,2% a cerca de 20%, cerca de 0,3% a cerca de 19%, cerca de 0,4% a cerca de 18%, cerca de 0,5% a cerca de 17%, cerca de 0,6% a cerca de 16%, cerca de 0,7% a cerca de 15%, cerca de 0,8% a cerca de 14%, cerca de 0,9% a cerca de 12% ou cerca de 1% a cerca de 10% em p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001522] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos

nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,001% a cerca de 10%, cerca de 0,01% a cerca de 5%, cerca de 0,02% a cerca de 4,5%, cerca de 0,03% a cerca de 4%, cerca de 0,04% a cerca de 3,5%, cerca de 0,05% a cerca de 3%, cerca de 0,06% a cerca de 2,5%, cerca de 0,07% a cerca de 2%, cerca de 0,08% a cerca de 1,5%, cerca de 0,09% a cerca de 1%, cerca de 0,1% a cerca de 0,9% em p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001523] Em algumas modalidades, a quantidade de 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.

[001524] Em algumas modalidades, a quantidade de 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.

[001525] Os TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção são eficazes em uma ampla faixa de dosagem. A dosagem exata dependerá da via de administração, a forma em que o composto é administrado, o sexo e a idade do sujeito a ser tratado, o peso corporal do

sujeito a ser tratado e a preferência e experiência do médico assistente. As dosagens clinicamente estabelecidas dos TILs também podem ser usadas se apropriado. As quantidades das composições farmacêuticas administradas usando os métodos aqui descritos, tais como as dosagens de TILs, serão dependentes do ser humano ou mamífero a ser tratado, da gravidade do distúrbio ou condição, da taxa de administração, da disposição dos ingredientes farmacêuticos ativos e a critério do médico prescritor.

[001526] Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser por injeção, por exemplo, injeção intravenosa. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em doses múltiplas. A dosagem pode ser uma, duas, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais de seis vezes por ano. A dosagem pode ser uma vez por mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana ou uma vez em dias alternados. A administração de TILs pode continuar enquanto for necessário.

[001527] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs é de cerca de 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} e 9×10^{13}. Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de 1×10^6 a 5×10^6, 5×10^6 a 1×10^7, 1×10^7 a 5×10^7, 5×10^7 a 1×10^8, 1×10^8 a 5×10^8, 5×10^8 a 1×10^9, 1×10^9 a 5×10^9, 5×10^9 a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12}, 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[001528] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 4,3 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 3,6 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3,2 mg/kg, cerca de 0,35 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,3 mg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 1,3 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 1,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1 mg/kg, cerca de 0,55 mg/kg a cerca de 0,85 mg/kg, cerca de 0,65 mg/kg a cerca de 0,8 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 0,75 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,85 mg/kg a cerca de 2 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 1,85 mg/kg, cerca de 1,15 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 1,3 mg/kg mg a cerca de 1,6 mg/kg, cerca de 1,35 mg/kg a cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2,15 mg/kg a cerca de 3,6 mg/kg, cerca de 2,3 mg/kg a cerca de 3,4 mg/kg, cerca de 2,4 mg/kg a cerca de 3,3 mg/kg, cerca de 2,6 mg/kg a cerca de 3,15 mg/kg, cerca de 2,7 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, cerca de 2,8 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, ou cerca de 2,85 mg/kg a cerca de 2,95 mg/kg.

[001529] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg, cerca de 10 mg a cerca de 300 mg, cerca de 20 mg a cerca de 250 mg, cerca de 25 mg a cerca de 200 mg, cerca de 1 mg a cerca de 50 mg, cerca de 5 mg a cerca de 45 mg, cerca de 10 mg a cerca de 40 mg, cerca de 15 mg a cerca de 35 mg, cerca de 20 mg a cerca de 30 mg, cerca de 23 mg a cerca de 28 mg, cerca de 50 mg a cerca de 150 mg, cerca de 60 mg a cerca de 140 mg, cerca de 70 mg a cerca de 130 mg, cerca de 80 mg a cerca de 120 mg, cerca de 90 mg a cerca de 110 mg, ou cerca de 95 mg a cerca de 105 mg, cerca de 98 mg a cerca de 102 mg, cerca de 150 mg a cerca de 250 mg, cerca de 160 mg a cerca de 240 mg, cerca de 170 mg a cerca de 230 mg, cerca de 180 mg a cerca de 220 mg, cerca de 190 mg a cerca de 210 mg, cerca de 195 mg a cerca de 205 mg, ou cerca de 198 a cerca de 207 mg.

[001530] Uma quantidade eficaz dos TILs pode ser administrada em doses únicas ou múltiplas por qualquer um dos modos aceitos de administração de agentes com utilidades semelhantes, incluindo as vias intranasal e transdérmica, por injeção intra-arterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutânea, topicamente, por transplante ou por inalação.

IV. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, DOSAGENS E REGIMES DE DOSAGEM

[001531] Em uma modalidade, os TILs expandidos usando os métodos da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. Os TILs expandidos usando PBMCs da presente divulgação podem ser administrados por qualquer via adequada, conforme conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas como uma única infusão intra-arterial ou intravenosa, que preferencialmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias de administração adequadas incluem administração intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[001532] Qualquer dose adequada de TILs pode ser administrada. Em algumas modalidades, de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$ TILs são administrados, com uma média de cerca de $7,8 \times 10^{10}$ TILs, particularmente se o câncer for melanoma. Em uma modalidade, são administrados cerca de $1,2 \times 10^{10}$ a cerca de $4,3 \times 10^{10}$ de TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 3×10^{10} a cerca de 12×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 4×10^{10} a cerca de 10×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 5×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 6×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, são administrados cerca de 7×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem

terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $7,8 \times 10^{10}$ TILs, particularmente se câncer é melanoma. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $1,2 \times 10^{10}$ a cerca de $4,3 \times 10^{10}$ de TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 3×10^{10} a cerca de 12×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 4×10^{10} a cerca de 10×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 5×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 6×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 7×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs.

[001533] Em algumas modalidades, o número de TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção é de cerca de 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} e 9×10^{13}. Em uma modalidade, o número de TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de 1×10^6 a 5×10^6, 5×10^6 a 1×10^7, 1×10^7 a 5×10^7, 5×10^7 a 1×10^8, 1×10^8 a 5×10^8, 5×10^8 a 1×10^9, 1×10^9 a 5×10^9, 5×10^9 a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12}, 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[001534] 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% em p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001535] 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% em p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001536] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,0001% a cerca de 50%, cerca de 0,001% a cerca de 40%, cerca de 0,01% a cerca de 30%, cerca de 0,02% a cerca de 29%, cerca de 0,03% a cerca de 28%, cerca de 0,04% a cerca de 27%, cerca de 0,05% a cerca de 26%, cerca de 0,06% a cerca de 25%, cerca de 0,07% a cerca de 24%, cerca de 0,08% a cerca de 23%, cerca de 0,09% a cerca de 22%, cerca de 0,1% a cerca de 21%,

cerca de 0,2% a cerca de 20%, cerca de 0,3% a cerca de 19%, cerca de 0,4% a cerca de 18%, cerca de 0,5% a cerca de 17%, cerca de 0,6% a cerca de 16%, cerca de 0,7% a cerca de 15%, cerca de 0,8% a cerca de 14%, cerca de 0,9% a cerca de 12% ou cerca de 1% a cerca de 10% em p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001537] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,001% a cerca de 10%, cerca de 0,01% a cerca de 5%, cerca de 0,02% a cerca de 4,5%, cerca de 0,03% a cerca de 4%, cerca de 0,04% a cerca de 3,5%, cerca de 0,05% a cerca de 3%, cerca de 0,06% a cerca de 2,5%, cerca de 0,07% a cerca de 2%, cerca de 0,08% a cerca de 1,5%, cerca de 0,09% a cerca de 1%, cerca de 0,1% a cerca de 0,9% em p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[001538] Em algumas modalidades, a quantidade de 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.

[001539] Em algumas modalidades, a quantidade de 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.

[001540] Os TILs fornecidos nas composições farmacêuticas da invenção são eficazes em uma ampla faixa de dosagem. A dosagem exata dependerá da via de administração, a forma em que o composto é administrado, o sexo e a idade do sujeito a ser tratado, o peso corporal do sujeito a ser tratado e a preferência e experiência do médico assistente. As dosagens clinicamente estabelecidas dos TILs também podem ser usadas se apropriado. As quantidades das composições farmacêuticas administradas usando os métodos aqui descritos, tais como as dosagens de TILs, serão dependentes do ser humano ou mamífero a ser tratado, da gravidade do distúrbio ou condição, da taxa de administração, da disposição dos ingredientes farmacêuticos ativos e a critério do médico prescritor.

[001541] Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser por injeção, por exemplo, injeção intravenosa. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em doses múltiplas. A dosagem pode ser uma, duas, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais de seis vezes por ano. A dosagem pode ser uma vez por mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana ou uma vez em dias alternados. A administração de TILs pode continuar enquanto for necessário.

[001542] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs é de cerca de 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, $7 \times$

10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} e 9×10^{13}. Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de 1×10^{6} a 5×10^{6}, 5×10^{6} a 1×10^{7}, 1×10^{7} a 5×10^{7}, 5×10^{7} a 1×10^{8}, 1×10^{8} a 5×10^{8}, 5×10^{8} a 1×10^{9}, 1×10^{9} a 5×10^{9}, 5×10^{9} a 1×10^{10}, 1×10^{10} a 5×10^{10}, 5×10^{10} a 1×10^{11}, 5×10^{11} a 1×10^{12}, 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13}.

[001543] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 4,3 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 3,6 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3,2 mg/kg, cerca de 0,35 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,3 mg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 1,3 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 1,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1 mg/kg, cerca de 0,55 mg/kg a cerca de 0,85 mg/kg, cerca de 0,65 mg/kg a cerca de 0,8 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 0,75 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,85 mg/kg a cerca de 2 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 1,85 mg/kg, cerca de 1,15 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 1,3 mg/kg mg a cerca de 1,6 mg/kg, cerca de 1,35 mg/kg a cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2,15 mg/kg a cerca de 3,6 mg/kg, cerca de 2,3 mg/kg a cerca de 3,4 mg/kg, cerca de 2,4 mg/kg a cerca de 3,3 mg/kg, cerca de 2,6 mg/kg a cerca de 3,15 mg/kg, cerca de 2,7 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, cerca de 2,8 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, ou cerca de 2,85 mg/kg a cerca de 2,95 mg/kg.

[001544] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg, cerca de 10 mg a cerca de 300 mg, cerca de 20 mg a cerca de 250 mg, cerca de 25 mg a cerca de 200 mg, cerca de 1 mg a cerca de 50 mg, cerca de 5 mg a cerca de 45 mg, cerca de 10 mg a cerca de 40 mg, cerca de 15 mg a cerca de 35 mg, cerca de 20 mg a cerca de 30 mg, cerca de 23 mg a cerca de 28 mg, cerca de 50 mg a cerca de 150 mg, cerca de 60 mg a cerca de 140 mg, cerca de 70 mg a cerca de 130

mg, cerca de 80 mg a cerca de 120 mg, cerca de 90 mg a cerca de 110 mg, ou cerca de 95 mg a cerca de 105 mg, cerca de 98 mg a cerca de 102 mg, cerca de 150 mg a cerca de 250 mg, cerca de 160 mg a cerca de 240 mg, cerca de 170 mg a cerca de 230 mg, cerca de 180 mg a cerca de 220 mg, cerca de 190 mg a cerca de 210 mg, cerca de 195 mg a cerca de 205 mg, ou cerca de 198 a cerca de 207 mg.

[001545] Uma quantidade eficaz dos TILs pode ser administrada em doses únicas ou múltiplas por qualquer um dos modos aceitos de administração de agentes com utilidades semelhantes, incluindo as vias intranasal e transdérmica, por injeção intra-arterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutânea, topicamente, por transplante ou por inalação.

[001546] Em outra modalidade, a invenção fornece uma bolsa de infusão que compreende a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima.

[001547] Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) compreendendo a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima e um carreador farmaceuticamente aceitável.

[001548] Em outra modalidade, a invenção fornece um saco de infusão que compreende a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima.

[001549] Em outra modalidade, a invenção fornece uma preparação criopreservada da população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima.

[001550] Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) compreendendo a população terapêutica de TILs descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima e um meio de criopreservação.

[001551] Em outra modalidade, a invenção fornece a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o meio de criopreservação contenha DMSO.

[001552] Em outra modalidade, a invenção fornece a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o meio de criopreservação contenha DMSO a 7% a 10%.

[001553] Em algumas modalidades, a invenção fornece as composições de TIL compreendendo TILs em meio sem soro ou um meio definido. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é usado para prevenir e/ou diminuir a variação experimental devido em parte à variação lote a lote de meios contendo soro.

[001554] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou reposição de soro. Em algumas modalidades, o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001555] Em algumas modalidades, o suplemento de soro ou substituição de soro inclui, porém sem limitação, um ou mais de suplemento sérico de expansão de células T CTS™ OpTmizer, substituição de soro celular imune CTS™, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um

ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

[001556] Em algumas modalidades, a substituição de soro celular imune de células T CTS™OpTmizer™ é usada com meios de crescimento convencionais, incluindo, porém sem limitação, o meio basal de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™, o meio CTS™ AIM-V, o SFM CTS™ AIM-V, o meio livre de Xeno de expansão de células T LymphoONE™, o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o meio mínimo essencial (MEM), o meio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, o meio mínimo essencial (αMEM), o meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), o meio de crescimento RPMI e o meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001557] Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro (% em volume) no meio sem soro ou no meio definido é de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio definido ou livre de soro total. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 3% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas

modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 5% do volume total do meio sem soro ou definido. Em algumas modalidades, a concentração total de reposição de soro é de cerca de 10% do volume total do meio sem soro ou definido.

[001558] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM.

[001559] Em algumas modalidades, o meio definido é CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Qualquer formulação de CTS™ OpTmizer™ é útil na presente invenção. CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM é uma combinação de 1 litro do meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium e 26 ml de CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement, que são misturados juntos antes do uso. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), junto com 2-mercaptoetanol a 55 mM. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55

mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 mM de 2-mercaptoetanol, e 2 mM de L-glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e 55 mM de 2-mercaptoetanol, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 6000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 1000 UI/ml a cerca de 8000 UI/ml de IL-2. Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 3000 UI/ml de IL-2.

Em algumas modalidades, o SFM de expansão de células T CTS™ OpTmizer™ é suplementado com cerca de 3% da substituição de soro celular imune CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) e cerca de 2 mM glutamina, e compreende ainda cerca de 6000 UI/ml de IL-2.

[001560] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM, ou 4 mM a cerca de 5 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com glutamina (ou seja, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

[001561] Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM, ou cerca de 65 mM. Em algumas modalidades, o meio sem soro ou meio definido é suplementado com 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

[001562] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos na Publicação PCT Internacional nº WO/1998/030679, que é incorporada no presente documento a título de referência, são úteis na presente invenção. Nessa publicação, são descritos meios de cultura de células eucarióticas sem soro. O meio de cultura de células eucarióticas sem soro inclui um meio de cultura de células basais suplementado com um suplemento sem soro capaz de suportar o crescimento de células em cultura sem soro. O suplemento de meio de cultura de células eucarióticas sem soro compreende ou é obtido pela combinação de um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste

em uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno, um ou mais elementos traço e um ou mais antibióticos. Em algumas modalidades, o meio definido compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou beta-mercaptoetanol. Em algumas modalidades, o meio definido compreende uma albumina ou um substituto da albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em um ou mais aminoácidos, uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina, um ou mais antioxidantes, um ou mais insulinas ou substitutos da insulina, um ou mais precursores de colágeno e um ou mais elementos traço. Em algumas modalidades, o meio definido compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções de elementos traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3}", Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}. Em algumas modalidades, o meio de células basais é selecionado a partir do grupo que consiste no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), no meio mínimo essencial (MEM), no meio basal de Eagle (BME), em RPMI 1640, em F-10, em F-12, no meio mínimo essencial (αMEM), no meio mínimo essencial de Glasgow (G-MEM), no meio de crescimento RPMI e no meio de Dulbecco modificado por Iscove.

[001563] Em algumas modalidades, a concentração de glicina no meio definido está na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, a concentração de L-histidina é de cerca de 5 a 250 mg/l, a concentração de L-isoleucina é de cerca de 5 a 300 mg/l, a concentração de L-metionina é de cerca de 5 a 200 mg/l, a

concentração de L-fenilalanina é de cerca de 5 a 400 mg/l, a concentração de L-prolina é de cerca de 1 a 1000 mg/l, a concentração de L-hidroxiprolina é de cerca de 1 a 45 mg/l, a concentração de L-serina é de cerca de 1 a 250 mg/l, a concentração de L-treonina é de cerca de 10 a 500 mg/l, a concentração de L-triptofano é de cerca de 2 a 110 mg/l, a concentração de L-tirosina é de cerca de 3 a 175 mg/l, a concentração de L-valina é de cerca de 5 a 500 mg/l, a concentração de tiamina é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de glutationa reduzida é de cerca de 1 a 20 mg/l, a concentração de ácido L-ascórbico-2-fosfato é de cerca de 1 a 200 mg/l, a concentração de transferrina saturada de ferro é de cerca de 1 a 50 mg/l, a concentração de insulina é de cerca 1 a 100 mg/l, a concentração de selenita de sódio é de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e a concentração de albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) é de cerca de 5000 a 50000 mg/l.

[001564] Em algumas modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração em 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, os ingredientes da porção química de elemento não-traço no meio definido estão presentes nas concentrações finais listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial de 1X meio" na Tabela A abaixo. Em outras modalidades, o meio definido é um meio de células basais que compreende um suplemento sem soro. Em algumas dessas modalidades, o suplemento sem soro compreende ingredientes da porção química não-traço do tipo e nas concentrações listadas na coluna sob o título "Uma modalidade preferencial no suplemento" na Tabela A abaixo.

TABELA A: CONCENTRAÇÕES DE INGREDIENTES DE PORÇÃO QUÍMICA DE ELEMENTO NÃO-TRAÇO

Ingrediente	Uma modalidade preferencial em suplemento (mg/l) (Cerca de)	Faixa de concentração em 1X meio (mg/l) (Cerca de)	Uma modalidade preferencial em 1X meio (mg/l) (Cerca de)
Glicina	150	5-200	53

Ingrediente	Uma modalidade preferencial em suplemento (mg/l) (Cerca de)	Faixa de concentração em 1X meio (mg/l) (Cerca de)	Uma modalidade preferencial em 1X meio (mg/l) (Cerca de)
L-Histidina	940	5-250	183
L-isoleucina	3400	5-300	615
L-Metionina	90	5-200	44
L-fenilalanina	1800	5-400	336
L-Prolina	4000	1-1000	600
L-hidroxiprolina	100	1-45	15
L-Serina	800	1-250	162
L-treonina	2200	10-500	425
L-triptofano	440	2-110	82
L-tirosina	77	3-175	84
L-Valina	2400	5-500	454
Tiamina	33	1-20	9
Glutationa Reduzida	10	1-20	1,5
Ácido ascórbico-2-PO_4 (sal de Mg)	330	1-200	50
Transferrina (ferro saturado)	55	1-50	8
Insulina	100	1-100	10
Selenita de Sódio	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83000	5000-50000	12500

[001565] Em algumas modalidades, a osmolaridade do meio definido está entre cerca de 260 e 350 mOsmol. Em algumas modalidades, a osmolaridade está entre cerca de 280 e 310 mOsmol. Em algumas modalidades, o meio definido é suplementado com até cerca de 3,7 g/l, ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio. O meio definido pode ser suplementado com L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM), 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

[001566] Em algumas modalidades, os meios definidos descritos em Smith, *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement", *Clin Transl Immunology*, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) são úteis na presente invenção. Resumidamente, RPMI ou CTS™ OpTmizer™ foi usado como o meio de células basais e suplementado com substituição de soro celular imune CTS™ a 0, 2%, 5% ou 10%.

[001567] Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou segundo recipiente permeável a gás 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 permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

[001568] Em outra modalidade, a invenção fornece uma preparação criopreservada da composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima.

V. MÉTODOS DE TRATAMENTO DE PACIENTES

[001569] Os métodos de tratamento começam com a coleta inicial de TIL e cultura de TILs. Tais métodos foram ambos descritos na técnica por, por exemplo, Jin *et al., J. Immunotherapy*, **2012**, 35 (3): 283-292, incorporado no presente documento a título de referência na sua totalidade. As modalidades de métodos de tratamento são descritas ao longo das seções abaixo, incluindo os Exemplos.

[001570] Os TILs expandidos produzidos de acordo com os métodos descritos neste documento, incluindo, por exemplo, conforme descrito nas Etapas A a F acima ou de acordo com as Etapas A a F acima (também como mostrado, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) encontram uso particular no tratamento de pacientes com câncer (por exemplo, conforme descrito em Goff, et al., *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34 (20): 2389-239, bem como o conteúdo suplementar; incorporado a título de referência neste documento em sua totalidade. Em algumas modalidades, os TIL foram cultivados a partir de depósitos ressecados de melanoma metastático, conforme descrito anteriormente (consultar, Dudley, et al., *J Immunother*., **2003**, 26: 332-342; incorporado a título de referência neste documento em sua totalidade). O tumor fresco pode ser dissecado em condições estéreis. Uma amostra representativa pode ser coletada para análise patológica formal. Podem ser usados fragmentos únicos 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 poços individuais de uma placa de 24 poços, mantidas em meio de crescimento com IL-2 de alta dose (6000 UI/ml) e monitoradas quanto à destruição do tumor e/ou proliferação de TIL. Qualquer tumor com células viáveis remanescentes após o processamento pode ser digerido enzimaticamente em uma suspensão de célula única e criopreservado, conforme descrito neste documento.

[001571] Em algumas modalidades, TIL crescido com sucesso pode ser amostrado para análise de fenótipo (CD3, CD4, CD8 e CD56) e testado contra tumor autólogo, quando disponível. TIL pode ser considerado reativo se a cocultura durante a noite produziu níveis de interferon-gama (IFN-γ) > 200 pg/ml e duas vezes o fundo. (Goff, et al., *J Immunother.*, **2010**, 33: 840-847; incorporado a título de referência neste documento em sua totalidade). Em algumas modalidades, as culturas com evidência de reatividade autóloga ou padrões de crescimento suficientes podem ser selecionadas para uma segunda expansão (por exemplo, uma segunda expansão conforme fornecido de acordo com a Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C)), incluindo segundas expansões que às vezes são chamadas de 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 alta reatividade autóloga (por exemplo, alta proliferação durante a segunda expansão, conforme fornecido na Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) são selecionados para uma segunda expansão adicional de acordo com Etapa D da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C).

[001572] Em algumas modalidades, o paciente não é movido

diretamente para ACT (transferência de células adotivas), por exemplo, em algumas modalidades, após a colheita do tumor e/ou uma primeira expansão, as células não são utilizadas imediatamente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser criopreservados e descongelados 2 dias antes da administração a um paciente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser criopreservados e descongelados 1 dia antes da administração a um paciente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser criopreservados e descongelados imediatamente antes da administração a um paciente.

[001573] Fenótipos celulares de amostras criopreservadas de saco de infusão TIL podem ser analisados por citometria de fluxo (por exemplo, FlowJo) para marcadores de superfície CD3, CD4, CD8, CCR7 e CD45RA (BD BioSciences), bem como por qualquer um dos métodos aqui descritos. As citocinas séricas podem ser medidas usando técnicas de ensaio de imunoabsorção enzimática padrão. Um aumento no IFN-g sérico pode ser definido como >100 pg/ml e pelo menos 4 vezes ou pelo menos 3 vezes ou pelo menos 2 vezes ou pelo menos 1 vez maior do que os níveis basais de IFN-g sérico. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >1000 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >200 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >250 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >300 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >350 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >400 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >450 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >500 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >550 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >600 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >650 pg/ml. Em

algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >700 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >750 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >800 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >850 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >900 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >950 pg/ml. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-g sérico é definido como >1000 pg/ml.

[001574] Em algumas modalidades, os TILs produzidos pelos métodos fornecidos neste documento, por exemplo aqueles exemplificados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), fornecem uma melhora surpreendente na eficácia clínica dos TILs. Em algumas modalidades, os TILs produzidos pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo aqueles exemplificados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), exibem eficácia clínica aumentada em comparação com TILs produzidos por métodos diferentes daqueles descritos aqui, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles exemplificados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, os métodos diferentes daqueles descritos neste documento incluem métodos referidos como processo 1C e/ou Geração 1 (Gen 1). Em algumas modalidades, o aumento da eficácia é medido por DCR, ORR e/ou outras respostas clínicas. Em algumas modalidades, os TILS produzidos pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo aqueles exemplificados na Figura 1 (em particular, por exemplo, a Figura 1B e/ou a Figura 1C), exibem um tempo de resposta e perfil de segurança semelhantes em comparação com os TILs produzidos pelos métodos diferentes daqueles aqui descritos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles exemplificados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), por exemplo, o processo Gen 1.

[001575] 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 para a produção de IFN-γ é empregado. A produção de IFN-γ é outra medida do potencial citotóxico. A produção de IFN-γ pode ser medida determinando os níveis de citocina IFN-γ no sangue, soro ou TILs *ex vivo* de um sujeito tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles conforme descrito por exemplo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, um aumento no IFN-γ é indicativo da eficácia do tratamento em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, o IFN-γ é aumentado uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, ou cinco vezes ou mais em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada uma vez em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada duas vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada três vezes em comparação

com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada quatro vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada cinco vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, IFN-γ é medido usando um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido em TILs *ex vivo* de um sujeito tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos por exemplo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, IFN-γ é medido no sangue de um sujeito tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles como descritos, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, IFN-γ é medido em soro de TILs de um sujeito tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles como descritos, por exemplo, na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C).

[001576] Em algumas modalidades, os TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos por exemplo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), exibem

policlonalidade aumentada em comparação com TILs produzidos por outros métodos, incluindo aqueles não exemplificados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), tais como, por exemplo, métodos referidos como métodos de processo 1C. Em algumas modalidades, a policlonalidade significativamente melhorada e/ou policlonalidade aumentada é indicativa de eficácia do tratamento e/ou eficácia clínica aumentada. Em algumas modalidades, a policlonalidade se refere à diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, um aumento na policlonalidade pode ser indicativo da eficácia do tratamento no que diz respeito 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 com os TILs preparados usando métodos diferentes daqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes aqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada uma vez em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada duas vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada dez vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura

1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 100 vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 500 vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 1000 vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C).

[001577] As medidas de eficácia podem incluir a taxa de controle da doença (DCR), bem como a taxa de resposta geral (ORR), como conhecido na técnica, bem como aqui descrito.

1. MÉTODOS DE TRATAMENTO DE CÂNCER E OUTRAS DOENÇAS

[001578] As composições e métodos aqui descritos podem ser usados em um método para o tratamento de doenças. Em uma modalidade, eles são para uso no tratamento de distúrbios hiperproliferativos. Eles também podem ser usados no tratamento de outros distúrbios, conforme descrito neste documento e nos parágrafos seguintes.

[001579] Em algumas modalidades, o distúrbio hiperproliferativo é câncer. Em algumas modalidades, o distúrbio hiperproliferativo é um câncer de tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer de tumor sólido é selecionado do grupo que consiste em glioblastoma (GBM), câncer

gastrointestinal, melanoma, câncer de ovário, câncer endometrial, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), câncer renal e carcinoma de células renais. Em algumas modalidades, o distúrbio hiperproliferativo é uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, o câncer de tumor sólido é selecionado do 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 de células do manto.

[001580] Em algumas modalidades, o câncer é um fenótipo de câncer hipermutado. Os cânceres hipermutados são amplamente descritos em Campbell, et al. (Cell, 171:1042-1056 (2017); incorporado a título de referência neste documento em sua totalidade para todos os fins). Em algumas modalidades, os tumores hipermutados compreendem entre 9 e 10 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores hipermutados pediátricos compreendem 9,91 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores hipermutados adultos compreendem 9 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores hipermutados intensificados compreendem entre 10 e 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores hipermutados pediátricos aumentados compreendem entre 10 e 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores hipermutados adultos aumentados compreendem entre 10 e 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores ultra-hipermutados compreendem mais de 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores ultra-hipermutados pediátricos compreendem mais de 100 mutações por megabase (Mb). Em algumas modalidades, os tumores ultra-hipermutados adultos compreendem

mais de 100 mutações por megabase (Mb).

[001581] Em algumas modalidades, os tumores hipermutados têm mutações nas vias de reparo de replicação. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados têm mutações em polimerases de DNA associadas ao reparo de replicação. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados têm instabilidade de microssatélites. Em algumas modalidades, os tumores ultra-hipermutados têm mutações em polimerases de DNA associadas ao reparo de replicação e têm instabilidade de microssatélites. Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor está correlacionada com a resposta aos inibidores do ponto de controle imunológico. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados são resistentes ao tratamento com inibidores do ponto de controle imunológico. Em algumas modalidades, os tumores hipermutados podem ser tratados usando os TILs da presente invenção. Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor é causada por fatores ambientais (exposições extrínsecas). Por exemplo, a luz ultravioleta pode ser a causa primária do alto número de mutações no melanoma maligno (consultar, por exemplo, Pfeifer, GP, You, YH 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 do tabaco para tumores do pulmão e laringe, bem como outros tumores, devido à exposição direta a mutagênicos (consultar, por exemplo, Pleasance, E.D., Stephens, 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 pela desregulação da enzima de edição de mRNA da apolipoproteína B, membros da família semelhantes a polipeptídeos catalíticos (APOBEC), que demonstrou resultar em níveis aumentados de transições C para T em uma ampla gama de cânceres (consultar, 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 pelo reparo da replicação do DNA defeituoso por mutações que comprometem a revisão, que é realizada pelas principais enzimas replicativas Pol3 e Pold1. Em algumas modalidades, a hipermutação no tumor é causada por defeitos no reparo de incompatibilidade de DNA, que estão associados à hipermutação em câncer colorretal, endometrial e outros (consultar, 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, as mutações de reparo de replicação de DNA também são encontradas em síndromes de predisposição de câncer, como deficiência de reparo de incompatibilidade constitucional ou bialélica (CMMRD), síndrome de Lynch e polipose associada à revisão de polimerase (PPAP).

[001582] 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 intensificado. 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.

[001583] 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 divulgação. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d por 2 dias (dias 27 e 26 antes da infusão de TIL) e fludarabina 25 mg/m^2/d por 5 dias (dias 27

a 23 antes de infusão de TIL). Em uma modalidade, após quimioterapia não mieloablativa e infusão de TIL (no dia 0) de acordo com a presente divulgação, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 por via intravenosa a 720000 UI/kg a cada 8 horas até a tolerância fisiológica.

[001584] A eficácia dos compostos e combinações de compostos aqui descritos no tratamento, prevenção e/ou gestão das doenças ou distúrbios indicados pode ser testada usando vários modelos conhecidos na técnica, que fornecem orientação para o tratamento de doenças humanas. Por exemplo, modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer de ovário são descritos, por exemplo, em Mullany, *et al.*, *Endocrinology* **2012,** *153,* 1585-92; e Fong, *et al.*, *J. Ovarian 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 a eficácia de tratamentos para câncer de mama são descritos, por exemplo, em Fantozzi, *Breast Cancer Res.* **2006,** *8,* 212. Modelos para determinar a eficácia de tratamentos para melanoma são descritos, por exemplo, 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, por exemplo, em Meuwissen, *et al.*, *Genes & Development*, **2005,** *19,* 643-664. Modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer de pulmão são descritos, por exemplo, em Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2009,** *2,* 55-60; e Sano, *Head Neck Oncol.* **2009,** *1,* 32.

[001585] Em algumas modalidades, IFN-gama (IFN-γ) é indicativo da eficácia do tratamento para o tratamento do 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 para a produção de IFN-γ é empregado. A produção de IFN-γ é outra medida do potencial citotóxico. A produção de IFN-γ pode ser medida determinando-

se os níveis de citocina IFN-γ no sangue de um sujeito tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos por exemplo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, os TILs obtidos pelo presente método fornecem IFN-γ aumentado no sangue de indivíduos tratados com os TILs do presente método em comparação com indivíduos tratados com TILs preparados usando métodos referidos como o processo Gen 3, conforme exemplificado na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C) e em todo este pedido. Em algumas modalidades, um aumento no IFN-γ é indicativo da eficácia do tratamento em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, o IFN-γ é aumentado uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, ou cinco vezes ou mais em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada uma vez em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada duas vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada três vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado

com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada quatro vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a secreção de IFN-γ é aumentada cinco vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, IFN-γ é medido usando um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido usando um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN-γ é medido 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.

[001586] Em algumas modalidades, os TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles descritos por exemplo na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), exibem policlonalidade aumentada em comparação com TILs produzidos por outros métodos, incluindo aqueles não exemplificados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), tais como, por exemplo, métodos referidos como métodos de processo 1C. Em algumas modalidades, a policlonalidade significativamente melhorada e/ou policlonalidade aumentada

é indicativa da eficácia do tratamento e/ou eficácia clínica aumentada para o tratamento do câncer. Em algumas modalidades, a policlonalidade se refere à diversidade do repertório de células T. Em algumas modalidades, um aumento na policlonalidade pode ser indicativo da eficácia do tratamento no que diz respeito 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 com os TILs preparados usando métodos diferentes daqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes aqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada uma vez em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada duas vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada dez vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 100 vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura

1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 500 vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Em algumas modalidades, a policlonalidade é aumentada 1000 vezes em comparação com um paciente não tratado e/ou em comparação com um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui fornecidos, incluindo, por exemplo, métodos diferentes daqueles incorporados na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C).

2. MÉTODOS DE COADMINISTRAÇÃO

[001587] Em algumas modalidades, os TILs produzidos conforme descrito neste documento, incluindo, por exemplo, TILs derivados de um método descrito nas Etapas A a F da Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C), podem ser administrados em combinação com um ou mais reguladores de ponto de verificação imunológico, como os anticorpos descritos abaixo. Por exemplo, os anticorpos que têm como alvo PD-1 e que podem ser coadministrados com os TILs da presente invenção incluem, por exemplo, porém sem limitação, nivolumabe (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumabe (lambrolizumabe, MK03475 ou MK-3475, Merck; Keytruda®), anticorpo anti-PD-1 humanizado JS001 (ShangHai JunShi), anticorpo monoclonal anti-PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), Pidilizumab (anti-PD-1 mAb CT-011, Medivation), anticorpo monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) e/ou anticorpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), anticorpo monoclonal humano REGN2810 (Regeneron), anticorpo monoclonal humano MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) e/ou anticorpo humanizado anti-PD-1 IgG4 PDR001 (Novartis). Em algumas modalidades, o anticorpo PD-1 é do clone: RMP1-14

(IgG de rato) - número de catálogo da BioXcell BP0146. Outros anticorpos adequados, adequados para uso em métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F, conforme descrito neste documento, são anticorpos anti-PD-1 divulgados na Patente nº US 8.008.449, incorporada no presente documento a título de referência. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente a PD-L1 e inibe sua interação com PD-1, aumentando assim a atividade imunológica. Quaisquer anticorpos conhecidos na técnica que se ligam a PD-L1 e interrompem a interação entre PD-1 e PD-L1, e estimulam uma resposta imune antitumoral, são adequados para uso em métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F conforme descrito neste documento. Por exemplo, os anticorpos que têm como alvo PD-L1 e estão em ensaios clínicos, incluem BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) e MPDL3280A (Genentech). Outros anticorpos adequados que têm como alvo PD-L1 são divulgados na Patente nº US 7.943.743, incorporada no presente documento a título de referência. Será entendido por aqueles versados na técnica comum que qualquer anticorpo que se liga a PD-1 ou PD-L1 interrompe a interação PD-1/PD-L1 e estimula uma resposta imune antitumoral, é adequado para uso em métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as etapas A a F, conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, o sujeito que recebe a administração da combinação de TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F recebe a coadministração de um anticorpo anti-PD-1 quando o paciente tem 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 e anti-PD-1 quando o paciente tem melanoma refratário. Em algumas modalidades, o paciente recebe TILs em combinação com um anti-PD-1 quando o paciente tem carcinoma pulmonar de células não pequenas (NSCLC).

3. PRÉ-CONDICIONAMENTO DE LINFODEPLEÇÃO OPCIONAL DE

PACIENTES

[001588] 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 divulgação. 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 (dias 27 e 26 antes da infusão de TIL) e fludarabina 25 mg/m^2/d por 5 dias (dias 27 a 23 antes de infusão de TIL). Em uma modalidade, após quimioterapia não mieloablativa e infusão de TIL (no dia 0) de acordo com a presente divulgação, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 (aldesleucina, disponível comercialmente como PROLEUKIN) por via intravenosa a 720000 UI/kg a cada 8 horas à tolerância fisiológica. Em certas modalidades, a população de TILs é para uso no tratamento de câncer em combinação com IL-2, em que IL-2 é administrada após a população de TILs.

[001589] Resultados experimentais indicam que a linfodepleção antes da transferência adotiva de linfócitos T específicos do tumor desempenha um papel fundamental no aumento da eficácia do tratamento eliminando-se células T reguladoras e elementos concorrentes do sistema imunológico (“sumidouros de citocinas”). Consequentemente, algumas modalidades da invenção utilizam uma etapa de linfodepleção (às vezes também referida como "condicionamento imunossupressor") no paciente antes da introdução dos TILs da invenção.

[001590] Em geral, a linfodepleção é alcançada usando a administração de fludarabina ou ciclofosfamida (a forma ativa sendo referida como mafosfamida) e combinações das mesmas. Esses 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 são incorporados a título de referência neste documento em sua totalidade.

[001591] Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma concentração de 0,5 μg/ml-10 μg/ml de fludarabina. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma concentração de 1 μg/ml de fludarabina. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada na dosagem de 10 mg/kg/dia, 15 mg/kg/dia, 20 mg/kg/dia¸ 25 mg/kg/dia, 30 mg/kg/dia, 35 mg/kg/dia, 40 mg/kg/dia ou 45 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 2-7 dias 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.

[001592] Em algumas modalidades, a mafosfamida, a forma ativa da ciclofosfamida, é obtida em uma concentração de 0,5 μg/ml-10 μg/ml por administração de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, a mafosfamida, a forma ativa da ciclofosfamida, é obtida a uma concentração de 1 μg/ml por 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 ou 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada em uma dosagem 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 por via intravenosa (ou seja, iv). 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 iv. Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 4 dias a 250 mg/m^2/dia i.v.

[001593] Em algumas modalidades, a linfodepleção é realizada pela administração de fludarabina e ciclofosfamida em conjunto a um paciente. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada a 25 mg/m^2/dia iv e a ciclofosfamida é administrada a 250 mg/m^2/dia iv ao longo de 4 dias.

[001594] 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. REGIMES DE IL-2

[001595] Em uma modalidade, o regime de IL-2 compreende um regime de IL-2 de alta dose, em que o regime de IL-2 de alta dose compreende aldesleucina, ou um biossimilar ou variante do mesmo, administrado por via intravenosa a partir do dia após a administração de uma porção terapeuticamente eficaz da população terapêutica de TILs, em que a aldesleucina ou um biossimilar ou variante do mesmo é administrada em uma dose de 0,037 mg/kg ou 0,044 mg/kg UI/kg (massa corporal do paciente) usando infusões intravenosas em bolus de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância, por um máximo de 14 doses. Após 9 dias de descanso, este esquema pode ser repetido por mais 14 doses, por um máximo de 28 doses no total.

[001596] Em uma modalidade, o regime de IL-2 compreende um regime decrescente de IL-2. Os regimes decrescentes 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, cujas divulgações são incorporadas no presente documento a título de referência. Em uma modalidade, um regime decrescente de IL-2 compreende 18×10^6 UI/m^2 administradas por via intravenosa ao longo de 6 horas, seguido por 18×10^6 UI/m^2 administradas por via intravenosa ao longo de 12

horas, seguido por 18×10^6 UI/m^2 administradas por via intravenosa ao longo de 24 horas, seguido por $4,5 \times 10^6$ UI/m^2 administradas por via intravenosa em 72 horas. Este ciclo de tratamento pode ser repetido a cada 28 dias por um máximo de quatro ciclos. Em uma modalidade, um regime decrescente de IL-2 compreende 18000000 UI/m^2 no dia 1, 9000000 UI/m^2 no dia 2, e 4500000 UI/m^2 nos dias 3 e 4.

[001597] Em uma modalidade, o regime de IL-2 compreende a administração de IL-2 peguilada a cada 1, 2, 4, 6, 7, 14 ou 21 dias a uma dose de 0,10 mg/dia a 50 mg/dia.

5. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULA

[001598] A transferência adotiva de células (ACT) é uma forma eficaz de imunoterapia e envolve a transferência de células do sistema imunológico com atividade antitumoral para pacientes com câncer. A ACT é uma abordagem de tratamento que envolve a identificação, *in vitro*, de linfócitos com atividade antitumoral, a expansão *in vitro* dessas células para um grande número e sua infusão no hospedeiro portador de câncer. Os linfócitos usados para transferência adotiva podem ser derivados do estroma de tumores ressecados (linfócitos infiltrantes de tumor ou TILs). Os TILs para ACT podem ser preparados conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, os TILs são preparados, por exemplo, de acordo com um método conforme descrito na Figura 1 (em particular, por exemplo, na Figura 1B e/ou na Figura 1C). Os mesmos também podem ser derivados ou de sangue se forem geneticamente modificados para expressar receptores de células T antitumorais (TCRs) ou receptores de antígenos quiméricos (CARs), enriquecidos com culturas de células tumorais de linfócitos mistos (MLTCs) ou clonados usando células apresentadoras de antígenos autólogos e peptídeos derivados de tumor. A ACT na qual os linfócitos se originam do hospedeiro com câncer a ser infundido é denominada ACT autóloga. A publicação nº US 2011/0052530 se refere a um método para realizar terapia adotiva de células

para promover a regressão do câncer, principalmente para o tratamento de pacientes que sofrem de melanoma metastático, que é incorporado a título de referência em sua totalidade para esses métodos. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados conforme descrito neste documento. Em algumas modalidades, os TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser por injeção, por exemplo, injeção intravenosa. Em algumas modalidades, os TILs e/ou linfócitos citotóxicos podem ser administrados em doses múltiplas. A dosagem pode ser uma, duas, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais de seis vezes por ano. A dosagem pode ser uma vez por mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana ou uma vez em dias alternados. A administração de TILs e/ou linfócitos citotóxicos pode continuar enquanto for necessário.

6. MÉTODOS ADICIONAIS DE TRATAMENTO

[001599] Em outra modalidade, a invenção fornece um método para tratar um sujeito com câncer, compreendendo a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima.

[001600] Em outra modalidade, a invenção fornece um método para o tratamento de um sujeito com câncer, compreendendo a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima.

[001601] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificado de modo que antes da administração da dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou a dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima um regime de linfodepleção não mieloablativa tenha sido administrado ao sujeito.

[001602] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para o tratamento de um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o regime de linfodepleção não mieloablativa compreenda as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias seguidas de administração de fludarabina na dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[001603] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado para compreender ainda a etapa de tratar o sujeito com um regime de dose elevada de IL-2 começando no dia após a administração das células TIL ao sujeito.

[001604] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o regime de dose alta de IL-2 compreenda 600000 ou 720000 UI/kg administradas como uma infusão intravenosa de bolus de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

[001605] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para o tratamento de um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja um tumor sólido.

[001606] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja melanoma, câncer de ovário, câncer de endométrio, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de pulmão de células pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal ou carcinoma de células renais.

[001607] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para o tratamento de um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja melanoma, HNSCC, cânceres cervicais, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[001608] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja melanoma.

[001609] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para o tratamento de um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja HNSCC.

[001610] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja um câncer cervical.

[001611] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para o tratamento de um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja NSCLC.

[001612] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para o tratamento de um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja glioblastoma (incluindo GBM).

[001613] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja câncer gastrointestinal.

[001614] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para tratar

um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja um câncer hipermutado.

[001615] Em outra modalidade, a invenção fornece o método para o tratamento de um sujeito com câncer descrito em qualquer um dos parágrafos anteriores, conforme aplicável acima, modificado de modo que o câncer seja um câncer hipermutado pediátrico.

[001616] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima para uso em um método para tratar um sujeito com câncer compreendendo a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL terapêutica.

[001617] Em outra modalidade, a invenção fornece a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima para uso em um método para tratar um sujeito com câncer compreendendo a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL.

[001618] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima modificada de modo que antes da administração ao sujeito da dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou a composição TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, um regime de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao sujeito.

[001619] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o regime de

linfodepleção não mieloablativa compreenda as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias seguidas de administração de fludarabina na dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[001620] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada para compreender ainda a etapa de tratamento do paciente com uma dose elevada de IL-2 regime começando no dia após a administração das células TIL ao paciente.

[001621] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o regime de IL-2 de alta dose compreenda 600000 ou 720000 UI/kg administradas como uma infusão intravenosa bolus de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

[001622] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um tumor sólido.

[001623] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja melanoma, câncer de ovário, câncer endometrial, tireoide câncer, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço

(incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal ou carcinoma de células renais.

[001624] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

[001625] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja melanoma.

[001626] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja HNSCC.

[001627] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um câncer cervical.

[001628] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja NSCLC.

[001629] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja

glioblastoma (incluindo GBM).

[001630] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja câncer gastrointestinal.

[001631] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um câncer hipermutado.

[001632] Em outra modalidade, a invenção fornece a população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um câncer hipermutado pediátrico.

[001633] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima em um método de tratamento de câncer em um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL terapêutica.

[001634] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima em um método de tratamento de câncer em um sujeito, compreendendo a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL.

[001635] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima em um método de tratamento de câncer em um sujeito compreendendo a administração ao sujeito de um regime de linfodepleção não mieloablativa e, em seguida, a

administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores como aplicável acima.

[001636] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que antes de administrar ao sujeito a dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL terapêutica ou a dosagem terapeuticamente eficaz da composição TIL um regime de linfodepleção não mieloablativa tenha sido administrado ao sujeito.

[001637] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o regime de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida a uma dose de 60 mg/m^2/dia por dois dias seguido de administração de fludarabina na dose de 25 mg/m^2/dia por cinco dias.

[001638] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima ou o uso da composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima modificada para compreender ainda a etapa de tratamento do paciente com um regime de alta dose de IL-2 começando no dia após a administração das células TIL ao paciente.

[001639] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o

regime de IL-2 de alta dose compreende 600000 ou 720000 UI/kg administrado como uma infusão intravenosa em bolus de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

[001640] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um tumor sólido.

[001641] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou da composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja melanoma, câncer de ovário, câncer endometrial, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado por vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal ou carcinoma de células renais.

[001642] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou da composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja melanoma, HNSCC, cânceres cervicais, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM), e câncer gastrointestinal.

[001643] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja melanoma.

[001644] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o

câncer seja HNSCC.

[001645] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um câncer cervical.

[001646] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja NSCLC.

[001647] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou a composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja glioblastoma (incluindo GBM).

[001648] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou da composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja câncer gastrointestinal.

[001649] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou da composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um câncer hipermutado.

[001650] Em outra modalidade, a invenção fornece o uso da população de TIL terapêutica ou da composição de TIL, descrita em qualquer um dos parágrafos anteriores conforme aplicável acima, modificada de modo que o câncer seja um câncer hipermutado pediátrico.

EXEMPLOS

[001651] As modalidades aqui abrangidas são agora descritas com referência aos exemplos a seguir. Estes exemplos são fornecidos apenas para fins de ilustração e a divulgação aqui abrangida não deve de forma alguma ser

interpretada como sendo limitada a estes exemplos, mas sim deve ser interpretada abranger todas e quaisquer variações que se tornem evidentes como resultado dos ensinamentos fornecidos neste documento.

EXEMPLO 1: PREPARAÇÃO DE MEIO PARA PROCESSOS PRÉ-REP E REP

[001652] Este Exemplo descreve o procedimento para a preparação de meios de cultura de tecidos para uso em protocolos envolvendo a cultura de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) derivados de vários tipos de tumor, incluindo, porém sem limitação, melanoma metastático, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), carcinoma de ovário, carcinoma de mama triplo-negativo e adenocarcinoma de pulmão. Este meio pode ser usado para a preparação de qualquer um dos TILs descritos no presente pedido e nos Exemplos.

PREPARAÇÃO DE CM1

[001653] Os seguintes reagentes foram removidos do armazenamento refrigerado e aquecidos em banho-maria a 37 ºC: (RPMI1640, soro humano AB, L-glutamina a 200 mM). Meio CM1 preparado de acordo com a Tabela 19 abaixo adicionando-se cada um dos ingredientes na seção superior de uma unidade de filtro de 0,2 µm apropriada para o volume a ser filtrado. Armazenou-se a 4 ºC.

TABELA 19: PREPARAÇÃO DE CM1

Ingrediente	Concentração final	Volume final 500 ml	Volume final 1 l
RPMI1640	NA	450 ml	900 ml
Soro humano AB, inativado por calor 10%	50 ml	100 ml	
L-glutamina a 200 mM	2 mM	5 ml	10 ml
BME a 55 mM	55 µM	0,5 ml	1 ml
50mg/ml de sulfato de gentamicina	50 µg/ml	0,5 ml	1 ml

[001654] No dia de uso, uma quantidade necessária pré-aquecida de CM1 em banho-maria a 37 ºC e adicionar 6000 UI/ml de IL-2.

[001655] Suplementação adicional - conforme necessário de acordo com a Tabela 20.

TABELA 20: SUPLEMENTAÇÃO ADICIONAL DE CM1, CONFORME NECESSÁRIO.

Suplemento	Concentração de estoque	Diluição	Concentração final
GlutaMAX™	200 mM	1:100	2 mM
Penicilina/estreptomicina	10000 U/ml de penicilina 10000 µg/ml de estreptomicina	1:100	100 U/ml de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina
Anfotericina B	250 µg/ml	1:100	2,5 µg/ml

PREPARAÇÃO DE CM2

[001656] Remover o CM1 preparado do refrigerador ou preparar o CM1 fresco de acordo com a Tabela 19 acima. Remover o AIM-V® do refrigerador e preparar a quantidade de CM2 necessária misturando-se o CM1 preparado com um volume igual de AIM-V® em um frasco de meio estéril. Adicionar 3000 UI/ml de IL-2 ao meio CM2 no dia de uso. Preparar uma quantidade suficiente de CM2 com 3000 UI/ml de IL-2 no dia de uso. Rotular o frasco de meio CM2 com seu nome, as iniciais do preparador, a data em que foi filtrado/preparado, a data de validade de duas semanas e armazenar a 4 ºC até ser necessário para cultura de tecidos.

PREPARAÇÃO DE CM3

[001657] Preparar o CM3 no dia em que for necessário para o uso. CM3 foi igual ao meio AIM-V®, suplementado com 3000 UI/ml de IL-2 no dia de uso. Preparar uma quantidade de CM3 suficiente para as necessidades experimentais adicionando-se a solução estoque de IL-2 diretamente ao frasco ou bolsa de AIM-V. Misture bem agitando suavemente. Frasco etiquetado com "3000 UI/ml de IL-2" imediatamente após adição ao AIM-V. Caso haja excesso de CM3, armazenar o mesmo em frascos a 4 ºC rotulados com o nome do meio, as iniciais do preparador, a data em que o meio foi preparado e seu prazo de validade (7 dias após o preparo). Meio descartado suplementado com IL-2 após 7 dias de armazenamento a 4 ºC.

PREPARAÇÃO DE CM4

[001658] CM4 foi o mesmo que CM3, com o suplemento adicional de GlutaMAX™ a 2 mM (concentração final). Para cada 1 l de CM3, adicionar 10 ml de GlutaMAX ™ a 200 mM. Preparar uma quantidade de CM4

suficiente para as necessidades experimentais adicionando-se a solução estoque de IL-2 e a solução estoque GlutaMAX™ diretamente ao frasco ou bolsa de AIM-V. Misture bem agitando suavemente. Frasco etiquetado com "3000 IL/nil de IL-2 e GlutaMAX" imediatamente após adicionar ao AIM-V. Caso houver excesso de CM4, armazenar o mesmo em frascos a 4 ºC rotulados com o nome do meio, "GlutaMAX", e seu prazo de validade (7 dias após o preparo). Meio descartado suplementado com IL-2 após 7 dias de armazenamento a 4 ºC.

EXEMPLO 2: USO DE COQUETEL DE CITOCINAS IL-2, IL-15 E IL-21

[001659] Este exemplo descreve o uso de citocinas IL-2, IL-15 e IL-21, que servem como fatores de crescimento de células T adicionais, em combinação com o processo TIL dos Exemplos A a G.

[001660] Usando os processos descritos neste documento, os TILs foram cultivados a partir de tumores colorretais, melanomas, cervicais, triplos negativos da mama, pulmão e renais 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 IFN-γ) e repertório TCR Vβ. IL-15 e IL-21 são descritos em outro lugar neste documento 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, *Santegoets, S. J.,* J Transl Med., **2013,** *11:*37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

[001661] Os resultados mostraram que a expansão aumentada de TIL (> 20%), em ambas as células $CD4^+$ e $CD8^+$ nas condições tratadas com IL-2, IL-15 e IL-21, foi observada em múltiplas histologias em relação às condições apenas com IL-2. Houve uma distorção em direção a uma população predominantemente $CD8^+$ com um repertório TCR Vβ distorcido nos TILs obtidos das culturas tratadas com IL-2, IL-15 e IL-21 em relação às culturas

apenas com IL-2. IFN-γ e CD107a foram elevados nos TILs tratados com IL-2, IL-15 e IL-21, em comparação com os TILs tratados apenas com IL-2.

EXEMPLO 3: PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE ESTOQUE DE IL-2 (CELLGENIX)

[001662] Este Exemplo descreve o processo de dissolução de interleucina-2 humana recombinante liofilizada purificada em amostras de estoque adequadas para uso em outros protocolos de cultura de tecidos, incluindo todos aqueles descritos no presente pedido e Exemplos, incluindo aqueles que envolvem o uso de rhIL-2.

PROCEDIMENTO

[001663] Solução preparada de ácido acético a 0,2% (HAc). Transferiu-se 29 ml de água estéril para um tubo cônico de 50 ml. Adicionou-se 1 ml de ácido acético a 1 N ao tubo cônico de 50 ml. Misturou-se bem invertendo-se o tubo 2-3 vezes. Esterilizou-se a solução HAc por filtração usando um filtro Steriflip

[001664] Preparou-se HSA a 1% em PBS. Adicionou-se 4 ml de solução estoque de HSA a 25% a 96 ml de PBS em uma unidade de filtro estéril de 150 ml. Solução filtrada. Armazenou-se a 4 ºC. Para cada frasco de rhIL-2 preparado, preencher formulários.

[001665] Solução estoque de rhIL-2 preparada (concentração final de 6 × 10^6 UI/ml). Cada lote de rhIL-2 era diferente e exigia 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 de reconstituição de HAc recomendado a 0,2% (ml).

[001666] Calculou-se o volume necessário de HSA a 1% para o lote rhIL-2 com uso da equação abaixo:

$$\left(\frac{Massa\ de\ frasco\ (mg)\ x\ Atividade\ biológica\ \left(\frac{UI}{mg}\right)}{6\ x\ 10^6\ \frac{UI}{ml}}\right) - vol\ HAc\ (ml) = vol\ HSA\ a\ 1\%\ (ml)$$

[001667] Por exemplo, de acordo com COA do lote 10200121 de rhIL-2

da CellGenix, a atividade específica para o frasco de lmg é 25 × 10^6 UI/mg. Recomenda-se reconstituir o rhIL-2 em 2 ml de HAc a 0,2%.

$$\left(\frac{1\ mg\ x\ 25\ x\ 10^6\ \frac{UI}{mg}}{6\ x\ 10^6\ \frac{UI}{ml}}\right) - 2\ ml = 2{,}167\ ml\ de\ HSA$$

[001668] Limpou-se a rolha de borracha do frasco de IL-2 com algodão embebido em álcool. Usando uma agulha 16G acoplada a uma seringa de 3 ml, injetou-se o volume recomendado de HAc a 0,2% no frasco. Tomou-se cuidado para não desalojar a tampa ao retirar a agulha. Frasco invertido 3 vezes e rodado até todo o pó estar dissolvido. Removeu-se a tampa com cuidado e colocou-se a mesma sobre um lenço umedecido com álcool. Adicionou-se o volume calculado de HSA a 1% ao frasco.

[001669] Armazenamento da solução rhIL-2. Para armazenamento de curto prazo (<72 horas), frasco armazenado a 4 ºC. Para armazenamento de longo prazo (> 72 horas), frascos aliquotados em volumes menores e armazenados em criotubos a -20 ºC até que estejam prontos para uso. Ciclos de congelamento/descongelamento evitados. Data de validade registrada de 6 meses após a data de preparação. Os rótulos Rh-IL-2 incluíam o fornecedor e o número do catálogo, o número do lote, a data de validade, as iniciais do operador, a concentração e o volume da alíquota.

EXEMPLO 4: PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

[001670] Este exemplo descreve o método do processo de criopreservação para TILs preparados com o procedimento abreviado e fechado descrito no Exemplo G usando o CryoMed Controlled Rate Freezer, Modelo 7454 (Thermo Scientific).

[001671] O equipamento utilizado foi o seguinte: rack porta-cassete de alumínio (compatível com bolsas freezer CS750), cassetes de crioarmazenamento para bolsas de 750 ml, tanque de nitrogênio líquido de baixa pressão (0,15 MPa (22 psi)), geladeira, sensor termopar (tipo fita para

bolsas) e sacos de congelamento CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

[001672] O processo de congelamento proporcionou uma taxa de 0,5 ºC desde a nucleação até -20 ºC e uma taxa de resfriamento de 1 ºC por minuto até -80 ºC de temperatura final. Os parâmetros do programa foram os seguintes: Etapa 1 - aguardar 4 ºC; Etapa 2: 1,0 ºC/min (temperatura da amostra) a -4 ºC; Etapa 3: 20,0 ºC/min (temperatura da câmara) a -45 ºC; Etapa 4: 10,0 ºC/min (temperatura da câmara) a -10,0 ºC; Etapa 5: 0,5 ºC/min (temperatura da câmara) a -20 ºC; e Etapa 6: 1,0 ºC/min (temperatura da amostra) a -80 ºC.

EXEMPLO 5: PROCESSO EXEMPLIFICATIVO GEN 3

[001673] O exemplo fornece uma comparação entre os processos Gen 2 e Gen 3. Este exemplo descreve o desenvolvimento de uma plataforma de expansão TIL robusta. As modificações no processo Gen 2 reduzem o risco e agilizam o processo de fabricação reduzindo-se o número de intervenções do operador, reduzem o tempo geral de fabricação, otimizam o uso de reagentes e facilitam um processo de produção de células semifechadas e semiautomáticas flexíveis acessíveis à fabricação de alto rendimento em escala comercial.

[001674] Os TILs do Processo Gen 2 e Gen 3 são compostos por TIL autólogos derivados de um paciente individual por meio da ressecção cirúrgica de um tumor e, em seguida, expandidos *ex vivo*. A primeira etapa de expansão de preparação do processo Gen 3 foi uma cultura de células na presença de interleucina-2 (IL-2) e o anticorpo monoclonal OKT3, que tem como alvo o correceptor de células T CD3 em uma estrutura de células de sangue periférico mononuclear irradiadas (PBMCs).

[001675] A fabricação dos produtos de TIL de Gen 2 consistia em duas fases: 1) pré-expansão rápida (Pré-REP) e 2) Protocolo de expansão rápida (REP). Durante a Pré-REP, os 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 a 10% suplementado) e 6000 UI/ml de Interleucina-2 (IL-2) por um período de 11 dias. No dia 11, os TIL foram colhidos e introduzidos na expansão secundária de larga escala da REP. A REP consiste na ativação de $\leq 200 \times 10^6$ das células viáveis da pré-REP em uma cocultura de 5×10^9 células alimentadoras de PBMCs alogênicas irradiadas carregadas com 150 µg de anticorpo monoclonal anti-CD3 (OKT3) em um volume de 5 l de CM2 suplementado com 3000 UI/ml de rhIL-2 por 5 dias. No dia 16, o volume da cultura é reduzido em 90% e a fração celular é dividida em vários frascos G-REX-500 em $\geq 1 \times 10^9$ linfócitos viáveis/frasco e QS para 5 l com CM4. TILs são incubados por mais 6 dias. A REP é colhida no dia 22, lavada, formulada e criopreservada antes do envio a -150 ºC para o local clínico para infusão.

[001676] A fabricação de produtos de TIL de Gen 3 consistia em três fases: 1) Protocolo de primeira expansão de preparação 2) Protocolo de segunda expansão rápida (também conhecido como fase de expansão rápida ou REP) e 3) Divisão de subcultura. Para efetuar a propagação de TIL de primeira expansão de iniciação, o tumor ressecado foi cortado em $\leq$ 120 fragmentos de 2-3 mm em cada dimensão. No dia 0 da Primeira Expansão de Iniciação, uma camada de alimentação de aproximadamente $2{,}5 \times 10^8$ células alimentadoras de PBMCs irradiadas alogênicas carregadas com OKT-3 foi estabelecida em uma área de superfície de aproximadamente 100 cm^2 em cada um dos 3 vasos 100 MCS. Os fragmentos de tumor foram distribuídos e cultivados em 3 vasos 100 MCS, cada um com 500 ml de meio de cultura CM1 contendo soro e 6000 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 adicional de aproximadamente 5×10^8 células alimentadoras de PBMCs irradiadas alogênicas carregadas com OKT-3 na fase de cultura fragmentada do tumor em cada um dos 3 vasos 100 MCS e cultivando com 500 ml de meio CM2 de cultura e 6000 UI/ml de IL-2 e 30

µg OKT-3. A iniciação REP foi aprimorada pela ativação de toda a cultura de primeira expansão de iniciação no mesmo recipiente usando a transferência de fluido de sistema fechado de células alimentadoras carregadas com OKT3 para o recipiente 100MCS. Para Gen 3, o aumento de escala TIL ou divisão envolveu as etapas do processo em que a cultura de células inteiras foi aumentada em escala para um recipiente maior por meio de transferência de fluido de sistema fechado e foi transferida (do frasco de 100 M para um frasco de 500 M) e 4 l adicionais de meio CM4 foram adicionados. As células REP foram colhidas no dia 16, lavadas, formuladas e criopreservadas antes do envio a -150 ºC para o local clínico para infusão.

[001677] No geral, o processo Gen 3 é uma plataforma de expansão mais curta, escalável e facilmente modificável que se acomodará para se adequar à fabricação robusta e à comparabilidade de processos.

TABELA 21: COMPARAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GEN 2 EXEMPLIFICATIVO E GEN 3 EXEMPLIFICATIVO.

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 com até 120 fragmentos divididos uniformemente em até 3 frascos. 1 frasco: 1-60 fragmentos 2 frascos: 61-89 fragmentos 3 frascos: 90-120 fragmentos 7 dias em 200-500 ml de meio CM1 + IL-2 (6000 UI/ml) $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras/frasco Opcionalmente, 15 µg OKT-3/frasco
Iniciação de REP	Direto para REP- Dia 11- <200e^6 TILs (1) G-Rex 500MCS em 5 l de meio CM2 IL-2 (3000 UI/ml) 5×10^9 células alimentadoras 150 µg de OKT-3	Direto para REP - Dia 7 - todas as células TIL - mesmo G-Rex 100MCS Adicionar 500 ml de meio CM2 IL-2 (6000 UI/ml) 5×10^8 células alimentadoras/frasco 30 µg de OKT-3/frasco
Propagação ou aumento de escala de TIL	Redução de volume e fração de divisão celular em até 5 G-REX 500MCS 4,5 l de meio CM4 + IL-2 (3000 UI/ml) $\geq 1 \times 10^9$ TVC/frasco Dividir dia 16	Cada G-REX 100MCS (1 l) é transferido para 1 G-REX 500MCS Adicionar 4 l de meio CM4 + IL-2 (3000 UI/ml) Aumento de escala dos dias 9 a 11
Colheita	Dia de colheita 22, Lavador de células automatizado por LOVO	Colheita dia 16 Lavador de células automatizado por LOVO

Etapa	Processo (Gen 2)	Processo (Gen 3)
Formulação final	Produto Criopreservado 300 UI/ml de IL2- CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto criopreservado 300 UI/ml de IL-2-CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas
Tempo de processamento	**22 dias**	**16 dias**

[001678] 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 6000 UI/ml de rhIL-2. Para o processo Gen 3, os fragmentos foram transferidos para um frasco GREX100MCS com 200-500 ml de CM1 contendo 6000 UI/ml de rhIL-2, opcionalmente 15 µg de OKT-3 e $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras.

[001679] A semeadura de TIL para o dia de início do Rep ocorreu em dias diferentes de acordo com cada processo. Para o processo Gen 2, no qual o frasco G-REX 100MCS foi reduzido em 90% do volume, a suspensão de células coletadas foi transferida para um novo G-REX 500MCS para iniciar a iniciação REP no dia 11 em meio CM2 contendo IL-2 (3000 UI/ml), mais 5e9 células alimentadoras e OKT-3 (30 ng/ml). As células foram expandidas e divididas no dia 16 em vários frascos GREX 500 MCS com meio CM4 com IL-2 (3000 UI/ml) por protocolo. A cultura foi então colhida e criopreservada no dia 22 por protocolo.

[001680] Para o processo Gen 3, o início da REP ocorreu no dia 7, no qual o mesmo G-REX 100MCS usado para o início da REP. Resumidamente, 200-500 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. Nos dias 9-11, a cultura foi aumentada. Todo o volume do G-Rex100M (1L) foi transferido para um G-REX 500MCS e 4 l de CM4 contendo IL-2 (3000 UI/ml) foram adicionados. Os frascos foram incubados durante 5 dias. As culturas foram colhidas e criopreservadas no dia 16.

[001681] Em particular, a semeadura de TILs para o dia de iniciação da

Rep ocorreu em dias diferentes de acordo com cada processo. Para o processo Gen 2, no qual o frasco G-REX 100MCS foi reduzido em 90% do volume, a suspensão de células coletadas foi transferida para um novo G-REX 500MCS para iniciar a iniciação REP no dia 11 em meio CM2 contendo IL-2 (3000 UI/ml), mais 5e9 células alimentadoras e OKT-3 (30 ng/ml). As células foram expandidas e divididas no dia 16 em vários frascos G-Rex 500 MCS com meio CM4 contendo IL-2 (3000 UI/ml) por protocolo. A cultura foi então colhida e criopreservada no dia 22 por protocolo.

[001682] Em particular, a propagação para o processo Gen 3, a iniciação do REP ocorreu no dia 7, no qual o mesmo G-Rex 100MCS foi usado para a iniciação da REP. Resumidamente, 800 ml de meio CM2 contendo IL-2 (6000 UI/ml) e 1e9 células alimentadoras com 30 ug de OKT-3 foram adicionados a cada frasco. No dia 11, a cultura foi ampliada para as três rodadas. Todo o volume do G-Rex100MCS foi transferido para um G-Rex 500MCS e 4 l de CM4 contendo IL-2 (3000 UI/ml) foram adicionados. Os frascos foram incubados durante 5 dias. As culturas foram colhidas e criopreservadas no Dia 16.

[001683] Três tumores diferentes foram incluídos na comparação, dois tumores de pulmão (L4054 e L4055) e um tumor de melanoma (M1085T).

[001684] Os meios CM1 (meio de cultura 1), CM2 (meio de cultura 2) e CM4 (meio de cultura 4) foram preparados com antecedência 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 dos meios.

[001685] O meio foi aquecido a 37 ºC até 24 horas de antecedência para o tumor L4055 na iniciação e aumento de escala de REP.

SUMÁRIO DE RESULTADOS

[001686] Gen 3 caiu dentro de 30% do Gen 2 para o total de células viáveis alcançadas. O produto final de Gen 3 exibiu maior produção de INF-γ após a nova estimulação. O produto final de Gen 3 exibiu diversidade clonal

aumentada conforme medido pelas sequências CDR3 únicas totais presentes. O produto final de Gen 3 exibiu um comprimento médio dos telômeros mais longo.

RESULTADOS ALCANÇADOS

CONTAGEM DE CÉLULAS E % DE VIABILIDADE:

[001687] A expansão da Pré-REP e REP nos processos Gen 2 e Gen 3 seguiu os detalhes descritos acima.

[001688] **Tabela 22: 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. Total de células pré-REP (TVC) foram colhidas 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 para calcular uma média de células viáveis por fragmento. Conforme indicado na tabela abaixo, o processo Gen 2 cresceu de forma consistente mais células por fragmento em comparação com o processo Gen 3. Um cálculo extrapolado do número de TVC esperado para o processo Gen 3 no dia 11, que foi calculado dividindo o TVC pré-REP por 7 e depois multiplicando por 11.

TABELA 22: CONTAGENS DE CÉLULAS PRÉ-REP

ID de 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 na colheita pré-REP	6,78E + 06	2,06E + 06	1,12E + 06	5,75E + 05	7,66E + 05	2,18E + 05

*** L4055, meio não filtrado.**

[001689] **Tabela 23: Contagem total de células viáveis e expansão de vezes no produto final de TIL:** Para os processos Gen 2 e Gen 3, TVC foi contada por condição de processo e a porcentagem de células viáveis foi gerada para cada dia do processo. Na colheita, as células do dia 22 (Gen 2) e do dia 16 (Gen 3) foram coletadas e a contagem de TVC foi estabelecida. A TVC foi então dividida pelo número de fragmentos fornecidos no dia 0, para

calcular uma média de células viáveis por fragmento. A expansão da dobra foi calculada dividindo-se a TVC da colheita pela TVC de iniciação de REP. Conforme exibido na tabela, comparando Gen 2 e Gen 3, as expansões dobradas foram semelhantes para L4054; no caso do L4055, a expansão de dobra foi maior para o processo Gen 2. Especificamente, neste caso, o meio foi aquecido 24 antes do dia de início de REP. Uma maior expansão de dobra também foi observada em Gen 3 para M1085T. Um cálculo extrapolado do número de TVC esperado para o processo Gen 3 no dia 22, que foi calculado dividindo o REP TVC por 16 e depois multiplicando por 22.

TABELA 23: CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS VIÁVEIS E EXPANSÃO DE DOBRA NO PRODUTO FINAL DE TIL

ID de tumor	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Processo	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Número de Fragmentos	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**
TVC na iniciação da REP	1,42E + 08	4,32E + 07	2,68E + 07	1,38E + 07	1,23E + 07	3,50E + 06
TVC em aumento de escala (incluindo alimentadoras)	3,36E + 09	9,35E + 08	3,49E + 09	8,44E + 08	1,99E + 09	3,25E + 08
TVC na colheita	6,67E + 10	1,84E + 10	5,52E + 10	8,76E + 09	1,13E + 10	7,68E + 09
Expansão de dobra Colheita REP / Iniciação REP	**468,4**	**425,9**	**2056,8**	**634,6**	**925,0**	**2197,2**
TVC/fragmento (na Colheita de REP)	3,18E + 09	8,77E + 08	2,30E + 09	3,65E + 08	7,09E + 08	4,80E + 08

*** L4055, meio não filtrado.**

[001690] **Tabela 24: % de viabilidade do produto final de TIL:** Na colheita, os produtos TIL REP finais foram comparados com os critérios de liberação para % de viabilidade. Todas as condições para os processos Gen 2 e Gen 3 ultrapassaram o critério de viabilidade de 70% e foram comparáveis entre processos e tumores.

TABELA 24: % DE VIABILIDADE DE REP

ID de tumor	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Processo	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Iniciação REP	98,23%	97,97%	97,43%	92,03%	81,85%	68,27%
Aumento de escala	94,00%	93,57%	90,50%	95,93%	78,55%	71,15%
Colheita	87,95%	89,85%	87,50%	86,70%	86,10%	87,45%

*** L4055, meio não filtrado.**

[001691] **Tabela 25: Estimativa da contagem de células por frasco adicional para processos Gen 3**. Devido ao número de fragmentos por frasco abaixo do número máximo necessário, uma contagem de células estimada no

dia da colheita foi calculada para cada tumor. A estimativa foi baseada na expectativa de que os tumores clínicos fossem grandes o suficiente para semear 2 ou 3 frascos no dia 0.

TABELA 25: CÁLCULO DA CONTAGEM DE CÉLULAS ESTIMADA EXTRAPOLADA PARA O FRASCO DE ESCALA COMPLETA 2 E 3 NO PROCESSO GEN 3

ID de tumor	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Processo de Gen 3	**2 frascos**	**3 frascos**	**2 frascos**	**3 frascos**	**2 frascos**	**3 frascos**
Estimativa de colheita	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 DE TIL:

[001692] Três tumores L4054, L4055 e M1085T sofreram expansão de TIL em ambos os processos Gen 2 e Gen 3. Após a colheita, os produtos finais TIL de REP foram submetidos à análise de citometria de fluxo para testar os marcadores de pureza, diferenciação e memória. Para todas as condições, a porcentagem de células TCR a/b + foi superior a 90%.

[001693] TIL colhido do processo Gen 3 mostrou uma expressão mais alta de CD8 e CD28 em comparação com TIL colhido do processo Gen 2. O processo Gen 2 apresentou maior porcentagem de CD4+. **Consultar a Figura 3 (A, B, C)**.

COMPARAÇÃO DE MARCADORES DE MEMÓRIA NO PRODUTO FINAL DE TIL:

[001694] TIL colhido do processo Gen 3 mostrou uma expressão mais alta nos compartimentos de memória central em comparação com TIL do processo Gen 2. **Consultar a Figura 4 (A, B, C)**.

COMPARAÇÃO DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO E EXAUSTÃO NO PRODUTO FINAL DE TIL:

[001695] Os marcadores de ativação e exaustão foram analisados em TIL de dois tumores L4054 e L4055 para comparar o produto final de TIL a partir dos processos de expansão de TIL de Gen 2 e Gen 3. Os marcadores de

ativação e exaustão foram comparáveis entre os processos Gen 2 e Gen 3. **Consultar a Figura 5 (A, B); Figura 6 (A, B).**

SECREÇÃO INTERFERON GAMA NA RESTIMULAÇÃO:

[001696] No dia da colheita, dia 22 para Gen 2 e dia 16 para Gen 3, TIL passou por uma nova estimulação durante a noite com placas anti-CD3 revestidas para L4054 e L4055. A nova estimulação em M1085T foi realizada usando esferas anti-CD3, CD28 e CD137. O sobrenadante foi coletado após 24 horas da nova estimulação em todas as condições e o sobrenadante foi congelado. A análise de IFNγ por ELISA foi avaliada no sobrenadante de ambos os processos ao mesmo tempo usando a mesma placa de ELISA. Maior produção de IFNγ a partir do processo Gen 3 foi observada nos três tumores analisados. **Consultar a Figura 7 (A, B, C).**

MEDIÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-2 NO MEIO DE CULTURA:

[001697] Para comparar o consumo de IL-2 entre o processo Gen 2 e Gen 3, o sobrenadante celular foi coletado no início de REP, aumento de escala e dia da colheita, no tumor L4054 e L4055. A quantidade de IL-2 no sobrenadante da cultura de células 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 comparada ao processo Gen 2. Isso é provavelmente devido à maior concentração de IL-2 na iniciação do REP (6000 UI/ml) para Gen 3, juntamente com o transporte do meio ao longo do processo. **Consultar a Figura 8 (A, B).**

ANÁLISE DE SUBSTRATO METABÓLICO E METABOLITO

[001698] Os níveis de substratos metabólicos, como D-glicose e L-glutamina, foram medidos como substitutos do consumo geral de meio. Seus metabólitos recíprocos, como ácido láctico e amônia, foram medidos. A glicose é um açúcar simples no meio que é utilizado pelas mitocôndrias para produzir energia na forma de ATP. Quando a glicose é oxidada, o ácido láctico é produzido (o lactato é um éster do ácido láctico). O lactato é

fortemente produzido durante a fase de crescimento exponencial das células. Altos níveis de lactato têm um impacto negativo nos processos de cultura de células. **Consultar a Figura 9 (A, B).**

[001699] O meio gasto para L4054 e L4055 foi coletado no início da REP, aumento de escala e dias de colheita para ambos os processos Gen 2 e Gen 3. A coleta de meio gasto foi para Gen 2 no dia 11, dia 16 e dia 22; para Gen 3 foi no dia 7, dia 11 e dia 16. O sobrenadante foi analisado em um bioanalisador CEDEX para concentrações de glicose, ácido lático, glutamina, glutamax e amônia.

[001700] A L-glutamina é um aminoácido essencial instável necessário em formulações de meios de cultura de células. A glutamina contém uma amina e este grupo estrutural de amida pode transportar e entregar nitrogênio às células. Quando a L-glutamina se oxida, um subproduto tóxico da amônia é produzido pela célula. Para neutralizar a degradação da 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 linhas de tumor, o braço Gen 3 (processo de 16 dias) mostrou uma diminuição na L-glutamina e Glutamax durante o processo e um aumento na amônia em toda a REP. No braço Gen 2 (processo de 22 dias) foi observada uma concentração constante de L-glutamina e Glutamax, e um ligeiro aumento na produção de amônia. Os processos Gen 2 e Gen 3 foram comparáveis no dia da colheita (22 para Gen 2; 16 para Gen 3) para amônia e mostraram uma ligeira diferença na degradação da L-glutamina. **Consultar a Figura 10 (A, B, C).**

REPETIÇÕES DE TELÔMERO POR FLOW-FISH:

[001701] A tecnologia Flow-FISH foi usada para medir o comprimento médio da repetição do telômero em L4054 e L4055 sob o processo Gen 2 e Gen 3. A determinação de um comprimento relativo do telômero (RTL) foi calculada usando o kit Telomere PNA/FITC para análise de citometria de

fluxo da DAKO. Gen 3 mostrou comprimento de telômero comparável a Gen 2.

ANÁLISE DE CD3

[001702] Para determinar a diversidade clonal dos produtos celulares gerados em cada processo, o produto final de TIL colhido para L4054 e L4055 foi amostrado e testado para análise de diversidade clonal por meio do sequenciamento da porção CDR3 dos receptores de células T.

[001703] Tabela 26: Comparação de Gen 2 e Gen3 da porcentagem de sequências CDR3 únicas compartilhadas em L4054 no produto de células colhidas por TIL. 199 sequências são compartilhadas entre o produto final Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 97,07% dos 80% principais das sequências CDR3 únicas de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3.

TABELA 26: COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS UCDR3 COMPARTILHADAS ENTRE OS PROCESSOS GEN 2 E GEN 3 EM L4054.

Número de uCDR3 (% de Sobreposição)	**Todas as uCDR3's**		**Primeiros 80% 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

[001704] **Tabela 27: Comparação de Gen 2 e Gen3 da porcentagem de sequências CDR3 únicas compartilhadas em L4055 no produto de células colhidas por TIL.** 1833 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 99,45% dos primeiros 80% das sequências CDR3 únicas de Gen 2 compartilhadas com o produto final de Gen 3.

TABELA 27: COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS UCDR3 COMPARTILHADAS ENTRE OS PROCESSOS GEN 2 E GEN 3 EM L4055.

Número de uCDR3 (% de Sobreposição)	**Todas as uCDR3's**		**Primeiros 80% 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

[001705] Os meios CM1 e CM2 foram preparados antecipadamente sem

filtração e mantidos a 4 ºC até o uso para o tumor L4055 para uso no processo Gen 2 e Gen 3.

[001706] O meio foi aquecido a 37 ºC por 24 horas de antecedência para o tumor L4055 no dia de iniciação da REP para o processo Gen 2 e Gen 3.

[001707] O LDH não foi medido nos sobrenadantes coletados nos processos.

[001708] A contagem de células TIL M1085T foi executada com o contador de células do celômetro K2.

[001709] No tumor M1085T, as amostras não estavam disponíveis, como sobrenadante para análise metabólica, produto de TIL para análise de marcadores de ativação e exaustão, comprimento do telômero e análise de CD3 - TCR vb.

CONCLUSÕES

[001710] Este exemplo compara tecido de 3 tumores de doadores independentes em termos de atributos de qualidade funcional, além de caracterização fenotípica estendida e consumo de meio entre os processos Gen 2 e Gen 3.

[001711] A comparação da expansão do Gen 2 e Gen 3 pré-REP e REP foi avaliada em termos de células viáveis totais geradas e viabilidade da população total de células nucleadas. As doses de células TVC no dia da colheita não foram comparáveis entre Gen 2 (22 dias) e Gen 3 (16 dias). As doses de células Gen 3 foram menores do que Gen 2 em cerca de 40% do total de células viáveis coletadas na colheita.

[001712] Um número de células extrapolado foi calculado para o processo Gen 3 que assumiu que a colheita pré-REP ocorreu no dia 11 em vez do dia 7 e a colheita REP no dia 22 em vez do dia 16. Ambos os casos mostraram números mais próximos de TVC usando o processo Gen 3 em comparação com o processo Gen 2, o que indicou que a ativação precoce permitiu um melhor desempenho geral no crescimento de TIL. Consultar as

Tabelas 4 e 5, linha inferior.

[001713] No caso de valor extrapolado para frascos extras (2 ou 3) no processo Gen 3 assumindo um tamanho maior de tumor processado, e atingindo o número máximo de fragmentos necessários por processo conforme descrito. Foi observado que uma dose semelhante pode ser alcançada na TVC no dia 16 Colheita para o processo Gen 3 em comparação com o processo Gen 2 no dia 22. Essa observação é importante e indica que uma ativação precoce da cultura pode permitir melhor desempenho do TIL em menos tempo de processamento.

[001714] As comparações de expansão de pré-REP e REP de Gen 2 e Gen 3 foram avaliadas em termos de células viáveis totais geradas e viabilidade da população total de células nucleadas. As doses de células TVC no dia da colheita não foram comparáveis entre Gen 2 (22 dias) e Gen 3 (16 dias). As doses de células Gen 3 foram menores do que Gen 2 em cerca de 40% do total de células viáveis coletadas na colheita.

[001715] Em termos de caracterização fenotípica, uma maior expressão de CD8+ e CD28+ foi observada em três tumores no processo Gen 3 em comparação com o processo Gen 2. Esses dados indicam que o processo Gen 3 melhorou os atributos do produto TIL final em comparação com Gen 2.

[001716] O processo Gen 3 mostrou compartimentos de memória central ligeiramente maiores em comparação com o processo Gen 2.

[001717] Os processos Gen 2 e Gen 3 mostraram marcadores de ativação e exaustão comparáveis, apesar da menor duração do processo Gen 3.

[001718] A produção de IFN gama (IFNγ) foi 3 vezes maior no produto final de Gen 3 em comparação com Gen 2 nos três tumores analisados. Esses dados indicam que o processo Gen 3 gerou um produto TIL altamente funcional e mais potente em comparação com o processo Gen 2, possivelmente devido à maior expressão de CD8 e CD28 em Gen 3. A

produção de IFN-γ foi 3 vezes maior no produto final Gen 3 em comparação com Gen 2 nos três tumores analisados, sugerindo que o processo Gen 3 gerou TIL altamente funcional. A caracterização fenotípica sugeriu tendências positivas em Gen 3 em relação à expressão de CD8+, CD28+ em três tumores em comparação com o processo Gen 2.

[001719] O comprimento do telômero no produto final TIL entre Gen 2 e Gen 3 eram comparáveis.

[001720] Os níveis de glicose e lactato foram comparáveis entre o produto final de Gen 2 e Gen 3, sugerindo que os níveis de nutrientes no meio do processo Gen 3 não foram afetados devido à não execução da remoção da redução de volume em cada dia do processo e menor volume de meio geral no processo, em comparação com Gen 2.

[001721] O processo geral de Gen 3 mostrou uma redução de quase duas vezes no tempo de processamento em comparação com o processo Gen 2, o que geraria uma redução substancial no custo de mercadorias (COGs) para o produto de TIL expandido pelo processo Gen 3.

[001722] O consumo de IL-2 indica uma tendência geral de consumo de IL-2 no processo Gen 2, e no processo Gen 3 IL-2 foi maior devido à não remoção do meio antigo.

[001723] O processo Gen 3 mostrou uma maior diversidade clonal medida pela análise da sequência CDR3 TCRab.

[001724] A adição de alimentadoras e OKT-3 no dia 0 do pré-REP permitiu uma ativação precoce de TIL e um melhor desempenho de TIL de crescimento geral usando o processo Gen 3.

[001725] A Tabela 28 descreve várias modalidades e resultados para o processo Gen 3 em comparação com o processo atual Gen 2:

TABELA 28: PROCESSO DE GEN 3 EXEMPLIFICATIVO.

Etapa	Processo de Gen 2	Processo de Gen 3 otimizado
Pré REP- dia 0	≤50 fragmentos 1X G-Rex 100MCS 1 l de meio IL-2 (6000 UI/ml) 11 dias	≤240 fragmentos ≤60 fragmentos/frasco ≤4 frascos ≤2 l de meio (500 ml/frasco) IL-2 (6000 UI/ml) $2,5 \times 10^8$ células alimentadoras/frasco 15 µg de OKT3/frasco
Iniciação de REP	TIL fresco direto para REP Dia 11 ≤200e^6 células viáveis 5×10^9 células alimentadoras G-Rex 500MCS 5 l de meio CM2 + IL-2 (3000 UI/ml) 150 µg de OKT3	TIL fresco direto para REP Dia 7 Ativar toda a cultura 5×10^8 células alimentadoras 30 µg de OKT3/frasco G-Rex 100MCS 500 ml de meio + IL-2 (6000 UI/ml)
Subcultura ou aumento de escala de TIL	≤5 G-REX 500MCS ≤1 × 10 células viáveis/frasco 5 l/frasco Dia 16	≤4 G-REX 500MCS Aumento de escala da cultura inteira 4 l/frasco Dias 10-11
Colheita	Dia da Colheita 22, Lavador de células automatizado por LOVO 2 ciclos de lavagem	Dia da Colheita 16 Lavador de células automatizado por LOVO 5 ciclos de lavagem
Formulação final	Produto Criopreservado 300 UI/ml de IL2- CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto criopreservado 300 UI/ml de IL-2-CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas
Tempo de processamento	**22 dias**	**16 dias**

EXEMPLO 6: UMA MODALIDADE EXEMPLIFICATIVA DE SELEÇÃO E EXPANSÃO DE PBLS A PARTIR DE PBMCS EM PACIENTES COM LLC.

[001726] PBMCs são coletadas de pacientes e congeladas para uso posterior ou usadas frescas. Um volume suficiente de sangue periférico é coletado para proporcionar pelo menos cerca de 400000000 de (400 x 10^6 PBMCs) para material de partida no método da presente invenção. No Dia 0 do método, IL-2 a 6×10^6 UI/ml é preparado fresco ou descongelado e armazenado a 4 ºC ou em gelo até estar pronto para uso. 200 ml de meio CM2 são preparados combinando-se 100 ml de meio CM1 (contendo GlutaMAX®) e, em seguida, diluindo-o com 100 ml (1:1) com AIM-V para produzir CM2. O CM2 é protegido da luz e hermeticamente fechado quando não está em uso.

[001727] Todas as etapas a seguir são realizadas em condições de cultura de células estéreis. Uma alíquota de CM2 é aquecida em um tubo cônico de 50 ml em banho-maria a 37 ºC para uso no descongelamento e/ou lavagem de uma amostra de PBMC congelada. Se uma amostra de PBMC congelada for usada, a amostra é removida do armazenamento do congelador e mantida em gelo seco até que esteja pronta para descongelar. Quando estiver pronto para descongelar o criotubo de PBMC, 5 ml de meio CM2 são colocados em um tubo cônico estéril de 50 ml. O criotubo de amostra de PBMC é colocado em banho-maria a 37 ºC até que apenas alguns cristais de gelo permaneçam. O meio CM2 aquecido é adicionado, gota a gota, ao frasco de amostra em uma razão de volume de 1:1 de amostra: meio (cerca de 1 ml). Todo o conteúdo é removido do criotubo e transferido para o meio CM2 restante no tubo cônico de 50 ml. Um adicional de 1-2 ml de meio CM2 é usado para enxaguar o criotubo e todo o conteúdo do criotubo é removido e transferido para o tubo cônico de 50 ml. O volume no tubo cônico é então ajustado com meio CM2 adicional para 15 ml e agitado suavemente para enxaguar as células. O tubo cônico é então centrifugado a 400g por 5 minutos em temperatura ambiente a fim de coletar o pélete celular.

[001728] O sobrenadante é removido do pélete, o tubo cônico é tampado e, em seguida, o pélete celular é rompido, por exemplo, raspando-se o tubo ao longo de uma superfície áspera. Cerca de 1 ml de meio CM2 é adicionado ao pélete celular, e o pélete e o meio são aspirados para cima e para baixo 5-10 vezes com uma pipeta para quebrar o pélete celular. Um adicional de 3-5 ml de meio CM2 é adicionado ao tubo e misturado por meio de pipeta para suspender as células. Neste ponto, o volume da suspensão de células é registrado. Remover 100 µl da suspensão de células do tubo para contagem de células com um contador automático de células, por exemplo, um Celômetro Nexcelom K2. Determinar o número de células vivas na amostra e registrar.

[001729] Reservar um mínimo de 5×10^6 células para fenotipagem e

outros experimentos de caracterização. Girar as células reservadas a 400g por 5 minutos em temperatura ambiente para coletar o pélete de células. Ressuspender o pélete celular em meio de congelamento (FBS estéril, inativado por calor contendo DMSO a 20%). Congele uma ou duas alíquotas das células reservadas em meio de congelamento e congele lentamente as alíquotas em um freezer de células (Mr. Frosty™) em um freezer a -80 ºC. Transferir para armazenamento de nitrogênio líquido após um mínimo de 24 horas a -80 ºC.

[001730] Para as etapas a seguir, usar soluções pré-resfriadas, trabalhar rapidamente e manter as células frias. A próxima etapa é purificar a fração de células T da amostra de PBMC. Isso é concluído usando um Kit de isolamento de células T Pan (Miltenyi, número de catálogo 130-096-535). Preparar as células para purificação lavando-se as células com um tampão de lavagem esterilizado filtrado contendo PBS, BSA a 0,5% e EDTA a 2 mM a pH 7,2. A amostra de PBMC é centrifugada a 400g por 5 minutos para coletar o pélete celular. O sobrenadante é aspirado e o pélete celular é ressuspenso em 40 ul de tampão de lavagem para cada 10^7 células. Adicione 10 µl de Coquetel de Biotina-Anticorpo Pan T Cell para cada 10^7 células. Misturar bem e incubar por 5 minutos na geladeira ou no gelo. Adicionar 30 µl de tampão de lavagem para cada 10^7 células. Adicione 20 ul de Coquetel Pan T-cell MicroBead para cada 10^7 células. Misturar bem e incubar por 10 minutos na geladeira ou no gelo. Preparar uma coluna LS e separar magneticamente as células das microesferas. A coluna LS é colocada no campo magnético QuadroMACS. A coluna LS é lavada com 3 ml de tampão de lavagem frio e a lavagem é coletada e descartada. A suspensão de células é aplicada à coluna e o fluxo (células não marcadas) é coletado. Esse fluxo é a fração de células T enriquecida (PBLs). Lavar a coluna com 3 ml de tampão de lavagem e coletar o fluxo direto no mesmo tubo que o fluxo direto inicial. Tampar o tubo e colocar no gelo. Esta é a fração de células T, ou PBLs. Remover a coluna LS

do campo magnético, lavar a coluna com 5 ml de tampão de lavagem e coletar a fração de células não T (células marcadas magneticamente) em outro tubo. Centrifugar ambas as frações a 400g por 5 minutos para coletar os péletes de células. Os sobrenadantes são aspirados de ambas as amostras, romper o pélete e ressuspender as células em 1 ml de meio CM2 suplementado com 3000 UI/ml de IL-2 para cada pélete, e pipetar para cima e para baixo 5-10 vezes para quebrar os péletes. Adicionar 1-2 ml de CM2 a cada amostra, misturar bem cada amostra e armazenar na incubadora de cultura de tecidos para as próximas etapas. Remover cerca de uma alíquota de 50 µl de cada amostra, contar as células e registrar a contagem e a viabilidade.

[001731] As células T (PBLs) são então cultivadas com Dunabeads™ Human T-Expander CD3/CD28. Um frasco de estoque de Dynabeads é agitado em vórtex por 30 segundos em espalhamento médio. Uma alíquota de microesferas necessária é removida do frasco de estoque para um microtubo estéril de 1,5 ml. As microesferas são lavadas com solução de lavagem de microesferas adicionando-se 1 ml de lavagem de microesferas ao microtubo de 1,5 ml que contém as microesferas. Misturar delicadamente. Colocar o tubo no ímã DynaMag™-2 e deixar descansar por 30 minutos enquanto as microesferas atraem o ímã. Aspirar a solução de lavagem das contas e remover o tubo do ímã. 1 ml de meio CM2 suplementado com 3000 UI/ml de IL-2 é adicionado às microesferas. Todo o conteúdo do microtubo é transferido para um tubo cônico de 15 ou 50 ml. Trazer as microesferas para uma concentração final de cerca de 500000/ml usando meio CM2 com IL-2.

[001732] As células T (PBLs) e as microesferas são cultivadas juntas como segue. No dia 0: Em uma placa G-Rex de 24 poços, em um total de 7 ml por poço, adicionar 500000 células T, 500000 Dynabeads CD3/CD28 e CM2 suplementado com IL-2. A placa G-Rex é colocada em uma incubadora umidificada a 37 ºC, CO_2 a 5% até a próxima etapa do processo (no Dia 4). As células restantes são congeladas em meio de criopreservação CS10 usando

um congelador de células Mr. Frosty™. A fração de células não T de células é congelada em meio de criopreservação CS10 usando um congelador de células Mr. Frosty. No dia 4, o meio é trocado. Metade do meio (cerca de 3,5 ml) é removida de cada poço da placa G-rex. Um volume suficiente (cerca de 3,5 ml) de meio CM4 suplementado com 3000 UI/ml de IL-2 aquecido a 37 ºC é adicionado para substituir o meio removido de cada poço de amostra. A placa G-rex é devolvida à incubadora.

[001733] No dia 7, as células são preparadas para expansão por REP. A placa G-rex é removida da incubadora e metade do meio é removido de cada poço e descartado. As células são ressuspensas no meio restante e transferidas para um tubo cônico de 15 ml. Os poços são lavados com 1 ml de cada CM4 suplementado com 3000 UI/ml de IL-2 aquecido a 37 ºC e o meio de lavagem é transferido para o mesmo tubo de 15 ml com as células. Uma amostra representativa de células é removida e contada usando um contador automático de células. Se houver menos de 1×10^6 células vivas, o processo de expansão Dynabead no Dia 0 é repetido. O restante das células é congelado para expansão de back-up ou para fenotipagem e outros estudos de caracterização. Se houver 1×10^6 células vivas ou mais, a expansão REP é configurada em replicar de acordo com o protocolo do Dia 0. Alternativamente, com células suficientes, a expansão pode ser configurada em um frasco de cultura G-rex 10M usando 10-15 $\times 10^6$ PBLs por frasco e uma razão de 1:1 de Dynabeads:PBLs em um volume final de 100 ml/poço de meio CM4 suplementado com 3000 UI/ml de IL-2. A placa e/ou frasco é devolvido à incubadora. O excesso de PBLs pode ser aliquotado e congelado lentamente em um congelador de células Mr. Frosty™ em um congelador de -80 ºC e transferido para armazenamento de nitrogênio líquido após um mínimo de 24 horas a -80 ºC. Esses PBLs podem ser usados como amostras de backup para expansão ou para fenotipagem ou outros estudos de caracterização.

[001734] No Dia 11, o meio é trocado. Metade do meio é removida de cada poço da placa G-rex ou do frasco e substituída pela mesma quantidade de meio CM4 fresco suplementado com 3000 UI/ml de IL-2 a 37 ºC.

[001735] No Dia 14, os PBLs são colhidos. Se a placa G-rex for usada, cerca de metade do meio é removida de cada poço da placa e descartada. Os PBLs e microesferas são suspensos no meio restante e transferidos para um tubo cônico estéril de 15 ml (Tubo 1). Os poços são lavados com 1-2 ml de meio AIM-V fresco aquecido a 37 ºC e a lavagem é transferida para o tubo 1. O tubo 1 é tampado e colocado no ímã DynaMag™-15 por 1 minuto para permitir que as microesferas sejam atraídas pelo ímã. A suspensão de células é transferida para um novo tubo de 15 ml (tubo 2) e as microesferas são lavadas com 2 ml de AIM-V fresco a 37 ºC. O tubo 1 é colocado de volta no ímã por mais 1 minuto e o meio de lavagem é então transferido para o tubo 2. Os poços podem ser combinados, se desejado, após a etapa de lavagem final. Remover uma amostra representativa de células e contar, registrar a contagem e a viabilidade. Os tubos podem ser colocados na incubadora durante a contagem. Meio AIM-V adicional pode ser adicionado ao tubo 2 se as células parecerem muito densas. Se um frasco for usado, o volume no frasco deve ser reduzido para cerca de 10 ml. O conteúdo do frasco é misturado e transferido para um tubo cônico de 15 ml (Tubo A). O frasco é lavado com 2 ml do meio AIM-V conforme descrito acima e o meio de lavagem também é transferido para o tubo A. O tubo A é tampado e colocado no ímã DynaMag™-15 por 1 minuto para permitir que as microesferas sejam atraídas pelo ímã. A suspensão de células é transferida para um novo tubo de 15 ml (Tubo B) e as microesferas são lavadas com 2 ml de AIM-V fresco a 37 ºC. O tubo A é colocado de volta no ímã por mais 1 minuto, e o meio de lavagem é então transferido para o tubo B. Os poços podem ser combinados, se desejado, após a etapa de lavagem final. Remover uma amostra representativa de células e contar, registrar a contagem e a viabilidade. Os tubos podem ser colocados na

incubadora durante a contagem. Meio AIM-V adicional pode ser adicionado ao tubo B se as células parecerem muito densas. As células podem ser utilizadas frescas ou congeladas em meio de preservação CS10 nas concentrações desejadas.

EXEMPLO 7: UMA MODALIDADE EXEMPLIFICATIVA DE EXPANSÃO DE CÉLULAS T DE MALIGNÂNCIAS HEMATOPOIÉTICAS USANDO A PLATAFORMA DE EXPANSÃO GEN 3.

[001736] No Dia 0, uma fração de células T (CD3+, CD45+) é isolada de um produto de aférese enriquecido para linfócitos, sangue total ou digestão de tumor (fresco ou descongelado) usando métodos de seleção positiva ou negativa, ou seja, removendo as células T usando um marcador de células T (CD2, CD3, etc., ou remoção de outras células que deixam células T) ou centrifugação gradiente.

[001737] O processo Gen 3.1 é iniciado semeando aproximadamente 1×10^7 células/frasco de acordo com o processo Gen3 aqui descrito.

[001738] No Dia 7, as células são reativadas de acordo com o processo Gen 3.1.

[001739] No Dia 9-11, as células são aumentadas de acordo com o processo Gen 3.1.

[001740] No Dia 14-16, as células são colhidas de acordo com o processo Gen 3.1.

[001741] A Figura 42 fornece um diagrama esquemático de uma modalidade exemplificativa para expandir TILs de doenças malignas hematopoiéticas usando o processo Gen 3.

EXEMPLO 8: UMA MODALIDADE EXEMPLIFICATIVA DA PLATAFORMA DE EXPANSÃO GEN 3 NO DIA 0

[001742] Meios de lavagem de tumor preparados. O meio foi aquecido antes do início. Adicionou-se 5 ml de gentamicina (50 mg/ml) ao frasco de

500 ml de HBSS. Adicionou-se 5 ml de Tumor Wash Media a um cônico de 15 ml para ser usado para a diluição OKT3. Armazenar em temperatura ambiente (RT)

[001743] Sacos de células alimentadoras preparadas. Células de alimentação transferidas esterilmente para sacos de células alimentadoras e armazenadas a 37 ºC até o uso ou congelamento. Células de alimentação contadas se a 37 ºC. Células de alimentação descongeladas e contadas se congeladas.

[001744] A faixa ideal para a concentração de células alimentadoras está entre 5 x 10^4 e 5 x 10^6 células/ml. Preparou-se quatro tubos cônicos com 4,5 ml de AIM-V. Adicionou-se 0,5 ml de fração de células para cada contagem de células.

[001745] Se o número total de células alimentadoras viáveis era ≥ 1 x 10^9 células, prosseguia-se para a próxima etapa para ajustar a concentração da célula alimentadora. Calculou-se o volume de células alimentadoras a serem removidas da primeira bolsa de células alimentadoras para adicionar 1 x 10^9 células a uma segunda bolsa de células alimentadoras.

[001746] Usando a micropipeta p1000, transferiu-se 900 µl de meio de lavagem de tumor para a alíquota OKT3 (100 µl). Usando uma seringa e uma técnica estéril, extraiu-se 0,6 ml de OKT3 e adicionou-se à segunda bolsa de células alimentadoras. Volume de meio ajustado para um volume total de 2 l. Transferiu-se o segundo saco de células alimentadoras para a incubadora.

[001747] Detalhes da formulação de OKT3: OKT3 pode ser aliquotado e congelado na concentração de estoque original do frasco (1 mg/ml) em alíquotas de 100 ul. Alíquotas de aproximadamente 10X por frasco de 1 ml. Armazenou-se a -80C. Dia 0: 15 ug/frasco, ou seja, 30 ng/ml em 500 ml - 60 ul máx. aproximadamente 1 alíquota.

[001748] Amostras de tumor preparadas. Obteve-se uma placa de 6 poços e placas de petri de 100 mm (4 no total). A placa de 6 poços etiquetada

como “Excesso de pedaços de tumor”. Rotulado em cada uma das quatro placas de Petri de 100 mm como “Wash_01”, “Wash_02”, “Wash_03”, “Wash_04” e “Holding”.

[001749] Adicionou-se 5 ml de meio de lavagem de tumor em todos os poços da placa de 6 poços rotulada com “Excesso de pedaços de tumor”. Manteve-se o meio de lavagem de tumor disponível para uso posterior para manter o tumor hidratado durante a dissecção.

[001750] Adicionou-se 50 ml de meio de lavagem de tumor a cada placa de petri de 100 mm rotulada Wash_01, Wash_02, Wash_03 e Holding (Wash_04). Usando um marcador, rotular cada placa de Petri como Dissecção 1 a Dissecção 4. Incubou-se o tumor à temperatura ambiente em Wash_01 por ≥ 3 min. Incubou-se o tumor à temperatura ambiente em Wash_02 por ≥ 3 min. Incubou-se o tumor à temperatura ambiente em Wash_03 por ≥ 3 min. Wash_04 era para segurar o tumor após três lavagens serem concluídas. Depois que as lavagens foram concluídas, o tumor foi movido para a placa “Holding” para garantir que o tecido permanecesse hidratado.

[001751] Enquanto incubações de tumor estavam em andamento, transferidos 10 ml de meio de transporte de tumor para um tubo rotulado como meio de transporte de tumor. Retirou-se 10 ml do meio de transporte de tumor em uma seringa e inoculou-se em cada frasco de esterilidade anaeróbia e aeróbia 5 ml de meio de transporte de tumor.

[001752] Régua colocada sob a tampa da placa de Petri durante todo o processo de dissecção. Comprimento medido e registrado do tumor e o número de fragmentos. Dissecou-se o tumor em quatro pedaços intermediárias ou agrupou-se em quatro grupos de volume equivalente e que conservam a estrutura do tumor de cada pedaço intermediária. Mantenha os pedaços do tumor hidratados.

[001753] Transferiu-se quaisquer pedaços de tumor intermediários não sendo ativamente dissecados para o prato de retenção para manter o tecido

hidratado.

[001754] Dissecou-se o tumor em fragmentos de 27 mm^3 (3 x 3 x 3 mm), usando a régua sob a tampa do prato de dissecção como referência. Fragmento intermediário dissecado até atingir 60 fragmentos. Contou-se o número total de fragmentos finais e preparou-se os frascos G-Rex 100MCS de acordo com o número de fragmentos finais gerados (geralmente 60 fragmentos por frasco).

[001755] Fragmentos de tecido favoráveis retidos nos tubos cônicos rotulados como Tubo de Fragmento 1 a Tubo de Fragmento 4. Calculou-se o número de frascos G-Rex 100MCS para semear com suspensão de células alimentadoras de acordo com o número de tubos de fragmentos originados.

[001756] Retirou-se o saco de células alimentadoras da incubadora e semeou-se o G-Rex 100MCS. Rotular como D0 (Dia 0).

CULTURA DE ADIÇÃO DE FRAGMENTO DE TUMOR EM G-REX100MCS

[001757] Sob condições estéreis, desparafusou-se a tampa do G-Rex 100MCS rotulado como Cultura de Fragmentos de Tumor (D0) 1 e o tubo cônico de 50 ml rotulado como Tubo de Fragmento. Girou-se o Tubo de Fragmentos 1 aberto e, ao mesmo tempo, levantou-se ligeiramente a tampa do G-Rex100MCS. Adicionou-se o meio com os fragmentos ao G-Rex100MCS enquanto era agitado. Registrou-se o número de fragmentos transferidos para o G-Rex100MCS.

[001758] Uma vez que os fragmentos foram localizados no fundo do frasco GREX, extraiu-se 7 ml de meio e criou-se sete alíquotas de 1 ml - 5 ml para caracterização estendida e 2 ml para amostras de esterilidade. Armazenou-se as 5 alíquotas (sobrenadante da cultura do fragmento final) para caracterização estendida a -20 ºC até necessário.

[001759] Inoculou-se um frasco de BacT/Alert anaeróbico e um frasco de BacT/Alert aeróbio, cada um com 1 ml do sobrenadante da cultura do

fragmento final. Repetir para cada frasco amostrado.

EXEMPLO 9: UMA MODALIDADE EXEMPLIFICATIVA DA PLATAFORMA DE EXPANSÃO GEN 3 NO DIA 7-8

[001760] Sacos de células alimentadoras preparadas. Sacos de alimentadoras descongeladas por 3-5 minutos em banho-maria a 37 ºC quando congeladas. Células alimentadoras contadas se congeladas.

[001761] A faixa ideal para a concentração de células alimentadoras está entre 5 x 10^4 e 5 x 10^6 células/ml. Preparou-se quatro tubos cônicos com 4,5 ml de AIM-V. Adicionou-se 0,5 ml de fração de células para cada contagem de células em um novo tubo criotubo. Misturou-se bem as amostras e prosseguiu-se com a contagem de células.

[001762] Se o número total de células alimentadoras viáveis era ≥ 2 x 10^9 células, prosseguia-se para a próxima etapa para ajustar a concentração da célula do alimentador. Calculou-se o volume de células alimentadoras a serem removidas da primeira bolsa de células alimentadoras para adicionar 2 x 10^9 células à segunda bolsa de células alimentadoras.

[001763] Usando a micropipeta p1000, transferir 900 µl de HBSS para uma alíquota de 100 µl OKT3. Misturar pipetando-se para cima e para baixo 3 vezes. Preparou-se duas alíquotas.

[001764] Detalhes da formulação OKT3: OKT3 pode ser aliquotado e congelado na concentração de estoque original do frasco (1 mg/ml) em alíquotas de 100 ul. Alíquotas de aproximadamente 10X por frasco de 1 ml. Armazenou-se a -80C. Dia 7/8: 30 ug/frasco, ou seja, 60 ng/ml em 500 ml - 120 ul máx. aproximadamente 2 alíquotas.

[001765] Usando uma seringa e técnica estéril, extraiu-se 0,6 ml de OKT3 e adicionou-se na bolsa de células alimentadoras, garantindo que todos foram adicionados. Volume de meio ajustado para um volume total de 2 l. Repetiu-se com a segunda alíquota OKT3 e adicionou-se ao saco de células alimentadoras. Transferiu-se o segundo saco de células alimentadoras para a

incubadora.

PREPARAR O FRASCO G-REX100MCS COM SUSPENSÃO DE CÉLULA ALIMENTADORA

[001766] Registrou-se o número de frascos G-Rex 100MCS a serem processados de acordo com o número de frascos G-Rex gerados no Dia 0. Removeu-se o frasco G-Rex da incubadora e removeu-se o segundo saco de células alimentadoras da incubadora.

REMOÇÃO DO SOBRENADANTE ANTES DA ADIÇÃO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS ALIMENTADORAS:

[001767] Conectou-se uma seringa de 10 ml ao frasco G-Rex100 e extraiu-se 5 ml de meio. Criou-se cinco alíquotas de 1 ml - 5 ml para caracterização estendida e armazenou-se as 5 alíquotas (sobrenadante da cultura do fragmento final) para caracterização estendida a -20 ºC até ser solicitado pelo patrocinador. Rotulou-se e repetiu-se para cada frasco G-Rex100.

[001768] Amostras de 5-20 x 1 ml para caracterização, dependendo do número de frascos de osn:

- 5 ml = 1 frasco
- 10 ml = 2 frascos
- 15 ml = 3 frascos
- 20 ml = 4 frascos

[001769] Continuação da semeadura de células alimentadoras no G-Rex100 MCS e repetiu-se para cada frasco G-Rex100 MCS. Usando métodos de transferência estéreis, a gravidade transferiu 500 ml do segundo saco de células alimentadoras por peso (suponha 1 g = 1 ml) para cada frasco G-Rex 100MCS e a quantidade foi registrada. Rotulou-se como cultura do dia 7 e repetiu-se para cada frasco G-Rex100. Frascos G-Rex 100MCS transferidos para a incubadora.

EXEMPLO 10: UMA MODALIDADE EXEMPLIFICATIVA DA

PLATAFORMA DE EXPANSÃO GEN 3 NO DIA 10-11

[001770] Removeu-se o primeiro frasco G-Rex 100MCS e, usando condições estéreis, removeu-se 7 ml de sobrenadante de cultura de pré-processamento usando uma seringa de 10 ml. Criou-se sete alíquotas de 1 ml - 5 ml para caracterização estendida e 2 ml para amostras de esterilidade.

[001771] Misturou-se o frasco cuidadosamente e, usando uma nova seringa de 10 ml, removeu-se 10 ml do sobrenadante e transferiu-se para um tubo de 15 ml rotulado como Sobrenadante de Micoplasma D10/11.

[001772] Misturou-se o frasco cuidadosamente girando suavemente para colocar as células em suspensão. Utilizando uma nova seringa, removeu-se o volume abaixo de acordo com a quantidade de frascos a serem processados e adicionou-se em um tubo cônico de 50 ml. As amostras retiradas de cada frasco foram mantidas separadas e não agrupadas.

- 1 frasco = 40 ml
- 2 frascos = 20 ml/frasco
- 3 frascos = 13,3 ml/frasco
- 4 frascos = 10 ml/frasco

[001773] Rotulou-se cada tubo cônico como Nº de Frasco de Amostra QC Dia 10/11. Armazenou-se na incubadora até necessário na seção 14. Repetir para cada frasco.

[001774] Um total de 40 ml deve ser retirado de todos os frascos e agrupado em um tubo cônico de 50 ml denominado “Amostra QC do Dia 10/11” e armazenou-se na incubadora até ser necessário. Realizou-se uma contagem de células e alocou-se as células.

[001775] Armazenou-se as 5 alíquotas (sobrenadante de cultura de pré-processamento) para caracterização estendida a ≤-20 ºC até necessário. Inoculou-se um frasco de BacT/Alert anaeróbico e um frasco de BacT/Alert aeróbio, cada um com 1 ml de sobrenadante de cultura pré-processamento.

[001776] Continuou-se com a suspensão de células transferida para o G-

Rex 500MCS e repetiu-se para cada G-Rex 100MCS. Usando condições estéreis, transferiu-se o conteúdo de cada G-Rex 100MCS para um G-Rex 500MCS, monitorando cerca de 100 ml de transferência de fluido por vez. Transferência interrompida quando o volume do G-Rex 100MCS foi reduzido para 500 ml (ou em alguns casos cerca de 100 ml).

[001777] Durante a etapa de transferência, usou-se uma seringa de 10 ml e colocou-se 10 ml de suspensão de células na seringa do G-Rex 100MCS. Seguiu-se as instruções de acordo com o número de frascos em cultura. Se apenas 1 frasco: removeu-se 20 ml no total usando duas seringas. Se eram 2 frascos: removeu-se 10 ml por frasco. Se eram 3 frascos: removeu-se 7 ml por frasco. Se eram 4 frascos: removeu-se 5 ml por frasco. Transferiu-se a suspensão de células para um tubo cônico comum de 50 ml. Manter na incubadora até a etapa de contagem de células e amostra QC. O número total de células necessárias para o QC foi de aproximadamente 20e6 células: 4 x 0,5 ml de contagens de células (as contagens de células não foram diluídas primeiro).

[001778] Células necessárias para os ensaios:

- Mínimo de 10e6 células para ensaio de IFN-G
- 1e6 células para micoplasma
- 5e6 células para CD3+/CD45+

[001779] Transferiu-se os frascos G-Rex 500MCS para a incubadora.

AMOSTRAS QC PREPARADAS

[001780] São necessárias pelo menos 15 x 10^8. Os ensaios incluíram: contagem de células e viabilidade; Micoplasma (1 x 10^6 células/concentração viável média;) Citometria de fluxo e fenotipagem (5 x 10^6 células/concentração média viável;) e ensaio de IFN-g (**5 x 10^6 células - 1 x 10^6 células**; 8-10 x 10^6 células são necessárias para o ensaio de IFN-γ.

[001781] Calculou-se o volume da fração de células para criopreservação em 10 x 10^6 células/ml e calculou-se o número de frascos

para preparar.

EXEMPLO 11: UMA MODALIDADE EXEMPLIFICATIVA DA PLATAFORMA DE EXPANSÃO GEN 3 DIA 16-17

PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM (HAS A 1% PLASMALYTE A)

[001782] Transferiu-se HSA e Plasmalyte para um saco de 5 l para fazer o tampão de lavagem LOVO. Usando condições estéreis, transferiu-se um volume total de 125 ml de HSA a 25% para a bolsa de 5 l. Armazenou-se em temperatura ambiente.

[001783] Removeu-se e transferiu-se 10 ml ou 40 ml de tampão de lavagem no tubo "IL-2 6 x 10^4 UI/ml" (10 ml se IL-2 foi preparado com antecedência ou 40 ml se IL-2 foi preparado fresco). Quando a IL-2 foi preparada fresca: misturou-se o saco de tampão de lavagem LOVO e, usando uma seringa de tamanho apropriado, removeu-se e transferiu-se 40 ml de tampão de lavagem para o tubo "IL-2 6 x 10^4 UI/ml". Quando a IL-2 foi preparada com antecedência, a IL-2 era uma alíquota de 6 x 10^4 UI/ml.

[001784] Volume calculado de IL-2 reconstituído para adicionar ao Plasmalyte + HSA a 1%: volume de IL-2 reconstituído = (concentração final de IL-2 x volume final)/atividade específica da IL-2 (com base no ensaio padrão e protocolo de fabricação). A concentração final de IL-2 era de 6 x 10^4 UI/ml. O volume final foi de 40 ml.

[001785] Removeu-se o volume inicial calculado de IL-2 necessário de IL-2 reconstituída e transferiu-se para o tubo "IL-2 6 x 10^4 UI/ml". Adicionou-se 100 µl de IL-2 6 x 10^6 UI/ml da alíquota preparada com antecedência ao tubo rotulado como "IL-2 6 x 10^4 UI/ml" contendo 10 ml de tampão de lavagem LOVO.

[001786] Removeu-se cerca de 4500 ml de sobrenadante dos frascos G-Rex 500MCS. Agitou-se o sobrenadante restante e transferiu-se as células para o saco Cell Collection Pool. Repetiu-se com todos os frascos G-Rex

500MCS.

[001787] Removeu-se 60 ml de sobrenadante e adicionou-se aos tubos de sobrenadante para ensaios de controle de qualidade, incluindo detecção de micoplasma. Armazenou-se em +2-8 ºC.

COLEÇÃO DE CÉLULAS

[001788] Células contadas. Preparar quatro cônicos de 15 ml com 4,5 ml de AIM-V. Estes podem ser preparados com antecedência. Faixa ideal = está entre 5 x 10^4 e 5 x 10^6 células/ml. (Diluição 1:10 foi recomendada). Para diluição 1:10, a 4500 µl de AIM V preparado anteriormente, adicionar 500 µl de CF. Fator de diluição registrado.

Calculou-se o TC (Células Totais) pré-LOVO (vivas + mortas) =

Média Total de Células

Concentração (conc TC pré LOVO)

(vivas + mortas)

X

Volume da bolsa fonte

Calculou-se as TVC (Células Viáveis Totais) pré-LOVO (vivas) =

Média Total de Células Viáveis

Concentração (TVC pré LOVO)

(vivas)

X

Volume do saco fonte LOVO

[001789] Quando o número total de células (TC) era > 5 x 10^9, removia-se 5 x 10^8 células para serem criopreservadas como amostras de retenção de MDA. 5 x 10^8 ÷ concentração média de TC (etapa 14.44) = volume a ser removido

[001790] Quando o número total de células (TC) era ≤ 5 x 10^9, removia-se 4 x 10^6 células para serem criopreservadas como amostras de retenção de MDA. 4 x 10^6 ÷ concentração média de TC = volume a ser removido.

[001791] Usou-se uma seringa de tamanho apropriado para remover o volume necessário da bolsa fonte de LOVO. Reteve-se na incubadora até as etapas de criopreservação.

[001792] Quando o número total de celulares era determinado, o número de células a serem removidas devia permitir a retenção de 150 x 10^9 células viáveis. Conformar TVC pré-LOVO 5 x 10^8 ou 4 x 10^6 ou não aplicável. Calculou-se o volume de células a serem removidas.

[001793] Calculou-se o Total de Células Restantes na bolsa. Calculou-se as TC (Células Totais) pré-LOVO. [XConcentração Célula Viável total de células X Volume restante = TC pré-LOVO restante]

[001794] De acordo com o número total de células restantes, selecionou-se o processo correspondente na tabela a seguir:

Células totais:	***Retentado (ml)***
0 < Células totais ≤ 31 x 10^9	**115**
31 x 10^9 < Células totais ≤ 71 x 10^9	**165**
71 x 10^9 < Total de células ≤ 110 x 10^9	**215**
110 x 10^9 < Células totais ≤ 115 x 10^9	**265**

[001795] Escolher o volume de IL-2 a adicionar o correspondente ao processo utilizado. Volume calculado como: Volume de retentado x 2 x 300 UI/ml = UI de IL-2 necessária. UI de IL-2 necessária/6 x10^4 UI/ml = Volume de IL-2 para adicionar a bolsa pós-LOVO. Registrou-se todos os volumes adicionados. Amostras obtidas em criotubo para análises posteriores.

[001796] Misturou-se bem o produto celular. Vedou-se todos os sacos para processamento posterior, incluindo criopreservação quando aplicável.

[001797] Realizou-se Enodxoton, IFN-γ, esterilidade e outros ensaios, conforme necessário, nas amostras criotubas obtidas.

EXEMPLO 12: PROCESSO EXEMPLIFICATIVO DE GEN 3 (TAMBÉM REFERIDO COMO GEN 3.1)

PROPÓSITO

[001798] Este exemplo descreve estudos adicionais sobre a "Comparabilidade entre os processos Gen 2 e Gen 3 para a expansão de TIL".

O processo Gen 3 foi modificado para incluir uma etapa de ativação no início do processo com o objetivo de aumentar a produção final de células viáveis totais (TVC) para ser comparável (ou melhor) àquela em Gen 2, mantendo os perfis fenotípicos e funcionais como visto anteriormente.

ESCOPO

[001799] Avaliação de saída de TVC através da introdução de uma etapa de ativação para os fragmentos de tumor cultivados no Dia 0.

[001800] Comparabilidade demonstrada em termos de caracterização fenotípica funcional e estendida com o padrão Gen 3, bem como um braço de controle, em dois tumores de pacientes independentes.

[001801] O consumo de meio analisado e a produção de metabólitos para confirmar os parâmetros de processamento foram mantidos em condições fisiológicas.

[001802] Todas as execuções para este exemplo foram realizadas em plataforma em escala real usando tecido tumoral de doador comercial como material de partida.

INFORMAÇÕES

[001803] A modalidade do Processo de Gen 3 foi modificada como uma modalidade adicional e é referida neste exemplo como Gen 3.1.

[001804] O conceito de fabricação de TIL de Gen 3.1 tem quatro intervenções do operador:

[001805] 1. Isolamento e ativação de fragmentos de tumor: No dia 0 do processo, o tumor foi dissecado e os fragmentos finais geraram aproximadamente 3 x 3 mm cada (até 240 fragmentos no total) e cultivados em frascos de 1-4 G-Rex100MCS. Cada frasco continha até 60 fragmentos, 500 ml de meio CM1 ou DM1 e suplementado com 6000 UI de rhIL-2, 15 μg de OKT3 e 2,5 x 10^8 células mononucleares alogênicas irradiadas. A cultura foi incubada a 37 ºC durante 6-8 dias.

[001806] 2. Reativação da cultura de TIL: No dia 7-8, a cultura foi

suplementada por meio da adição lenta de meio CM2 ou DM1 suplementado com 6000 UI de rhIL-2, 30 μg de OKT3 e 5 x 10^8 células mononucleares alogênicas irradiadas em ambos os casos. Foi tomado cuidado para não perturbar as células existentes no fundo do frasco. A cultura foi incubada a 37 ºC durante 3-4 dias.

[001807] 3. Aumento da escala da cultura: ocorre no dia 10-11. Durante o aumento de escala da cultura, todo o conteúdo do G-Rex100MCS foi transferido para um frasco G-Rex500MCS contendo 4 l de CM4 ou DM2 suplementado com 3000 UI/ml de IL-2 em ambos os casos. Os frascos foram incubados a 37 ºC durante 5-6 dias até à colheita.

[001808] 4. Colheita/Lavagem/Formulação: Nos dias 16-17, o volume dos frascos é reduzido e agrupado. As células foram concentradas e lavadas com PlasmaLyte A pH 7,4 contendo HSA a 1%. A suspensão de células lavadas foi formulada em uma razão de 1:1 com CryoStor10 e suplementada com rhIL-2 para uma concentração final de 300 UI/ml.

[001809] O DP foi criopreservado com uma taxa de congelamento controlada e armazenado em nitrogênio líquido em fase de vapor. *Meio TIL padrão completo 1, 2 ou 4 (CM1, CM2, CM4) pode ser substituído pelo meio de expansão livre de soro CTS™ OpTmizer™ T-Cell, referido como meio definido (DM1 ou DM2), conforme observado acima. Para uma visão geral do processo, consultar, por exemplo, as Figuras 70 e 71.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

[001810] No dia 0, o tumor foi lavado 3 vezes, depois fragmentado em fragmentos finais 3 x 3 x 3. Uma vez que todo o tumor foi fragmentado, os fragmentos finais foram randomizados igualmente e divididos em três pools. Um pool de fragmentos aleatórios foi introduzido em cada braço, adicionando o mesmo número de fragmentos pelas três matrizes experimentais.

[001811] A expansão do tumor L4063 foi realizada com meio padrão e a expansão do tumor L4064 foi realizada com meio definido (CTS OpTmizer)

para todo o processo de expansão de TIL. Os componentes do meio são descritos neste documento.

[001812] Meio completo 1 de CM1: RPMI + Glutamina suplementado com Glutamax 2 mM, Soro AB humano a 10%, Gentamicina (50 ug/ml), 2-Mercaptoetanol (55 uM). Formulação de meio final suplementada com 6000 UI/ml de IL-2

[001813] Meio Completo 2 CM2: meio CM1 a 50% + meio AIM-V a 50%. Formulação de meio final suplementada com 6000 UI/ml de IL-2

[001814] Meio completo CM4 4: AIM-V suplementado com Glutamax (2 mM). Formulação de meio final suplementada com 3000 UI/ml de IL-2

[001815] CTS OpTmizer CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado com CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26ml/l).

[001816] DM1: CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado com CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26 ml/l) e CTS™ Immune Cell SR (a 3%), com Glutamax (a 2 mM). Formulação final suplementada com 6000 UI/ml de IL-2.

[001817] DM2: CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado com CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26 ml/l) e CTS™ Immune Cell SR (a 3%), com Glutamax (2 mM). Formulação final suplementada com 3000 UI/ml de IL-2.

[001818] Todos os tipos de meios usados, ou seja, meios completos (CM) e definidos (DM), foram preparados com antecedência, mantidos a um grau de 4 ºC até o dia anterior ao uso e aquecidos a 37 ºC em uma incubadora por até 24 horas com antecedência antes do dia do processo.

[001819] A reativação da cultura TIL ocorreu no dia 7 para ambos os tumores. O aumento de escala ocorreu no dia 10 para L4063 e no dia 11 para L4064. Ambas as culturas foram colhidas e criopreservadas no Dia 16.

RESULTADOS ESPERADOS

[001820] Gen 3.1 pode atingir um maior número total de células viáveis na colheita nos dias 16-17 em comparação com Gen 3.0.

[001821] Gen 3.1 pode produzir níveis semelhantes de IFNɣ após a nova estimulação, em relação a Gen 3.0.

[001822] Gen 3.1 e Gen 3.0 podem ter uma diversidade clonal semelhante, medida por sequências CDR3 únicas totais presentes no produto de TIL final.

[001823] As características fenotípicas no processo Gen 3.1 podem ser semelhantes às Gen 3.0.

RESULTADOS ALCANÇADOS

[001824] As células contadas e a % de viabilidade para os processos Gen 3.0 e Gen 3.1 foram determinadas. A expansão em todas as condições obedeceu aos detalhes descritos neste exemplo.

CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS E EXPANSÃO DE DOBRA

[001825] Para cada tumor, os fragmentos foram divididos em três conjuntos de números iguais. Devido ao pequeno tamanho dos tumores, o número máximo de fragmentos por frasco não foi alcançado. Para os três processos diferentes, as células viáveis totais e a viabilidade celular foram avaliadas para cada condição. As contagens de células foram determinadas como TVC no dia 7 para reativação, TVC no dia 10 (L4064) ou dia 11 (L4063) para aumento de escala e TVC na colheita no dia 16/17.

[001826] As contagens de células para o Dia 7 e Dia 10/11 foram tomadas FIO. A expansão de dobras foi calculada dividindo-se o dia de colheita 16/17 TVC pelo dia 7 de reativação TVC. Para comparar os três braços, a TVC no dia da colheita foi dividida pelo número de fragmentos adicionados na cultura no Dia 0, a fim de calcular uma média de células viáveis por fragmento.

[001827] Contagens de células e ensaios de viabilidade foram realizados

para L4063 e L4064. Conforme indicado na Figura 73, o processo de Teste de Gen 3.1 produziu mais células por fragmento do que o processo Gen 3.0 em ambos os tumores.

[001828] Figura 74: Contagem de células viáveis totais e expansão dobrada

% DE VIABILIDADE DURANTE O PROCESSO

[001829] Na reativação, aumento de escala e colheita, a porcentagem de viabilidade foi realizada em todas as condições. No dia 16/17 da colheita, a TVC final foi comparada com os critérios de liberação para % de viabilidade. Todas as condições avaliadas ultrapassaram o critério de viabilidade de 70% e eram comparáveis entre processos e tumores, conforme mostrado na Figura 74.

IMUNOFENOTIPAGEM

[001830] Caracterização fenotípica do produto final de TIL.

[001831] Os produtos finais foram submetidos à análise de citometria de fluxo para testar os marcadores de pureza, diferenciação e memória. As populações percentuais foram consistentes para células TCRα/β, CD4+ e CD8+ para todas as condições.

[001832] A análise fenotípica estendida de REP TIL foi realizada. O produto de TIL mostrou uma maior porcentagem de células CD4+ para condições de Gen 3.1 em comparação com Gen 3.0 em ambos os tumores, e maior porcentagem de células CD28+ da população de CD8+ para Gen 3.0 em comparação com as condições de Gen 3.1 em ambas as condições.

[001833] Os TIL colhidos dos processos Gen 3.0 e Gen 3.1 mostraram marcadores fenotípicos comparáveis como expressão de CD27 e CD56 em células CD4+ e CD8+, e uma expressão de CD28 comparável na população de células CD4+. A Figura 75 mostra os marcadores fenotípicos do produto de TIL final para os processos Gen 3.0 e Gen 3.1. Figura 75: Caracterização fenotípica do produto TIL final para L4063 e L4064.

COMPARAÇÃO DE MARCADORES DE MEMÓRIA NO PRODUTO FINAL DE TIL:

[001834] A Figura 76 mostra os marcadores de memória do produto final de TIL que foram determinados por citometria de fluxo multicolor. Amostras congeladas de TIL colhidas no dia 16 foram coradas para análise. O status da memória TIL era comparável entre os processos Gen 3.0 e Gen 3.1. Figura 76: Análise do marcador de memória do produto de TIL para L4063 e L4064.

COMPARAÇÃO DOS MARCADORES DE ATIVAÇÃO E EXAUSTÃO NO PRODUTO FINAL DE TIL:

[001835] As Figuras 77 e 78 mostram a ativação e exaustão do produto final de TIL que foram determinadas por citometria de fluxo multicolor. Os marcadores de ativação e exaustão foram comparáveis entre os processos Gen 3.0 e Gen 3.1 delimitados em células CD4+ (Figura 77) e CD8+ (Figura 78). Figura 77: Marcadores de ativação e exaustão bloqueados em células CD4+ para L4063 e L4064. Tabela 78: Marcadores de ativação e exaustão bloqueados em células CD8+ para L4063 e L4064.

SECREÇÃO DE INTERFERON GAMA APÓS A NOVA ESTIMULAÇÃO:

[001836] O TIL colhido foi submetido a uma nova estimulação durante a noite com placas anti-CD3 revestidas para L4063 e L4064. Maior produção de IFNγ a partir do processo Gen 3.1 foi observada nos dois tumores analisados em comparação com o processo Gen 3.0. A produção de IFNγ em cada condição é mostrada na Figura 79. Figura 79: Produção de IFN-γ (pg/ml) para o produto final nos processos Gen 3.0 e Gen 3.1.

MEDIÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-2 EM MEIOS DE CULTURA

[001837] Para comparar os níveis de consumo de IL-2 entre todas as condições e processos, os sobrenadantes celulares foram coletados no início da reativação no Dia 7, no aumento de escala no Dia 10 (L4064)/11 (L4063) e na colheita no Dia 16/17 e congelados. Os sobrenadantes foram

subsequentemente descongelados e analisados. A quantidade de IL-2 no sobrenadante da cultura celular foi medida pelo protocolo do fabricante. As sequências são mostradas na Figura 80.

[001838] Os processos gerais de Gen 3 e Gen 3.1 foram comparáveis em termos de consumo de IL-2 durante o processo completo avaliado nas mesmas condições de meio. Figura 80: análise da concentração de IL-2 (pg/ml) em meio gasto coletado para L4063 e L4064.

ANÁLISE DE METABÓLITOS

[001839] Os sobrenadantes de meio gastos foram colhidos de L4063 e L4064 no início da reativação no dia 7, aumento de escala no dia 10 (L4064) ou dia 11 (L4063) e na colheita nos dias 16/17 para L4063 e L4064, para cada condição. Os sobrenadantes foram analisados em um bioanalisador CEDEX para concentrações de glicose, lactato, glutamina, glutamax e amônia. A Figura 81 mostra a concentração de glicose em meio gasto colhido para processos Gen 3.0 e Gen 3.1 para tumores L4063 e L4064.

[001840] O meio definido tem uma concentração de glicose mais alta de 4,5 g/l em comparação com o meio completo (2 g/l). No geral, a concentração e o consumo de glicose foram comparáveis para os processos Gen 3.0 e Gen 3.1 dentro de cada tipo de meio. Figura 81: Concentração de glicose (g/l) em meio gasto para L4063 e L4064.

[001841] Um aumento no lactato foi observado para ambos os tumores, L4063 e L4064, para todas as condições de teste. O aumento no lactato foi comparável entre as condições Gen 3.0 e Gen 3.1 e entre os dois meios usados para a expansão da reativação (meio completo para L4063 e meio definido para L4064).

[001842] A Figura 82 mostra a concentração de lactato no meio gasto coletado para as condições dos processos Gen 3.0 e Gen 3.1 para ambos os tumores L4063 e L4064. Figura 82: Concentração de lactato (g/l) em meio gasto para L4063 e L4064.

[001843] No caso de L4063, o meio basal padrão continha L-glutamina a 2 mM e foi suplementado com glutamax a 2 mM para compensar a degradação natural de L-glutamina em condições de cultura em L-glutamato e amônia.

[001844] Para o tumor L4064, o meio definido (sem soro) utilizado não continha L-glutamina no meio basal e foi suplementado apenas com glutamax até uma concentração final de 2 mM. O glutamax é um dipeptídeo de L-alanina e L-glutamina, é mais estável que a L-glutamina em soluções aquosas e não se degrada espontaneamente em glutamato e amônia. Em vez disso, o dipeptídeo é gradualmente dissociado em aminoácidos individuais, mantendo assim uma concentração mais baixa, mas suficiente de L-glutamina para sustentar o crescimento celular robusto. A Figura 83 e a Figura 84 mostram a concentração de glutamina e glutamax, respectivamente, em meio gasto colhido em condições de processos Gen 3.0 e Gen 3.1 para ambos os tumores L4063 e L4064.

[001845] Para o L4063, a concentração de glutamina e glutamax diminuiu ligeiramente no dia do aumento de escala, mas no dia da colheita mostrou um aumento para níveis semelhantes ou mais próximos em comparação com o dia da reativação. Para o L4064, a concentração de glutamina e glutamax apresentou leve degradação em taxa semelhante entre as diferentes condições, durante todo o processo. Figura 83: Concentração de glutamina (mmol/l) em meio gasto para L4063 e L4064. Figura 84: Concentração de glutamax (mmol/l) em meio gasto para L4063 e L4064.

[001846] A Figura 85 mostra a concentração de amônia no meio gasto coletado para os processos Gen 3.0 e Gen 3.1 para ambos os tumores L4063 e L4064. Como esperado, as concentrações de amônia foram maiores para L4063 (cultivado em meio padrão contendo glutamina a 2 mM + glutamax a 2 mM) do que L4064 (cultivado em meio definido contendo glutamax a 2 mM). Além disso, como esperado, houve um aumento gradual ou acúmulo de

amônia no decorrer da cultura. Não houve diferenças nas concentrações de amônia nas três diferentes condições de teste. Figura 85: Concentração de amônia (mmol/l) em meio gasto para L4063 e L4064.

TELÔMERO SE REPETE POR FLOW - FISH:

[001847] A tecnologia Flow-FISH foi usada para medir o comprimento médio da repetição do telômero em L4063 e L4064 sob os processos Gen 3 e Gen 3.1. A determinação de um comprimento relativo do telômero (RTL) foi calculada usando o kit Telomere PNA/FITC para análise de citometria de fluxo da DAKO. O ensaio do telômero foi realizado.

[001848] O comprimento do telômero em amostras de L4063 e L4064 foi comparado a uma linha de células de controle (1301 leucemia). A linha de células de controle é uma linha de células tetraploide com telômeros estáveis longos, que permite o cálculo de um comprimento relativo dos telômeros. Os processos Gen 3 e Gen 3.1 avaliados em ambos os tumores mostraram comprimento de telômero comparável, conforme mostrado na Figura 86. Figura 86: Resumo do comprimento relativo do telômero (RTL) em comparação com a linha celular de controle (1301).

ANÁLISE DE REPERTÓRIO TCR Vβ

[001849] Para determinar a diversidade clonal dos produtos celulares gerados em cada processo, os produtos finais de TIL foram testados para análise de diversidade clonal por meio do sequenciamento da porção CDR3 dos receptores de células T.

[001850] Três parâmetros foram comparados entre as três condições:

- Índice de diversidade de CDR3 única (uCDR3)
- % de uCDR3 compartilhada
- Para os primeiros 80% de uCDR3:
    - Comparar a % de cópias de uCDR3 compartilhadas
    - Comparar a frequência de clonotipos únicos

[001851] Figura 87: Resumo do repertório de TCR Vβ para L4063 e

L4064. Descrever a clonalidade de TIL para o produto TIL final no tumor L4063 e L4064 nas condições Gen 3 e Gen 3.1, conforme medido pelo repertório TCR Vβ.

[001852] Figura 89: Comparação entre Gen 3 e Controle de Gen3.1 e Teste de Gen 3.1, porcentagem compartilhada de sequências CDR3 exclusivas em L4063 no produto celular colhido de TIL para: 975 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e teste de Gen 3.1, equivalente a 88% dos primeiros 80% de sequências CDR3 exclusivas de Gen 3 compartilhadas com o produto final de Teste de Gen 3.1.

[001853] Figura 88: Comparação de frequência L4063 de sequências CDR3 únicas no produto celular final colhido de TIL entre os processos Gen 3.0 e Gen 3.1.

[001854] Figura 90: Comparação entre Gen 3 e Controle de Gen3.1 e Teste de Gen 3.1, porcentagem compartilhada de sequências CDR3 únicas em L4064 no produto celular colhido de TIL para: 2163 sequências são compartilhadas entre o produto final de Gen 3 e teste de Gen 3.1, equivalente a 87% dos primeiros 80% de sequências CDR3 exclusivas de Gen 3 compartilhadas com o produto final de Teste de Gen 3.1.

[001855] Figura 91: Comparação de frequência L4064 de sequências CDR3 únicas no produto celular final colhido de TIL entre os processos Gen 3.0 e Gen 3.1.

[001856] O número de sequências CD3 únicas identificadas a partir de 1 x 10^6 células colhidas no dia 16 da Colheita, para os diferentes processos. A condição de teste Gen 3.1 mostrou uma diversidade clonal ligeiramente maior em comparação com Gen 3.0 com base no número de CDRs de peptídeo único dentro da amostra.

[001857] O índice de diversidade de entropia de Shanon é uma métrica mais confiável e comum para comparação, pois as condições Gen 3.1 em ambos os tumores mostraram uma diversidade ligeiramente maior do que o

processo Gen 3, sugerindo que o repertório de TCR Vβ para a condição de teste Gen 3.1 é mais policlonal do que o processo Gen 3.0.

[001858] Além disso, o repertório TCR Vβ para a condição de teste Gen 3.1 mostrou mais de 87% de sobreposição com o repertório correspondente para o processo Gen 3.0 em ambos os tumores L4063 e L4064.

INFORMAÇÃO ADICIONAL

[001859] O valor da concentração de IL-2 no meio gasto para o L4064 de Teste de Gen 3.1 no dia da reativação estava abaixo do valor esperado (semelhante ao controle de Gen 3.1 e a condição de Gen 3.0).

[001860] O valor baixo pode ser devido a um erro de pipetagem, mas por causa da amostra mínima colhida não foi possível repetir o ensaio.

[001861] O meio gasto da escala até o dia 10/11 na amostra L4064 não foi coletada e não foi incluída na análise da concentração de IL-2 e na análise de metabólito no sobrenadante.

CONCLUSÕES

[001862] A condição de teste de Gen 3.1 incluindo alimentadoras e OKT-3 no Dia 0 mostrou uma TVC maior de doses de células no dia 16 da Colheita em comparação com Gen 3.0 e controle de Gen 3.1. TVC no produto final para condição de teste Gen 3.1 foi cerca de 2,5 vezes maior do que Gen 3.0.

[001863] A condição de teste Gen 3.1 com a adição de OKT-3 e das alimentadoras no dia 0, para ambos os tumores L4063 e L4064, atingiu a capacidade máxima do frasco na colheita. Nessas condições, se um máximo de 4 frascos no dia 0 for iniciado, a dose celular final pode ser entre 80 - 100E + 09 TILs.

[001864] Todos os atributos de qualidade, como caracterização fenotípica, incluindo pureza, exaustão, ativação e marcadores de memória no produto TIL final, foram mantidos e comparáveis entre o teste de Gen 3.1 e o processo Gen 3.0. O comprimento do telômero no produto final de TIL e o

consumo de IL-2 no meio gasto foram comparáveis entre os processos Gen 3.0 e Gen 3.1.

[001865] A produção de IFN gama no produto de TIL final foi 3 vezes maior no Gen 3.1 com a adição de alimentadora e OKT-3 no dia 0, em comparação com Gen 3.0 nos dois tumores analisados, sugerindo que o processo Gen 3.1 gerou um produto de TIL potente.

[001866] Nenhuma diferença observada nos níveis de glicose ou lactato nas condições de teste. Nenhuma diferença observada na glutamina e amônia entre os processos Gen 3.0 e Gen 3.1 nas condições de meio. Os baixos níveis de glutamina no meio não estão limitando o crescimento celular e sugerem que a adição de glutamax apenas no meio é suficiente para fornecer os nutrientes necessários para fazer as células proliferarem.

[001867] O dia de aumento de escala para L4063 e L4064 foi no dia 11 e no dia 10, respectivamente, e não mostrou grandes diferenças em termos de número de células alcançado no dia da colheita do processo e o consumo de metabólito foi comparável em ambos os casos durante todo o processo. Esta observação sugere que o processo otimizado Gen de 3.0 pode ter flexibilidade nos dias de processamento, facilitando assim a flexibilidade no cronograma de fabricação.

[001868] O processo Gen 3.1 com a adição de alimentadora e OKT-3 no dia 0 mostrou uma maior diversidade clonal medida por análise de sequência de CDR3 TCRab em comparação com Gen 3.0.

[001869] A Figura 92 descreve uma incorporação do processo Gen 3 (processo Gen 3 Otimizado). O meio padrão e o meio sem soro CTS Optimizer podem ser usados para a expansão de TIL de processo otimizado de Gen 3. No caso de CTS Optimizer, o meio sem soro é recomendado para aumentar o glutamax no meio para a concentração final de 4 mM.

PRATICABILIDADE E COMPARABILIDADE:

PRATICABILIDADE:

[001870] A praticabilidade foi estabelecida para todas as condições de estudo em todos os experimentos. Em todos os experimentos e condições e entre o tecido tumoral do doador, todos os experimentos foram realizados utilizando os mesmos lotes de matéria-prima crítica, como IL-2, Soro Humano-AB, células alimentadoras alogênicas, OKT-3.

COMPARABILIDADE:

[001871] A comparabilidade foi determinada pela capacidade de qualquer braço do estudo de atender aos critérios de liberação de nosso produto clínico de acordo com linfócitos infiltradores de tumor autólogo LFP-002 (TIL) criopreservados no dia 22, conforme descrito na Figura 93.

EXEMPLO 13: PROCESSOS DE EXPANSÃO DO TUMOR COM MEIO DEFINIDO.

[001872] Os processos divulgados nos Exemplos 5 a 12 são realizados com a substituição dos meios CM1 e CM2 por um meio definido de acordo com a presente invenção (por exemplo, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, ThermoFisher, incluindo, por exemplo, DM1 e DM2).

EXEMPLO 14: EXPANSÃO DE LINFÓCITOS INFILTRADORES DE TUMOR A PARTIR DE BIOPSIA DE NÚCLEO DE TECIDO DE UM SUJEITO COM CÂNCER PÂNCREÁTICO

[001873] Este exemplo descreve um estudo realizado para expandir TILS a partir de uma biópsia de tumor de câncer pancreático obtida de um paciente (P7055). O exemplo fornece uma modalidade exemplificativa para um método para expandir TILS a partir de amostras de biópsias de núcleo de tecido.

[001874] Uma biópsia do núcleo do tumor pancreático incluindo 3 fragmentos de tumor foi obtida e processada de acordo com o método de processamento de tumor semelhante a Gen 2 descrito abaixo. A Figura 111 retrata as etapas do processo de um protocolo do tipo Gen 2 exemplificativa.

DIA 0 - PROCESSAMENTO DE TUMOR

[001875] A biópsia do núcleo do tumor foi recebida e lavada como descrito neste documento no Dia 0 do método. O comprimento e a massa teórica do núcleo do tecido foram medidos com uma régua e registrados.

DIA 0 - SEMELHANTE A GEN 2 (PRÉ-REP)

[001876] Um G-Rex 100M foi rotulado com o “Tumor ID, Gen 2, iniciais, formulação de meio e data”. 0,5 l de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 que foi aquecido a 37 ºC (por pelo menos 24-30 h) foi adicionado ao G-Rex 100M. Uma placa de 6 poços foi usada e 5 ml de tampão de lavagem de tumor foram adicionados a três poços marcados "#1", "#2" e "#3". Resumidamente, todo o conteúdo da solução do recipiente da biópsia do núcleo foi transferido para uma placa de Petri (como 100 mm ou 150 mm).

[001877] A amostra foi lavada três vezes, transferindo o espécime da biópsia do núcleo para o poço 1 usando uma pipeta pasteur. A amostra foi incubada por 3 min. Em seguida, as amostras foram transferidas para o poço #2 por 3 min e, em seguida, transferidas para o poço #3 por 3 min.

[001878] Usando uma pipeta de transferência ou pinça, as amostras de biópsia foram adicionadas diretamente do poço #3 no G-Rex 100M rotulado contendo 0,5 l de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 preparado na etapa acima. O G-Rex 100M foi colocado em incubadora de 37 ºC/CO_2 a 5% até o Dia 11.

DIA 3 - SEMELHANTE A GEN 2 (COLHEITA/ATIVAÇÃO DE PRÉ-REP)

[001879] O dia 3 do processo semelhante a Gen 2 foi realizado como segue. As células alimentadoras (células alimentadoras de PBMC alogênicas) foram preparadas a partir de uma população agrupada de PBMC de 2 ou mais doadores diferentes. As células alimentadoras foram minimamente manipuladas e congeladas até serem necessárias. Frascos de 2 x 1 ml de alimentadoras (células alimentadoras alogênicas de PBMC) foram descongelados e pipetados em 48 ml de CM-1 + 6000 UI/ml de IL-2 que foi aquecido a 37 ºC.

[001880] As alimentadoras de PBMC foram bem misturadas usando

uma pipeta sorológica e alíquotas de 4 x 1 ml foram removidas. As alimentadoras descongeladas foram contadas sem diluição de acordo com procedimentos padrão conhecidos pelos especialistas na técnica. Em seguida, o volume necessário para 100e6 alimentadoras de PBMC foi calculado de acordo com a equação: 100e6/concentração média de células vivas = Volume necessário para 100e6 PBMC.

[001881] O frasco (ou frascos) G-Rex 100M contendo a cultura Pré-REP foram removidos da incubadora e colocados em um Gabinete de Segurança Biológica (BSC).

[001882] O volume calculado acima e 30 µl de estoque de OKT3 (30 ng/ml) foram adicionados a cada frasco G-Rex 100M contendo 500 ml de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2. Volume total de quantidade suficiente (QS) para 1 l: 500 ml - volume calculado de PPBMCs adicionadas a cada frasco = volume total de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 foi adicionado ao frasco.

DIA 11 - SEMELHANTE A GEN 2 (REP)

[001883] O dia 11 do processo semelhante Gen 2 foi executado da seguinte forma. Para a colheita Pré-REP TIL, foi usado um frasco de sistema aberto. O frasco G-Rex 100M contendo a cultura foi retirado da incubadora e alíquotas de 2 x 1 ml do sobrenadante foram retiradas para análise do metabólito e armazenadas a -80ºC. Um frasco estéril de 150 ml foi pesado e o peso foi registrado. Cerca de 900 ml de sobrenadante foram aspirados do frasco G-Rex 100M. Uma pipeta sorológica foi usada para transferir a cultura de TIL de Pré-REP para o frasco estéril pesado de 150 ml.

[001884] A cultura Pré-REP TIL foi bem misturada com pipeta sorológica e alíquotas de 4 x 1 ml foram colhidas para contagem de células. Quatro contagens de células foram realizadas sem diluição de acordo com os procedimentos padrão conhecidos dos versados na técnica. A cultura de TIL de Pré-REP foi colocada na incubadora enquanto as contagens eram realizadas.

[001885] As células que excedem a quantidade máxima (200e6 TILS) a serem semeadas na cultura REP foram removidas da cultura de TIL de Pré-REP usando uma seringa de 100 ml com uma pipeta Ashton. 200e6 TILs foram transferidos para uma bolsa EV-1000N através da porta NIS azul.

[001886] A bolsa EV-1000N contendo os TILs de Pré-REP foi esterilizada e soldada na linha RED do G-Rex 500MCS e os TILS foram drenados por gravidade para o frasco. Após a drenagem, a linha vermelha foi isolada termicamente.

[001887] 5e9 células alimentadoras de PBMC foram descongeladas como descrito acima. Depois de realizar 4 contagens de células, o volume da cultura de alimentadoras foi ajustado com base na contagem de células para adicionar 5e9 células alimentadoras à bolsa de alimentadoras EV1000N. Depois que as células alimentadoras foram adicionadas, 150 ul de OKT3 foram adicionados à bolsa de alimentadoras. A bolsa de alimentadoras foi soldada estéril à linha vermelha do G-Rex 500MCS e 5e9 células alimentadoras foram drenadas por gravidade para o G-Rex. 4,5 l de CM2 e 3000 UI/ml de IL-2 foram adicionados ao G-Rex 500MCS.

DIA 16 - SEMELHANTE À GEN 2 (DIVISÃO)

[001888] O dia 16 do processo semelhante a Gen 2 foi realizado de acordo com o método do dia 16 do Gen 2 (consultar, por exemplo, a Tabela 21 do Exemplo 5).

[001889] Primeiramente, alíquotas de 2 x 1ml do sobrenadante foram retiradas para análise do metabólito e armazenadas a -80ºC. Resumidamente, o volume foi reduzido e a cultura de células de REP foi dividida em até 5 G-REX 500MCS. Em cada G-REX 500MCS, o volume de cultura foi de 4,5 l de meio CM4 + IL-2 (3000 UI/ml) e $\geq 1 \times 10^9$ TVC/frasco.

DIA 22 - SEMELHANTE A GEN 2 (COLHEITA)

[001890] O dia 22 do processo tipo Gen 2 foi realizado de acordo com o método do dia 22 Gen 2 (consultar, por exemplo, a Tabela 21 do Exemplo 5).

[001891] As células do Dia 22 foram colhidas, processadas por meio do LOVO (2cy Colheita de TIL) e congeladas em criotubos de 30 x 1 ml (em 1:1 CS10/PLLA HSA a 1%) usando o Programa CRF # 1. Em alguns casos, apenas 1 frasco estava presente e quaisquer frascos filhos adicionais foram extrapolados para o rendimento hipotético.

[001892] 10e6 pós-LOVO células foram salvas para coloração de identidade antes do congelamento. Antes de descartar o resíduo do sobrenadante, alíquotas de 2 x 1 ml do sobrenadante foram removidas para análise do metabólito e armazenadas a -80ºC.

RESULTADOS

[001893] A contagem de TVC no dia 11 (ativação) rendeu 47,3e6 células. A contagem de TVC no Dia 22 (REP) Pós LOVO rendeu 10,4e9 células com 93% de viabilidade. Como tal, houve 8,4 duplicações de células do Dia 11 ao Dia 22 do processo semelhante a Gen 2.

EXEMPLO 15: PROCESSOS SEMELHANTE A GEN 2-LIKE E DE GEN 3 PARA EXPANSÃO DE LINFÓCITOS INFILTRADORES DE TUMOR A PARTIR DE BIOPSIAS DE NÚCLEO DE TECIDO

[001894] Este exemplo descreve um estudo comparando a expansão de TIL de amostras de biópsia de tumor de câncer de pâncreas usando um processo semelhante a Gen 2 e um processo Gen 3. O estudo utiliza uma biópsia do tumor de um paciente com câncer pancreático (P7057). Esta amostra de tumor inclui 3 núcleos e produtos de TIL são produzidos de acordo com o processo semelhante a Gen 2 aqui descrito. O estudo também utiliza uma biópsia de tumor de um paciente com câncer de pâncreas (P7058). Esta amostra de tumor inclui 8 núcleos e produtos de TIL são produzidos a partir de 4 núcleos de acordo com o processo semelhante a Gen 2 e 4 núcleos de acordo com o processo Gen 3 aqui descrito.

INTRODUÇÃO

[001895] As biópsias com agulha de núcleo são procedimentos

diagnósticos preliminares padrão usados para amostrar crescimentos de tecido aberrantes ao diagnosticar o câncer. O procedimento utiliza agulhas de grande calibre (18, 16, 14, etc.) por via percutânea para amostrar a área suspeita, que é posteriormente analisada e testada para determinar se o tecido é canceroso. Como a biópsia com agulha de núcleo não exige incisão ou cirurgia, é um meio muito menos invasivo de se obter amostras de tumor. É, portanto, desejável ver se as biópsias do núcleo poderiam ser usadas como uma alternativa ao tumor ressecado como material de partida nos processos de fabricação de TIL delineados.

ANTECEDENTES

[001896] Dois processos de fabricação (Gen 2 e Gen 3) foram desenvolvidos e estão em uso na fabricação clínica, para a expansão *ex vivo* de linfócitos infiltrantes de tumor autólogo (TIL) derivados de tumores recentemente ressecados. Os processos Gen 2 e Gen 3 utilizam os mesmos biorreatores (G-Rex100 MCS e G-Rex500 MCS). O processo Gen 2 inclui uma etapa de protocolo de expansão pré-rápida (pré-REP), e essa etapa foi substituída por uma etapa de ativação no processo Gen 3. A expansão rápida (REP) e aumento de escala da cultura de TIL em ambos os processos de expansão de cultura de células Gen 2 e Gen 3 são realizados na presença de interleucina-2 (IL-2), o anticorpo monoclonal OKT3 e células mononucleares de sangue periférico irradiadas (“Alimentadoras”), todos promovendo a expansão da TIL. O Gen 3 tem uma duração de processo mais curta do que o processo Gen 2. Os processos Gen 2 e Gen 3 foram usados como base de projeto para um processo de biópsias com agulha grossa de núcleo.

PROPÓSITO

[001897] O objetivo deste estudo é desenvolver um processo de fabricação de TIL usando espécime de biópsia como material de partida. O design deste processo de fabricação é baseado nos designs dos processos de fabricação clínica Gen 2 e Gen 3 descritos aqui.

ESCOPO

[001898] Os estudos em escala real são realizados usando o processo semelhante a Gen 2 e processos Gen 3 (consultar, por exemplo, os exemplos acima). Existem duas mudanças no processo tipo Gen 2 em comparação com o processo Gen 2, incluindo Pré-REP de 3 dias (vs 11 dias para Gen 2) e uma etapa de ativação no dia 3, adicionando alimentadoras e OKT-3 no dia 3.

[001899] As principais diferenças de design de processo entre Gen 2 e Gen 3 são as seguintes. A presença de um Protocolo de Expansão Pré-Rápida (Pré-REP) no processo semelhante a Gen 2 em que as células extravasam do tecido central ou biópsia ao longo de um período de incubação de 3 dias na presença de IL-2, mas na ausência de OKT-3 e células alimentadoras. A etapa correspondente no processo Gen 3 combina o extravasamento de TILs do tumor em combinação com sua ativação pela adição de OKT-3 e células alimentadoras no Dia 0.

[001900] O protocolo de expansão rápida no processo Gen 2 inclui ativação única usando a adição de OKT3, alimentadoras para os TILs de pré-REP por um período de 11 dias com a divisão no dia 16. A REP correspondente no processo Gen 3 também usa OKT3 e alimentadoras adicionadas no Dia 7/8 com o aumento de escala no Dia 11.

[001901] O processo Gen 2 usa G-Rex 100 MCS para Pré-REP e G-Rex 500 MCS para REP. O processo Gen 3 usa G-Rex 100 MCS para ativação e reativação e G-Rex 500 MCS para aumento de escala.

[001902] A duração do processo Gen 3 é de 16-17 dias contra 22 dias para o processo Gen 2 (por exemplo, Gen 3 é 5-6 dias mais curto do que Gen 2).

[001903] O processo Gen 3 usa meio definido (ou seja, nenhum soro AB humano), enquanto o processo Gen 2 usa meio completo contendo soro AB humano.

[001904] A Figura 111 fornece uma comparação dos processos do tipo

Gen 2 e Gen 3 aqui descritos.

PROCEDIMENTOS

[001905] Esta seção do exemplo descreve o processo semelhante a Gen 2 a ser utilizado para produzir o produto de TIL a partir de núcleos da amostra de biópsia por agulha de tumor pancreático P7057. O processo semelhante a Gen 2 e o processo Gen 3 descritos abaixo são usados para produzir o produto de TIL a partir de núcleos da amostra de biópsia de núcleo de tumor pancreático P7058.

[001906] Este estudo utiliza núcleos de tecido/amostras de tumor de biópsia provenientes de fornecedores comerciais, colaboradores ou parceiros. As células alimentadoras de PBMC alogênicas são reunidas de 2 ou mais doadores diferentes. As células alimentadoras são minimamente manipuladas e adicionadas diretamente à cultura de TIL na matriz de criopreservação que consiste em células mononucleares suspensas em CS10.

VISÃO GERAL DO PROCESSO SEMELHANTE A GEN 2

DIA 0 - SEMELHANTE À GEN 2 (PROCESSAMENTO DE TUMOR)

[001907] O processamento do tumor do método semelhante a Gen 2 é realizado como segue. As biópsias do núcleo do tumor são recebidas e lavadas 3 vezes. O comprimento e a massa teórica de cada núcleo de tecido são medidos com uma régua e são registrados.

DIA 0 - SEMELHANTE A GEN 2 (PRÉ-REP)

[001908] No Dia 0 do processo tipo Gen 2, a fase Pré-REP é iniciada da seguinte maneira. Rotular G-Rex 100M com “ID de Tumor, Gen 2, iniciais, formulação de meio e data”. Adicionar 0,5 l de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 que é aquecido a 37 ºC (por pelo menos 24-30 h) a um G-Rex 100M. Usar uma placa de 6 poços e adicionar 5 ml de tampão de lavagem de tumor a 3 poços rotulados 1, 2 e 3. Resumidamente, transfira todo o conteúdo da solução do recipiente da biópsia do núcleo para uma placa de Petri (100 mm ou 150 mm). Lavar a amostra 3 vezes transferindo-se a amostra da biópsia

para o poço 1 usando uma pipeta pasteur. Incubar por 3 min. Em seguida, transferir as amostras para o poço 2 por 3 min e, em seguida, transferir as amostras para o poço 3 por 3 min. Usar uma pipeta de transferência ou pinça, adicionar as amostras de biópsia diretamente do poço 3 no G-Rex 100M rotulado contendo 0,5 l de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 preparado na etapa acima. Colocar G-Rex 100M em incubadora a 37 ºC/CO_2 a 5% até o dia 11.

DIA 3 - SEMELHANTE A GEN 2 (COLHEITA/ATIVAÇÃO DE PRÉ-REP)

[001909] No Dia 3 do processo semelhante a Gen 2, a colheita/ativação de Pré-REP é realizada como segue. Descongelar 2 frascos de 1 ml de PBMC e pipetar em 48 ml de CM-1 + 6000 UI/ml de IL-2 aquecido a 37 ºC. Misturar bem por pipeta sorológica e remover alíquotas de 4 x 1 ml e contar as alimentadoras descongeladas de acordo com os métodos padrão sem diluição. Calcular o volume necessário para 100e6 PBMCs: (100e6/concentração média de células vivas = Volume necessário para 100e6 PBMC). Remover frasco (s) G-Rex 100M contendo cultura da incubadora e colocar em BSC. Adicionar o volume calculado acima e 30 µl de estoque OKT3 (30 ng/ml) a cada frasco contendo 500 ml de volume total de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 QS a 1 l: 500 ml - volume adicionado em 10.5.6. = volume total de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 foi adicionado ao frasco.

DIA 11 - SEMELHANTE A GEN 2 (REP)

[001910] No Dia 11 do processo semelhante a Gen 2, a fase REP é iniciada de acordo com o processo Gen 2 do dia 11, com exceção da colheita de TILs de Pré-REP e semeadura no G-Rex 500MCS. Para a colheita de TILs de Pré-REP, um frasco de sistema aberto é usado. Remover o frasco da incubadora e remover 2 x alíquotas de 1 ml do sobrenadante para análise do metabólito e armazenar a -80ºC. Pesar um frasco estéril de 150 ml e registrar o peso. Aspirar aproximadamente 900 ml de sobrenadante. Usar uma pipeta sorológica para transferir os TILs de Pré-REP para o frasco estéril pesado de 150 ml. Misturar bem com a pipeta sorológica e obter alíquotas de 4 x 1 ml

para contagem de células. Realizar 4 contagens de células sem diluição no NC-200 como métodos padrão. Manter TILs de Pré-REP na incubadora enquanto a contagem de células é realizada.

[001911] Se necessário, remova um volume apropriado do frasco para deixar 200e6 TILs (a quantidade máxima a ser semeada na REP) e usar uma seringa de 100 ml com uma pipeta Ashton para transferir os TILs restantes (200e6 TILs) para uma bolsa EV-1000N através da porta NIS azul. Soldar de modo estéril a bolsa EV-1000N contendo TILs de Pré-REP na linha RED do G-Rex 500MCS e drenar por gravidade os TILs no frasco. Após a drenagem, vedar a quente a linha vermelha.

[001912] Descongelar 5e9 alimentadoras de acordo com o método descrito acima. Depois de realizar 4 contagens de células, ajustar o volume, se necessário, para atingir 5e9 células na bolsa de alimentadoras EV1000N. Adicionar 150 ul de OKT3 à bolsa de alimentadoras. Soldar de modo estéril a bolsa de alimentadoras à linha vermelha do G-Rex 500MCS e drenar por gravidade as 5e9 alimentadoras para o G-Rex. Adicionar 4,5 l de CM2 + 3000 UI/ml de IL-2 ao G-Rex 500MCS.

DIA 16 - SEMELHANTE À GEN 2 (DIVISÃO)

[001913] No Dia 16 do processo semelhante a Gen 2, a etapa de divisão é realizada pela etapa do Dia 16 de Gen 2 (consultar a Tabela 21 do Exemplo 5). Alíquotas de 2 x 1 ml do sobrenadante foram removidas para análise do metabólito e armazenadas a -80ºC. O Dia 16 do processo semelhante a Gen 2 é realizado de acordo com o processo do dia 16 Gen 2, com exceção de como se segue. Se apenas 1 frasco for movido para a frente para o aumento/divisão, o número de frascos filhos é adicionado na colheita para extrapolar para a escala completa. Por exemplo, se 5 frascos são necessários, apenas 1 é movido para a frente e o produto final de TVC é multiplicado por 5 para extrapolar para o rendimento esperado em escala total.

DIA 22 - SEMELHANTE A GEN 2 (COLHEITA)

[001914] No Dia 22 do processo semelhante a Gen 2, a etapa de colheita é realizada pelo processo do dia 22 Gen 2 (consultar, por exemplo, a Tabela 21 do Exemplo 5). As células do Dia 22 para o tipo Gen 2 são colhidas, processadas através do sistema de processamento de células LOVO e congeladas em criotubos de 30 x 1 ml (em 1:1 CS10/PLLA HSA a 1%). Em alguns casos, apenas 1 frasco está presente e quaisquer frascos filhos adicionais são extrapolados para o rendimento hipotético. 10e6 pós-LOVO células são salvas para coloração de identidade antes do congelamento. Antes de descartar os resíduos do sobrenadante, alíquotas de 2 x 1 ml do sobrenadante são removidas para análise do metabólito e armazenadas a -80ºC.

VISÃO GERAL DO PROCESSO GEN 3

DIA 0 - GEN 3 (PROCESSAMENTO DE TUMOR)

[001915] O processamento do tumor do método Gen 3 é realizado conforme descrito neste documento. As biópsias do núcleo do tumor são recebidas e lavadas 3 vezes. O comprimento e a massa teórica de cada núcleo de tecido são medidos com uma régua e são registrados.

DIA 0 - GEN 3 (ATIVAÇÃO)

[001916] O Dia 0 de Gen 3 é realizado de acordo com o processo delineado (consultar, por exemplo, Exemplos 5-8). Colocar as amostras de biópsia restantes conforme mencionado acima em um frasco G-Rex 100M contendo 500 ml de DM + 6000 UI/ml de IL-2 aquecido a 37 ºC. Para cada frasco usado, descongelar 4 frascos de 1 ml de PBMC irradiadas em banho-maria a 37 ºC. Usar uma pipeta de transferência para transferir as PBMCs para um tubo cônico de 50 ml com 46 ml quente de DM + 6000 UI/ml de IL-2. Misturar bem por pipeta sorológica e remover alíquotas de 4 x 1 ml e contar a uma diluição de 1:10 em NC-200 de acordo com o protocolo aqui descrito. Calcular o volume necessário para 250e6 PBMCs: (250e6/concentração média = Volume necessário para 250e6 PBMCs).

Adicionar o volume calculado da etapa anterior a cada frasco contendo 500 ml de DM + 6000 UI/ml de IL-2 e fragmentos de tumor. Adicionar 15 ul de estoque OKT-3 (1 mg/ml) a cada frasco contendo 500 ml de DM + 6000 UI/ml de IL-2, fragmentos de tumor e alimentadoras de PBMC. Rotular cada frasco com “ID do tumor, Gen 3, número do frasco, iniciais, data”. Colocar na incubadora a 37 ºC/CO2 a 5% até o dia 8.

DIAS 7/8 - GEN 3 (REATIVAÇÃO)

[001917] Dias 7/8 do processo Gen 3 são realizados conforme descrito, por exemplo, nos Exemplos 5-9. Remover frasco (s) G-Rex 100M contendo cultura da incubadora e colocar em BSC. Remover alíquotas de 2 x 1 ml de sobrenadante para análise de metabólitos e armazenar a -80ºC. Adicionar 500 ml de DM + 6000 UI/ml de IL-2 que é aquecido a 37 ºC ao frasco G-Rex 100M. Adicionar 25 ml de DM + 6000 UI/ml de IL-2 aquecido a 37 ºC em um tubo cônico de 50 ml. Descongelar 1 saco de 25 ml de PBMCs em banho-maria a 37 ºC, perfurar o saco com um conjunto de extensão de plasma, retirar os 25 ml com uma seringa e dispensar no tubo cônico de 50 ml preparado. Realizar 4 contagens de células ou em uma contagem 1:10 (100 ul de PBMCs em 900 ul de AIM-V) ou uma contagem 1:100 (produzir 1:10 conforme descrito e, em seguida, transferir 100 ul para outros 900 ul de AIM-V) de alimentadoras descongeladas de acordo com os métodos padrão. Calcular o volume necessário para 500e6 PBMCs: (500e6/concentração média = Volume necessário para 500e6 PBMCs). Adicionar o volume calculado de PBMCs nas etapas acima ao G-Rex 100M contendo 1 l de DM + 6000 UI/ml de IL-2 e biópsias de núcleo. Adicionar 30 ul de estoque OKT3 (30 ng/ml) ao frasco. Colocar o frasco na incubadora a 37 ºC/CO2 a 5%.

DIAS 10/11 - GEN 3 (AUMENTO DE ESCALA)

[001918] O aumento de escala dos Dias 10/11 para o processo Gen 3 é realizado conforme descrito, por exemplo, nos Exemplos 5-10. O frasco (ou frascos) da incubadora são removidos e alíquotas de 2 x 1 ml do sobrenadante

são removidas para análise do metabólito e armazenadas a -80ºC. Vedar de modo estéril um conjunto de transferência de fluido na linha RED de um G-Rex 500MCS, rosquear o conjunto de transferência de fluido através da bomba Baxter e conectar assepticamente uma pipeta Ashton à outra extremidade dentro de um BSC. Transferir aproximadamente 700 ml de meio do G-Rex 100MCS para o G-Rex 500MCS, parar a bomba, girar para perturbar a camada de células e transferir a cultura de células restantes para o G-Rex 500MCS. Depois que todos os TIL forem transferidos, vedar de modo estéril a linha RED do G-Rex em um saco de 5 l ou 10 l de DM + 3 mil UI/ml de IL-2 que é aquecido a 37 ºC. A gravidade drena o meio até a marca de 5 l do G-Rex 500MCS. Após a drenagem estar completa, retornar o frasco à incubadora.

DIAS 16/17 - GEN 3 (COLHEITA)

[001919] Os dias 16/17 do processo Gen 3 foram realizados conforme descrito, por exemplo, nos Exemplos 5-1. As células do Dia 17 para Gen 3 são colhidas, processadas por meio do LOVO (5cy Colheita de TILs) e congeladas em criotubos de 30 x 1 ml (em uma razão de 1:1 de CS10: Plasmalyte com HSA a 1%) usando o programa CRF # 1. Em alguns casos, apenas 1 ou 2 frascos estão presentes para a colheita, dependendo do número de fragmentos semeados no dia 0. 10e6 pós-LOVO células são salvas para coloração de pureza antes do congelamento.

CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL E DO MATERIAL INICIAL:

[001920] Os materiais de partida e os produtos finais de TIL fabricados de acordo com os processos Gen 2 e Gen 3 podem ser avaliados. A identidade (% de CD45+/CD3+) é medida no produto de TIL fresco antes do congelamento usando protocolos padrão. Por exemplo, a função TIL em termos de produção de Interferon-gama e liberação de Granzyme B é medida. A estimulação de TIL é medida de acordo com a liberação de IFN-gama. A estimulação de TIL é medida de acordo com a liberação de Granzyme B por

meio de ELISA. O fenótipo CD107a, o fenótipo estendido, a coloração do antígeno de superfície de TIL usando um painel de diferenciação e/ou painel de ativação/exaustão podem ser avaliados. O sequenciamento de TCRvβ pode ser realizado. A atividade da telomerase e o comprimento do telômero podem ser realizados. Os metabólitos podem ser medidos no sobrenadante da cultura pelo bioanalisador CEDEX.

RESULTADOS ESPERADOS OU CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO

[001921] Os resultados esperados das células Pré-REP e do Produto Final do processo tipo Gen 2, bem como o Produto Final do processo Gen 3, são fornecidos nas Tabelas 30 e 31.

TABELA 30. TESTE PRÉ-REP E RESULTADOS ESPERADOS PARA O PROCESSO SEMELHANTE A GEN 2

Tipo de Teste	Métodos	Critérios de Aceitação
Contagem/Viabilidade Celular	Fluorescência	> 5 x 10e6 células viáveis

TABELA 31. TESTE DO PRODUTO FINAL E CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO (PROCESSOS SEMELHANTES A GEN 2 E GEN 3)

Tipo de Teste	Métodos	Critérios de Aceitação
Teste de liberação		
Viabilidade celular	Fluorescência	≥ 70%
Contagem de células viáveis totais	Fluorescência	1e9 a 150e9
Identidade (% de CD45+/CD3+)	Citometria de fluxo	Semelhante à geração 2: ≥ 90% de TILs CD45+ CD3+ para todas as indicações Gen 3: ≥ 90% de TILs CD45+ CD3+ para não ovarianos ≥ 85% de TILs de CD45+ CD3+ para ovário
Produção de interferon-gama (estimulado - não estimulado)	Estimulação e ELISA	≥ 500 pg/ml

[001922] Em algumas modalidades, o teste do produto final congelado é realizado nos produtos produzidos no método aqui descrito, como os métodos do tipo GEN 2 e Gen 3. Em algumas modalidades, o teste compreende a avaliação de um ou mais dos seguintes: marcadores de diferenciação, ativação e exaustão, granzima B, CD107A, sequenciamento de TCR vβ, comprimento do telômero, atividade da telomerase e metabólitos. Em alguns casos, a diferenciação é avaliada por citometria de fluxo, por exemplo, por citometria de fluxo de um painel TIL 1. Em alguns casos, os marcadores de ativação e exaustão são avaliados por citometria de fluxo, por exemplo, por citometria

de fluxo de um painel TIL 2. Em alguns casos, a granzima B é avaliada por estimulação de microesfera e ELISA. Em alguns casos, CD107A é avaliado por estimulação mitogênica e citometria de fluxo intracelular. Em alguns casos, o sequenciamento de TCR vβ é realizado por sequenciamento profundo. Em alguns casos, o comprimento do telômero é medido usando um ensaio TAT. Em alguns casos, a atividade da telomerase é determinada por Q-TRAP. Em alguns casos, o comprimento do telômero é medido usando um ensaio TAT. Em alguns casos, o metabólito é determinado usando um analisador de metabólito CEDEX.

[001923] Os exemplos apresentados acima são fornecidos para conceder àqueles de habilidade comum na técnica uma divulgação e descrição completa de como produzir e usar as modalidades das composições, sistemas e métodos da invenção, e não são destinados a limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. Modificações dos modos descritos acima para conduzir a invenção que são óbvios para as pessoas de habilidade na técnica são destinadas a estarem inseridas no escopo das seguintes reivindicações. Todos os documentos de Patente e publicações mencionadas no relatório descritivo são indicativos dos níveis de habilidade daqueles versados na técnica aos quais a invenção pertence.

[001924] Todos os títulos e designações de seção são usados para fins de clareza e referência apenas e não serão considerados limitativos de qualquer maneira. Por exemplo, aqueles versados na técnica apreciarão a utilidade de combinar vários aspectos de diferentes títulos e seções, conforme apropriado, de acordo com o espírito e escopo da invenção descritos no presente documento.

[001925] Todas as referências citadas no presente documento são incorporadas a título de referência no presente documento em suas totalidades e para todos os fins na mesma medida como se cada publicação ou patente ou pedido de patente individual estivesse de maneira específica e individual

indicado para ser incorporado por referência em sua totalidade para todos os fins.

[001926] Muitas modificações e variações deste pedido podem ser feitas sem afastamento de seu espírito e escopo, conforme será aparente àqueles versados na técnica. As modalidades e os exemplos específicos descritos no presente documento são oferecidos a título de exemplo apenas, e o pedido será limitado apenas pelos termos das reivindicações anexas, juntamente com o escopo completo de equivalentes aos quais as reivindicações têm direito.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de um tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor;

(b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira a expansão é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida suplementando-se o meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de APCs adicionado na etapa (b), em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 1 a 11 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 rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás;

(d) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (c); e

(e) transferir a população TIL colhida da etapa (d) para um

saco de infusão.

2. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de um tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor;

(b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente compreendendo células de apresentação de antígeno (APCs), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e APCs, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 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) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (c).

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) o meio de cultura de células compreende ainda células apresentadoras de antígeno (APCs), e em que o número de APCs no meio de cultura na etapa (c) é maior do que o número de APCs no meio de cultura na etapa (b).

4. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs caracterizado pelo fato de que

compreende:

(a) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se uma primeira população de TILs, sendo que a dita primeira população de TILs obtida processando-se uma amostra de tumor de um tumor ressecado de um sujeito em múltiplos fragmentos de tumor, em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada para o primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(b) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs na segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de APCs na etapa (a), em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 1 a 11 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 rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás; e

(c) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (b).

5. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se uma primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e opcionalmente

compreendendo células de apresentação de antígeno (APCs), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(b) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e APCs, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 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

(c) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (b).

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que na etapa (a) o meio de cultura de células compreende ainda células apresentadoras de antígeno (APCs), e em que o número de APCs no meio de cultura na etapa (c) é maior do que o número de APCs no meio de cultura na etapa (b).

7. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de 1,5:1 a cerca de 20:1.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de 1,5:1 a cerca de 10:1.

9. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de 2:1 a cerca de 5:1.

10. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de 2:1 a cerca de 3:1.

11. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de APCs na segunda expansão rápida e o número de APCs na primeira expansão de iniciação é de cerca de 2:1.

12. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de $1,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $4,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida está em uma faixa de cerca de $2,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $7,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

13. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de $1,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida está em uma faixa de cerca de $3,5 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $6,0 \times 10^6$ APCs/cm^2.

14. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de $2,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $3,0 \times 10^6$ APCs/cm^2, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida está em uma faixa de cerca de $4,0 \times 10^6$ APCs/cm^2 a cerca de $5,5 \times 10^6$ APCs/cm^2.

15. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de 1×10^8 APCs a cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida está em uma faixa de cerca de $3,5 \times 10^8$ APCs a cerca de 1×10^9 APCs.

16. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6,

caracterizado pelo fato de que o número de APCs na primeira expansão de iniciação está em uma faixa de cerca de $1,5 \times 10^8$ APCs a cerca de 3×10^8 APCs, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 4×10^8 APCs a cerca de $7,5 \times 10^8$ APCs.

17. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que o número de APCs na primeira expansão de iniciação está na faixa de cerca de 2×10^8 APCs a cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs, e em que o número de APCs na segunda expansão rápida está em uma faixa de cerca de $4,5 \times 10^8$ APCs a cerca de $5,5 \times 10^8$ APCs.

18. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 3 ou 6, caracterizado pelo fato de que cerca de $2,5 \times 10^8$ APCs são adicionadas à primeira expansão de iniciação e 5×10^8 APCs são adicionadas à segunda expansão rápida.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 1,5:1 a cerca de 100:1.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 50:1.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 25:1.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 20:1.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de TILs na segunda população de TILs e o número de TILs na primeira população de TILs é de cerca de 10:1.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, sendo que o método é caracterizado pelo fato de que compreende realizar, após a etapa de colheita da população terapêutica de TILs, a etapa adicional de:

transferir a população terapêutica colhida de TILs para uma bolsa de infusão.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 25, caracterizado pelo fato de que os múltiplos fragmentos de tumor são distribuídos em uma pluralidade de recipientes separados, em cada um dos recipientes separados, a segunda população de TILs é obtida a partir da primeira população de TILs na etapa do primeiro expansão, e a terceira população de TILs é obtida a partir da segunda população de TILs na etapa da segunda expansão rápida, e em que a população terapêutica de TILs obtida da terceira população de TILs é colhida de cada um dentre a pluralidade de recipientes e combinada para produzir a população TIL colhida.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de recipientes separados compreende pelo menos dois recipientes separados.

28. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a vinte recipientes separados.

29. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado

pelo fato de que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a dez recipientes separados.

30. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de recipientes separados compreende de dois a cinco recipientes separados.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 30, caracterizado pelo fato de que cada um dos recipientes separados compreende uma primeira área de superfície permeável a gás.

32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 25, caracterizado pelo fato de que os múltiplos fragmentos de tumor são distribuídos em um único recipiente.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o único recipiente compreende uma primeira área de superfície permeável a gás.

34. Método de acordo com a reivindicação 31 ou 33, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células apresentadoras de antígeno (APCs) e as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de uma camada de células para cerca de três camadas de células.

35. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás a uma espessura média de cerca de 1,5 camada de células a cerca de 2,5 camadas de células.

36. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás com uma espessura média de cerca de 2 camadas de células.

37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 36, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura de cerca de 3 camadas de células a cerca de 5 camadas de células.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura de cerca de 3,5 camadas de células a cerca de 4,5 camadas de células.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura de cerca de 4 camadas de células.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 25, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação a primeira expansão de iniciação é realizada em um primeiro recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás e na etapa da segunda expansão rápida, a segunda expansão rápida é realizada em um segundo recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o segundo recipiente é maior do que o primeiro recipiente.

42. Método de acordo com a reivindicação 40 ou 41, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células apresentadoras de antígeno (APCs) e as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de uma camada de células a cerca de três camadas de células.

43. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás a uma espessura média de cerca de 1,5 camada de células a cerca de 2,5 camadas de células.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás com uma espessura média de cerca de 2 camadas de células.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 40 a 44, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 3 camadas de células a cerca de 5 camadas de células.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 3,5 camadas de células a cerca de 4,5 camadas de células.

47. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a segunda área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 4 camadas de células.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 39, caracterizado pelo fato de que para cada recipiente em que a primeira expansão de iniciação é realizada em uma primeira população de TILs, a segunda expansão rápida é realizada no mesmo recipiente na segunda população de TILs produzidos a partir de tal primeira população de TILs.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado

pelo fato de que cada recipiente compreende uma primeira área de superfície permeável a gás.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células apresentadoras de antígeno (APCs) e as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de uma camada de células a cerca de três camadas de células.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação, as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás a uma espessura média de cerca de 1,5 camada de células a cerca de 2,5 camadas de células.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 2 camadas de células.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 52, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 3 camadas de células a cerca de 5 camadas de células.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 3,5 camadas de células a cerca de 4,5 camadas de células.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida as APCs são colocadas

em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás em uma espessura média de cerca de 4 camadas de células.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 32, 40, 41 e 48, caracterizado pelo fato de que para cada recipiente em que a primeira expansão de iniciação é realizada em uma primeira população de TILs na etapa da primeira expansão de iniciação, o primeiro recipiente compreende uma primeira área de superfície, o meio de cultura de células compreende células apresentadoras de antígeno (APCs), e as APCs são colocadas em camadas sobre a primeira área de superfície permeável a gás e em que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs dispostas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,1 a cerca de 1:10.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,2 a cerca de 1:8.

58. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa de segunda expansão de ataque está na faixa de cerca de 1:1,3 a cerca de 1:7.

59. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,4 a cerca de 1:6.

60. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado

pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,5 a cerca de 1:5.

61. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,6 a cerca de 1:4.

62. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,7 a cerca de 1:3,5.

63. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,8 a cerca de 1:3.

64. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação e o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida está na faixa de cerca de 1:1,9 a cerca de 1:2,5.

65. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a razão do número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da primeira expansão de iniciação para o número médio de camadas de APCs em camadas na etapa da segunda expansão rápida é de cerca de 1:2.

66. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

anteriores, caracterizado pelo fato de que após 2 a 3 dias na etapa da segunda expansão rápida, o meio de cultura de células é suplementado com IL-2 adicional.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a criopreservação da população TIL colhida na etapa de colheita da população terapêutica de TILs usando um processo de criopreservação.

68. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 25, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de criopreservar a bolsa de infusão.

69. Método de acordo com a reivindicação 67 ou 68, caracterizado pelo fato de que o processo de criopreservação é realizado usando uma razão de 1:1 da população TIL colhida para o meio de criopreservação.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que na etapa da primeira expansão de iniciação, o meio de cultura de células compreende células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), e em que o número total de PBMCs adicionado ao meio de cultura de células na etapa da primeira expansão de iniciação é de cerca de $2{,}5 \times 10^8$.

73. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que na etapa da segunda expansão rápida, as células apresentadoras de antígeno (APCs) no meio de cultura de células são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), e em que o

número total de PBMCs adicionado ao meio de cultura de células na etapa da segunda expansão rápida é de cerca de 5×10^8.

74. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 66, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno são células apresentadoras de antígeno artificiais.

75. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a colheita na etapa de colheita da população terapêutica de TILs é realizada usando um sistema de processamento de células baseado em membrana.

76. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a colheita na etapa de colheita da população terapêutica de TILs é realizada usando um sistema de processamento de células LOVO.

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 60 fragmentos por recipiente na etapa da primeira expansão de iniciação, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm^3.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1.300 mm^3 a cerca de 1.500 mm^3.

79. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1.350 mm^3.

80. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células é fornecido em um recipiente selecionado do grupo que consiste em um recipiente G e um saco de células Xuri.

82. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a concentração de IL-2 é de cerca de 10.000 IU/ml a cerca de 5.000 IU/ml.

83. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a concentração de IL-2 é de cerca de 6.000 IU/ml.

84. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 25, caracterizado pelo fato de que a bolsa de infusão na etapa de transferência da população terapêutica colhida de TILs para uma bolsa de infusão é uma bolsa de infusão contendo HipoThermosol.

85. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizado pelo fato de que o meio de criopreservação compreende dimetilsulfóxido (DMSO).

86. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o meio de criopreservação compreende DMSO a 7% a 10%.

87. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o primeiro período na etapa da primeira expansão de iniciação e o segundo período na etapa da segunda expansão rápida são cada um individualmente realizados dentro de um período de 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

88. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que o primeiro período na etapa da primeira expansão de iniciação é realizado dentro de um período de 5 dias, 6 dias ou 7 dias.

89. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1

a 86, caracterizado pelo fato de que o segundo período na etapa da segunda expansão rápida é realizado dentro de um período de 7 dias, 8 dias ou 9 dias.

90. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que o primeiro período na etapa da primeira expansão de iniciação e o segundo período na etapa da segunda expansão rápida são cada um individualmente realizados dentro de um período de 7 dias.

91. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 14 dias a cerca de 16 dias.

92. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 15 dias a cerca de 16 dias.

93. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 14 dias.

94. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 15 dias.

95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs são realizadas dentro de um período de cerca de 16 dias.

96. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de

criopreservar a população terapêutica colhida de TILs usando um processo de criopreservação, em que as etapas da primeira expansão de iniciação através da colheita da população terapêutica de TILs e criopreservação são realizadas em 16 dias ou menos.

97. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 93, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs colhida na etapa de colheita da população terapêutica de TILs compreende TILs suficientes para uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs.

98. Método de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficiente para uma dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3\times10^{10}$ a cerca de $13,7\times10^{10}$.

99. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 98, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa da segunda expansão rápida proporciona maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade.

100. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 98, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa da segunda expansão rápida fornece pelo menos uma a cinco vezes ou mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 18 dias.

101. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 98, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da terceira população de TILs na etapa da segunda expansão rápida exibem expressão aumentada de CD8 e CD28 em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da segunda população de TILs na etapa da primeira expansão de iniciação.

102. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 101, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs da etapa de colheita da população terapêutica de TILs é infundida em um

paciente.

103. Método para tratar um sujeito com câncer, sendo que o método é caracterizado pelo fato de que compreende a administração de linfócitos infiltrantes de tumor expandido (TILs) que compreende:

(a) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de um tumor ressecado de um sujeito processando-se uma amostra de tumor obtida do sujeito em múltiplos fragmentos de tumor;

(b) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de células compreendendo IL-2, opcionalmente OKT-3 e, opcionalmente, células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira a expansão é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por cerca de 1 a 7/8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs;

(c) realizar uma segunda expansão rápida suplementando-se o meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs adicionado à segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de APCs adicionado na etapa (b), em que a segunda expansão rápida é realizada por cerca de 1 a 11 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 rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás;

(d) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (c);

(e) transferir a população TIL colhida da etapa (d) para um saco de infusão; e

(f) administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs

da etapa (e) ao sujeito.

104. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficiente para administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz na etapa (f) é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

105. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que as células de apresentação de antígeno (APCs) são PBMCs.

106. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 105, caracterizado pelo fato de que antes de administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz de células TIL na etapa (f), um regime de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao paciente.

107. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que o regime 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.

108. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 107, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de tratamento do paciente com um regime de IL-2 de alta dose começando no dia após a administração das células TIL ao paciente na etapa (f).

109. Método de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que o regime de IL-2 de alta dose compreende 600.000 ou 720.000 IU/kg administrado como uma infusão intravenosa em bolus de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

110. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 109, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa (b) proporciona maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade.

111. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

103 a 109, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa (c) fornece pelo menos uma a cinco vezes ou mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo mais longo de 16 dias.

112. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 109, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir 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).

113. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 112, caracterizado pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

114. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 112, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

115. Método de acordo com a reivindicação 114, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

116. Método de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que o câncer é melanoma.

117. Método de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que o câncer é HNSCC.

118. Método de acordo com a reivindicação 115, caracterizado

pelo fato de que o câncer é um câncer cervical.

119. Método de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que o câncer é NSCLC.

120. Método de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

121. Método de acordo com a reivindicação 115, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer gastrointestinal.

122. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 121, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer hipermutado.

123. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 121, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

124. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 123, caracterizado pelo fato de que o recipiente é um recipiente fechado.

125. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 124, caracterizado pelo fato de que o recipiente é um recipiente G.

126. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 125, caracterizado pelo fato de que o recipiente é um GREX-10.

127. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 125, caracterizado pelo fato de que o recipiente fechado compreende um GREX-100.

128. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 125, caracterizado pelo fato de que o recipiente fechado compreende um GREX-500.

129. População terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) caracterizada pelo fato de que é produzida pelo método de acordo com em qualquer uma das reivindicações anteriores.

130. População terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor

(TILs) preparada a partir de tecido tumoral de um paciente, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que proporciona maior eficácia, aumento da produção de interferon-gama e/ou aumento da policlonalidade.

131. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 129 ou 130, caracterizada pelo fato de que fornece uma produção aumentada de interferon-gama.

132. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 129 ou 130, caracterizada pelo fato de que fornece policlonalidade aumentada.

133. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 129 ou 130, caracterizada pelo fato de que fornece eficácia aumentada.

134. População terapêutica de TILs de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 133, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

135. População terapêutica de TILs de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 133, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

136. População terapêutica de TILs de acordo com qualquer uma das reivindicações 129-133, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo de mais de 16 dias.

137. População terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor

(TILs), sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer adição células apresentadoras de antígenos (APCs).

138. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 137, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas.

139. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 138, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem quaisquer APCs adicionadas.

140. População terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer adição OKT3.

141. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 140, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

142. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 140, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada

pelo fato de que é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem qualquer OKT3 adicionado.

143. População terapêutica de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos uma vez mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo em que a primeira expansão de TILs é realizada sem adição células apresentadoras de antígeno (APCs) e nenhum OKT3 adicionado.

144. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 143, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos duas vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem células de apresentação de antígeno (APCs) adicionadas e sem OKT3 adicionado.

145. População terapêutica de TILs de acordo com a reivindicação 143, sendo que a população terapêutica de TILs é caracterizada pelo fato de que é capaz de pelo menos três vezes mais produção de interferon-gama em comparação com TILs preparados por um processo no qual a primeira expansão de TILs é realizada sem células de apresentação de antígeno (APCs) adicionadas e sem OKT3 adicionado.

146. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) caracterizada pelo fato de que compreende a população terapêutica de TILs de acordo com qualquer uma das reivindicações 126 a 145, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

147. Saco de infusão estéril caracterizado pelo fato de que compreende a composição de TIL de acordo com a reivindicação 143.

148. Preparação criopreservada caracterizada pelo fato de que é da população terapêutica de TILs de acordo com qualquer uma das

reivindicações 129 a 142.

149. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) caracterizada pelo fato de que compreende a população terapêutica de TILs de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 145, e um meio de criopreservação.

150. Composição de TIL de acordo com a reivindicação 149, caracterizada pelo fato de que o meio de criopreservação contém DMSO.

151. Composição de TIL de acordo com a reivindicação 150, caracterizada pelo fato de que o meio de criopreservação contém DMSO a 7% a 10%.

152. Preparação criopreservada caracterizada pelo fato de que é da composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 151.

153. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso como medicamento.

154. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer.

155. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer de tumor sólido.

156. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer selecionado de melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, mama câncer, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)),

glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

157. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer selecionado do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, cânceres cervicais, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

158. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é melanoma.

159. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer em que o câncer é HNSCC.

160. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer em que é um câncer cervical.

161. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer, em que o câncer é NSCLC.

162. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer, em que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

163. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer, em que o câncer é câncer gastrointestinal.

164. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer, em que o câncer é um câncer hipermutado.

165. Composição de TIL de acordo com qualquer uma das

reivindicações 146 a 152, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer, em que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

166. Uso da composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 146 a 152, caracterizado pelo fato de que é em um método de tratamento de câncer em um sujeito que compreende a administração de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL ao sujeito.

167. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

168. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado por vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

169. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

170. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é melanoma.

171. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é HNSCC.

172. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer cervical.

173. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação

166, caracterizado pelo fato de que o câncer é NSCLC.

174. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

175. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer gastrointestinal.

176. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer hipermutado.

177. Uso da composição de TIL de acordo com a reivindicação 166, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

178. Composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 143 a 152, caracterizado pelo fato de que é para uso em um método de tratamento de câncer em um sujeito que compreende a administração de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de TIL ao sujeito.

179. Composição de TIL de acordo com a reivindicação 178, caracterizada pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

180. Composição de TIL de acordo com a reivindicação 178, caracterizada pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado por papiloma humano vírus, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

181. Composição de TIL de acordo com a reivindicação 178, caracterizada pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

182. Método de tratamento de câncer em um sujeito caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao sujeito de uma dosagem terapeuticamente eficaz da composição de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) de acordo com qualquer uma das reivindicações 143 a 152.

183. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

184. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de ovário, câncer cervical, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer de cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC)), glioblastoma (incluindo GBM), câncer gastrointestinal, câncer renal e carcinoma de células renais.

185. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, HNSCC, câncer cervical, NSCLC, glioblastoma (incluindo GBM) e câncer gastrointestinal.

186. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é melanoma.

187. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é HNSCC.

188. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer cervical.

189. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é NSCLC.

190. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é glioblastoma (incluindo GBM).

191. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado

pelo fato de que o câncer é câncer gastrointestinal.

192. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer hipermutado.

193. Método de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer hipermutado pediátrico.

194. Método de expansão de células T caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) realizar uma primeira expansão de iniciação de uma primeira população de células T obtida de um doador cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e para iniciar uma ativação da primeira população de células T;

(b) após a ativação da primeira população de células T iniciadas na etapa (a) começar a decair, realizar uma segunda expansão rápida da primeira população de células T cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e aumentar a ativação da primeira população de células T para obter uma segunda população de células T; e

(c) colher a segunda população de células T.

195. Método de acordo com a reivindicação 194, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de até 7 dias.

196. Método de acordo com a reivindicação 194 ou 195, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 11 dias.

197. Método de acordo com a reivindicação 196, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 9 dias.

198. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 194 a 197, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de 7 dias e a segunda expansão

rápida da etapa (b) é realizada durante um período de 9 dias.

199. Método de acordo com a reivindicação 194, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de até 8 dias.

200. Método de acordo com a reivindicação 194 ou 195, caracterizado pelo fato de que a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de até 8 dias.

201. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 194 a 197, caracterizado pelo fato de que a primeira expansão de iniciação da etapa (a) é realizada durante um período de 8 dias e a segunda expansão rápida da etapa (b) é realizada durante um período de 8 dias.

202. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 194 a 201, caracterizado pelo fato de que na etapa (a) a primeira população de células T é cultivada em um primeiro meio de cultura compreendendo OKT-3 e IL-2.

203. Método de acordo com a reivindicação 202, caracterizado pelo fato de que o primeiro meio de cultura compreende OKT-3, IL-2 e células apresentadoras de antígeno (APCs).

204. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 194 a 201, caracterizado pelo fato de 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).

205. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 194 a 201, caracterizado pelo fato de que na etapa (a) a primeira população de células T é cultivada em um primeiro meio de cultura em um recipiente que compreende uma primeira superfície permeável a gás, em que o primeiro meio de cultura compreende opcionalmente OKT-3, IL-2 e, opcionalmente, uma primeira população de células apresentadoras de antígeno (APCs), em que a primeira população de APCs é exógena ao doador da primeira

população de células T e a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás, 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 exógeno ao doador da primeira população de células T e a segunda população de APCs é colocada em camadas na primeira superfície permeável a gás, e em que a segunda população de APCs é maior do que a primeira população de APCs.

206. Método de acordo com a reivindicação 205, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número de APCs na segunda população de APCs e o número de APCs na primeira população de APCs é de cerca de 2:1.

207. Método de acordo com a reivindicação 205 ou 206, caracterizado pelo fato de que o número de APCs na primeira população de APCs é de cerca de $2,5 \times 10^8$ e o número de APCs na segunda população de APCs é de cerca de 5×10^8.

208. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 205 a 207, caracterizado pelo fato de que na etapa (a) a primeira população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás com uma espessura média de 2 camadas de APCs.

209. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 205 a 208, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a segunda população de APCs é colocada em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás com uma espessura média em uma faixa de 4 a 8 camadas de APCs.

210. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 205 a 209, caracterizado pelo fato de que a razão entre o número médio de camadas de APCs em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás na etapa (b) e o número médio de camadas de APCs em camadas sobre a primeira superfície permeável a gás na etapa (a) é 2:1.

211. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 205 a 210, caracterizado pelo fato de que as APCs são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

212. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 205 a 211, caracterizado pelo fato de que APCs compreendem PBMCs que são irradiadas e exógenas para o doador da primeira população de células T.

213. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 202 a 209, caracterizado pelo fato de que as células T são linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

214. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 202 a 209, caracterizado pelo fato de que as células T são linfócitos infiltrantes da medula (MILs).

215. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 202 a 209, caracterizado pelo fato de que as células T são linfócitos de sangue periférico (PBLs).

216. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células é um meio definido e/ou um meio sem soro.

217. Método de acordo com a reivindicação 216, caracterizado pelo fato de que o meio definido compreende transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) e albumina (opcionalmente recombinante).

218. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 217, caracterizado pelo fato de que o meio sem soro ou definido compreende um meio de cultura de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro.

219. Método de acordo com a reivindicação 218, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células basais é selecionado a partir do grupo que consiste no meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal

Medium, no meio CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, no meio CTS™ AIM-V Medium, no meio CTS™ AIM-V SFM, no meio LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, no meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), no meio Minimal Essential Medium (MEM), no meio Basal Medium Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, no meio Minimal Essential Medium (αMEM), no meio Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM), no meio de crescimento RPMI e no meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium.

220. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 219, caracterizado pelo fato de que o suplemento de soro ou substituição de soro é selecionado a partir do grupo que consiste em CTS™ OpTmizer T-Cell Expansion Serum Supplement e CTS™ Immune Cell Serum Replacement.

221. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 220, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina.

222. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 221, caracterizado pelo fato de que o meio de cultivo celular compreende um ou mais aminoácidos.

223. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 222, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina.

224. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 223, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina.

225. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 224, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células

compreende um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais oligoelementos.

226. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 225, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende albumina.

227. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 226, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções químicas de elemento-traço Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}.

228. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 227, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

229. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 228, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende uma concentração de substituição de soro total (% em volume) de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio de cultura de células.

230. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 229, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende uma concentração de substituição de soro total de cerca de 3%, cerca de 5% ou cerca de 10% do volume total do meio de cultura de células.

231. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 230, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células

compreende ainda glutamina (isto é, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM ou 4 mM a cerca de 5 mM.

232. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 231, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende ainda glutamina (isto é, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

233. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 232, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM ou cerca de 65 mM.

234. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 233, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

235. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 234, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende os meios definidos descritos na Publicação Internacional PCT nº WO/1998/030679.

236. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 235, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende glicina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-histidina na faixa de cerca de 5 a 250 mg/l, L-isoleucina em na faixa de cerca de 5 a 300 mg/l, L-metionina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-fenilalanina na faixa de cerca de 5 a 400 mg/l, L-prolina na faixa de cerca de 1 a 1.000 mg/l, L-

hidroxiprolina na faixa de cerca de 1 a 45 mg/l, L-serina na faixa de cerca de 1 a 250 mg/l, L-treonina na faixa de cerca de 10 a 500 mg/l, L-triptofano na faixa de cerca de 2 a 110 mg/l, L-tirosina na faixa de cerca de 3 a 175 mg/l, L-valina na faixa de cerca de 5 a 500 mg/l, tiamina na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, glutationa reduzida na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, ácido L-ascórbico-2-fosfato na faixa de cerca de 1 a 200 mg/l, transferrina saturada de ferro na faixa de cerca de 1 a 50 mg/l, insulina na faixa de cerca de 1 a 100 mg/l, selenita de sódio na faixa de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e/ou albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) na faixa de cerca de 5.000 a 50.000 mg/l.

237. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 236, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende um ou mais dos ingredientes da porção química de elemento não-traço nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título "Faixa de concentração no meio 1X" na Tabela A fornecida neste documento.

238. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 237, caracterizado pelo fato de que a osmolaridade do meio de cultivo celular está entre cerca de 260 e 350 mOsmol.

239. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 238, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende ainda cerca de 3,7 g/l ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio.

240. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 239, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende ainda L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; concentração final de cerca de 100 μM), e/ou 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

241. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 240, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células no primeiro e/ou segundo recipiente permeável a gás carece de beta-

mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

242. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 240, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende CTS OpTmizer T-Cell Expansion SFM, CTS Immune Cell Soro Replacement a 3%, BME a 55 mM e, opcionalmente, glutamina.

243. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 240, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende o meio CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado com o suplemento CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26 ml/l) e CTS™ Immune Cell SR a 3% e Glutamax a 2 mM, opcionalmente compreendendo ainda 6.000 IU/ml de IL-2.

244. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 216 a 240, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de células compreende o meio CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado com o suplemento CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26 ml/l) e CTS™ Immune Cell SR a 3% e Glutamax a 2 mM, opcionalmente compreendendo ainda 3.000 IU/ml de IL-2.

245. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a amostra de tumor é uma ou mais pequenas biópsias, biópsias de núcleo ou biópsias de agulha do tumor no sujeito.

246. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de uma amostra de tumor obtida de uma ou mais pequenas biópsias, biópsias de núcleo ou biópsias de agulha de um tumor em um sujeito cultivando-se a amostra de tumor em um primeiro meio de cultura de células compreendendo

IL-2 por cerca de 3 dias;

(ii) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um segundo meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada em um recipiente que compreende uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão de iniciação é realizada por um primeiro período de cerca de 7 ou 8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(iii) realizar uma segunda expansão rápida suplementando-se o segundo meio de cultura de células da segunda população de TILs com IL-2, OKT-3 e APCs adicionais, para produzir uma terceira população de TILs, em que o número de APCs adicionado na segunda expansão rápida é pelo menos duas vezes o número de APCs adicionado na etapa (ii), em que a segunda expansão rápida é realizada por um segundo período de cerca de 11 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é um terapêutico população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada em um recipiente que compreende uma segunda área de superfície permeável a gás;

(iv) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (iii); e

(v) transferir a população TIL colhida da etapa (iv) para uma bolsa de infusão.

247. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em uma população terapêutica de TILs caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) obter e/ou receber uma primeira população de TILs de uma amostra de tumor obtida de uma ou mais pequenas biópsias, biópsias de

núcleo ou biópsias de agulha de um tumor em um sujeito cultivando-se a amostra de tumor em um primeiro meio de cultura de células compreendendo IL-2 por cerca de 3 dias;

(ii) realizar uma primeira expansão de iniciação cultivando-se a primeira população de TILs em um segundo meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e células de apresentação de antígeno (APCs) para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão de iniciação é realizada durante o primeiro período de cerca de 7 ou 8 dias para obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é maior em número do que a primeira população de TILs;

(iii) realizar uma segunda expansão rápida colocando-se a segunda população de TILs em contato com um terceiro meio de cultura de células compreendendo IL-2, OKT-3 e APCs, para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão rápida é realizada para um segundo período de cerca de 11 dias para obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs; e

(iv) colher a população terapêutica de TILs obtida na etapa (iii).

248. Método de acordo com a reivindicação 246 ou 247, caracterizado pelo fato de que após o dia 5 do segundo período, a cultura é dividida em 2 ou mais subculturas e cada subcultura é suplementada com uma quantidade adicional do terceiro meio de cultura e cultivada por cerca de 6 dias.

249. Método de acordo com a reivindicação 248, caracterizado pelo fato de que após o dia 5 do segundo período, a cultura é dividida em até 5 subculturas.

250. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 246 a 249, caracterizado pelo fato de que todas as etapas do método são concluídas em cerca de 22 dias.

251. Método de expansão de células T caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) realizar uma primeira expansão de iniciação de uma primeira população de células T a partir de uma amostra de tumor obtida de uma ou mais pequenas biópsias, biópsias de núcleo ou biópsias de agulha de um tumor em um doador cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e para iniciar uma ativação da primeira população de células T;

(ii) após a ativação da primeira população de células T iniciadas na etapa (a) começar a decair, realizar uma segunda expansão rápida da primeira população de células T cultivando-se a primeira população de células T para efetuar o crescimento e aumentar a ativação da primeira população de células T para obter uma segunda população de células T; e

(iv) colher a segunda população de células T.

252. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 245 a 251, caracterizado pelo fato de que a amostra de tumor é obtida a partir de uma pluralidade de biópsias de núcleo.

253. Método de acordo com a reivindicação 252, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de biópsias de núcleo é selecionada a partir do grupo que consiste em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 biópsias de núcleo.

254. Composição de linfócito infiltrante de tumor (TIL) ou composição de linfócito infiltrante de tumor expandido (TIL) caracterizada pelo fato de que compreende:

i) uma população de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), e

ii) meio definido ou meio sem soro opcionalmente compreendendo transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) e albumina (opcionalmente recombinante).

255. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com a reivindicação 245, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio

livre de soro compreende transferrina (opcionalmente recombinante), insulina (opcionalmente recombinante) e albumina (opcionalmente recombinante).

256. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 245 a 246, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio sem soro compreende um meio de células basais e um suplemento de soro e/ou uma substituição de soro.

257. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com a reivindicação 247, caracterizada pelo fato de que o meio de células basais inclui, porém sem limitação, o meio CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium, no meio CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, no meio CTS™ AIM-V Medium, no meio CTS™ AIM-V SFM, no meio LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, no meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), no meio Minimal Essential Medium (MEM), no meio Basal Medium Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, no meio Minimal Essential Medium (αMEM), no meio Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM), no meio de crescimento RPMI e no meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium.

258. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 256-257, caracterizada pelo fato de que o suplemento de soro ou substituição de soro é selecionado a partir do grupo que consiste em CTS™ OpTmizer T-Cell Expansion Serum Supplement e CTS™ Immune Cell Serum Replacement.

259. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 258, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina.

260. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 259, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende um ou mais aminoácidos.

261. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 260, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende uma ou mais vitaminas, uma ou mais transferrinas ou substitutos da transferrina.

262. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 261, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende um ou mais antioxidantes, uma ou mais insulinas ou substitutos da insulina.

263. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 262, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende um ou mais precursores de colágeno, um ou mais antibióticos e um ou mais elementos-traço.

264. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 263, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende albumina.

265. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 264, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende albumina e um ou mais ingredientes selecionados do grupo que consiste em glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, tiamina, glutationa reduzida, ácido L-ascórbico-2-fosfato, transferrina saturada de ferro, insulina e compostos contendo as porções químicas de elemento residual Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} e Zr^{4+}.

266. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 265, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda L-glutamina, bicarbonato de sódio e/ou 2-mercaptoetanol.

267. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 266, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio sem soro compreende uma concentração de substituição de soro total (% em volume) de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20% em volume do meio de cultura de células.

268. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 267, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende uma concentração de substituição de soro total de cerca de 3%, cerca de 5% ou cerca de 10% do volume total do meio de cultura de células.

269. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 268, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda glutamina (isto é, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, 0,5 mM a cerca de 9 mM, 1 mM a cerca de 8 mM, 2 mM a cerca de 7 mM, 3 mM a cerca de 6 mM ou 4 mM a cerca de 5 mM.

270. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 269, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda glutamina (isto é, GlutaMAX®) a uma concentração de cerca de 2 mM.

271. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 270, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 150 mM, 10 mM a cerca de 140 mM, 15 mM a cerca de 130 mM, 20 mM a cerca de 120 mM, 25 mM a cerca de 110 mM, 30 mM a cerca de 100 mM, 35 mM a cerca de 95 mM, 40 mM a cerca de 90 mM, 45 mM a cerca de 85 mM, 50 mM a cerca de 80 mM, 55 mM a cerca de 75 mM, 60 mM a cerca de 70 mM ou cerca de 65 mM.

272. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 271, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda 2-mercaptoetanol a uma concentração de cerca de 55 mM.

273. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 272, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende os meios definidos descritos na Publicação Internacional PCT nº WO/1998/030679.

274. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 273, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende glicina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-histidina na faixa de cerca de 5 a 250 mg/l, L-isoleucina em na faixa de cerca de 5 a 300 mg/l, L-metionina na faixa de cerca de 5 a 200 mg/l, L-fenilalanina na faixa de cerca de 5 a 400 mg/l, L-prolina na faixa de cerca de 1 a 1.000 mg/l, L-hidroxiprolina na faixa de cerca de 1 a 45 mg/l, L-serina na faixa de cerca de 1 a 250 mg/l, L-treonina na faixa de cerca de 10 a 500 mg/l, L-triptofano na faixa de cerca de 2 a 110 mg/l, L-tirosina na faixa de cerca de 3 a 175 mg/l, L-valina na faixa de cerca de 5 a 500 mg/l, tiamina na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, glutationa reduzida na faixa de cerca de 1 a 20 mg/l, ácido L-ascórbico-2-fosfato na faixa de cerca de 1 a 200 mg/l, transferrina saturada de ferro na faixa de cerca de 1 a 50 mg/l, insulina na faixa de cerca de 1 a 100 mg/l, selenita de sódio na faixa de cerca de 0,000001 a 0,0001 mg/l, e/ou albumina (por exemplo, AlbuMAX® I) na faixa de cerca de 5.000 a 50.000 mg/l.

275. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 274, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende um ou mais dos ingredientes da porção química de elemento não-traço nas faixas de concentração listadas na coluna sob o título “Faixa de concentração em 1X Médio” na Tabela A

fornecida no presente documento.

276. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 275, caracterizada pelo fato de que a osmolaridade do meio definido ou meio sem soro está entre cerca de 260 e 350 mOsmol.

277. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 276, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda cerca de 3,7 g/l ou cerca de 2,2 g/l de bicarbonato de sódio.

278. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 277, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro compreende ainda L-glutamina (concentração final de cerca de 2 mM), um ou mais antibióticos, aminoácidos não essenciais (NEAA; final concentração de cerca de 100 μM) e/ou 2-mercaptoetanol (concentração final de cerca de 100 μM).

279. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 278, caracterizada pelo fato de que o meio definido ou meio livre de soro no primeiro e/ou segundo recipiente permeável a gás carece de beta-mercaptoetanol (BME ou βME; também conhecido como 2-mercaptoetanol, CAS 60-24-2).

280. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 279, caracterizada pelo fato de que o meio de cultura de células compreende CTS OpTmizer T-Cell Expansion SFM, CTS Immune Cell Soro Replacement a 3%, BME a 55 mM e, opcionalmente, glutamina.

281. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 280, caracterizada pelo fato de que o meio de cultura de células compreende o meio CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado com o suplemento CTS™

OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26 ml/l) e CTS™ Immune Cell SR a 3% e Glutamax a 2 mM, opcionalmente compreendendo ainda 6.000 IU/ml de IL-2.

282. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 280, caracterizada pelo fato de que o meio de cultura de células compreende o meio CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium suplementado com o suplemento CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (26 ml/l) e CTS™ Immune Cell SR a 3% e Glutamax a 2 mM, opcionalmente compreendendo ainda 3.000 IU/ml de IL-2.

283. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 282, caracterizada pelo fato de que a população de TILs é uma população terapêutica de TILs.

284. Composição de TIL ou TIL expandido de acordo com qualquer uma das reivindicações 254 a 283, caracterizada pelo fato de que a população terapêutica de TILs exibe um aumento no IFN-γ sérico, em que o aumento no IFN-γ é maior que 200 pg/ml, maior que 250 pg/ml, maior que 300 pg/ml, maior que 350 pg/ml, maior que 400 pg/ml, maior que 450 pg/ml, maior que 500 pg/ml, maior que 550 pg/ml, maior que 600 pg/ml, maior que 650 pg/ml, maior que 700 pg/ml, maior que 750 pg/ml, maior que 800 pg/ml, maior que 850 pg/ml, maior que 900 pg/ml, maior que 950 pg/ml, ou superior a 1.000 pg/ml.

Processo 2A: cerca de 22 dias Etapas A – E	Processo GEN 3: cerca de 14 a 18 dias a partir das Etapas A - E
ETAPA A Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B; opcionalmente amostra tumoral pode ser um núcleo/biópsia pequena)	**ETAPA A** Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B))
ETAPA B Primeira Expansão (fragmentação física para pelo menos 40 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 3 dias a 14 dias com meio que compreende IL-2)	**ETAPA B:** Primeira Expansão de Iniciação (fragmentação física de até 60 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 1 dia a 7/8 dias com meio compreendendo IL-2, OKT-3, e opcionalmente células alimentadoras apresentadoras de antígeno)
ETAPA C Transição da Primeira Expansão para Segunda Expansão (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D, opcionalmente para Etapa B dia 11)	**ETAPA C:** Transição da Primeira Expansão de Iniciação para Segunda Expansão Rápida (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D no dia 7/8)
ETAPA D Segunda Expansão (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e células alimentadoras de apresentação de antígeo em recipiente fechado)	**ETAPA D** Segunda Expansão Rápida (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e 2X células alimentadoras apresentadoras de antígeno; Dias 10-11 aumentar escala e adicionar IL-2 adicional)
ETAPA E Coletar TILS da Etapa D (TILs colhidos por meio de sistema fechado)	**ETAPA E** Coleta TILS da Etapa D
ETAPA F Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)	**ETAPA F** Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)

FIG. 1A

Processo GEN 3: cerca de 14 a 18 dias a partir das Etapas A - E

ETAPA A
Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B)

ETAPA B
Primeira Expansão de Iniciação (fragmentação física de até 60 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 1 dia a 7/8 dias com meio compreendendo IL-2, OKT-3, e opcionalmente células alimentadoras apresentadoras de antígeno)

ETAPA C
Transição da Primeira Expansão de Iniciação para Segunda Expansão Rápida (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D no dia 7/8)

ETAPA D
Segunda Expansão Rápida (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e 2X células alimentadoras apresentadoras de antígeno; Dias 10-11 aumentar escala e adicionar IL-2 adicional)

ETAPA E
Coleta TILS da Etapa D

ETAPA F
Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)

FIG. 1B

Modalidade GEN 3.0: cerca de 14 a 18 dias a partir das Etapas A-E	Modalidade GEN 3.1 controle: cerca de 14-18 dias das etapas A - E	Modalidade GEN 3.1 Teste/F: cerca de 14-18 dias das etapas A - E
ETAPA A Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B)	**ETAPA A** Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B)	**ETAPA A** Obter Amostra de Tumor do Paciente (opcionalmente pode ser congelada antes da Etapa B)
ETAPA B: Primeira Expansão de Iniciação (fragmentação física de até 60 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 1 dias a 7/8 dias com meio que compreende IL-2)	**ETAPA B** Primeira Expansão de Iniciação (fragmentação física de até 60 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 1 dia a 7/8 dias com meio compreendendo IL-2 e OKT-3)	**ETAPA B:** Primeira Expansão de Iniciação (fragmentação física de até 60 fragmentos por recipiente cultivados por cerca de 1 dia a 7/8 dias com meio compreendendo IL-2, OKT-3 e células alimentadoras apresentadoras de antígeno)
ETAPA C: Transição da Primeira Expansão de Iniciação para Segunda Expansão Rápida (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D no dia 7/8)	**ETAPA C** Transição da Primeira Expansão de Iniciação para Segunda Expansão Rápida (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D no dia 7/8)	**ETAPA C:** Transição da Primeira Expansão de Iniciação para Segunda Expansão Rápida (Etapa B TILs se movem diretamente para Etapa D no dia 7/8)
ETAPA D Segunda Expansão Rápida (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e células alimentadoras apresentadoras de antígeno; Dias 10-11 aumentar escala e adicionar IL-2 adicional)	**ETAPA D** Segunda Expansão Rápida (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e 2X células alimentadoras apresentadoras de antígeno; Dias 10-11 aumentar escala e adicionar IL-2 adicional)	**ETAPA D** Segunda Expansão Rápida (TILs cultivados em meio de crescimento, meio compreendendo IL-2, OKT-3, e 2X células alimentadoras apresentadoras de antígeno; Dias 10-11 aumentar escala e adicionar IL-2 adicional)
ETAPA E Coleta TILS da Etapa D	**ETAPA E** Coleta TILS da Etapa D	**ETAPA E** Coleta TILS da Etapa D
ETAPA F Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)	**ETAPA F** Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)	**ETAPA F** Formulação Final e/ou Transferência para Bolsa de Infusão (opcionalmente criopreservar)

FIG. 1C

Processo similar a Gen-2 modificado: cerca de 22 dias a partir das Etapas A-E

ETAPA A
Obter Amostra de Tumor de Paciente (opcionalmente, pode ser congelada antes da Etapa B; opcionalmente, a amostra de tumor pode ser uma biópsia de núcleo/pequena)

ETAPA B1
Cultura inicial fragmentação física de até 60 fragmentos de tumor ou até 10 biópsias de núcleo/pequenas por recipiente, TILs cultivados por 3 dias em meio de crescimento de meio que compreende IL-2

ETAPA B2
Primeira expansão de iniciação TILs cultivados por 8 dias em meio de crescimento que compreende IL-2, OKT-3 e células alimentadoras que apresentam antígeno)

ETAPA C
Transição da primeira expansão de iniciação para a segunda expansão rápida (Step B TILs directly move to Step D on day 11)

ETAPA D
Segunda expansão rápida (volume reduzido; TILs cultivados em meio de meios de crescimento que compreende IL-2, OKT-3 e 50X células alimentadoras que apresentam antígeno)

ETAPA E
Colher TILs da ETAPA D

ETAPA F
Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão (opcionalmente criopreservação)

FIG. 1D

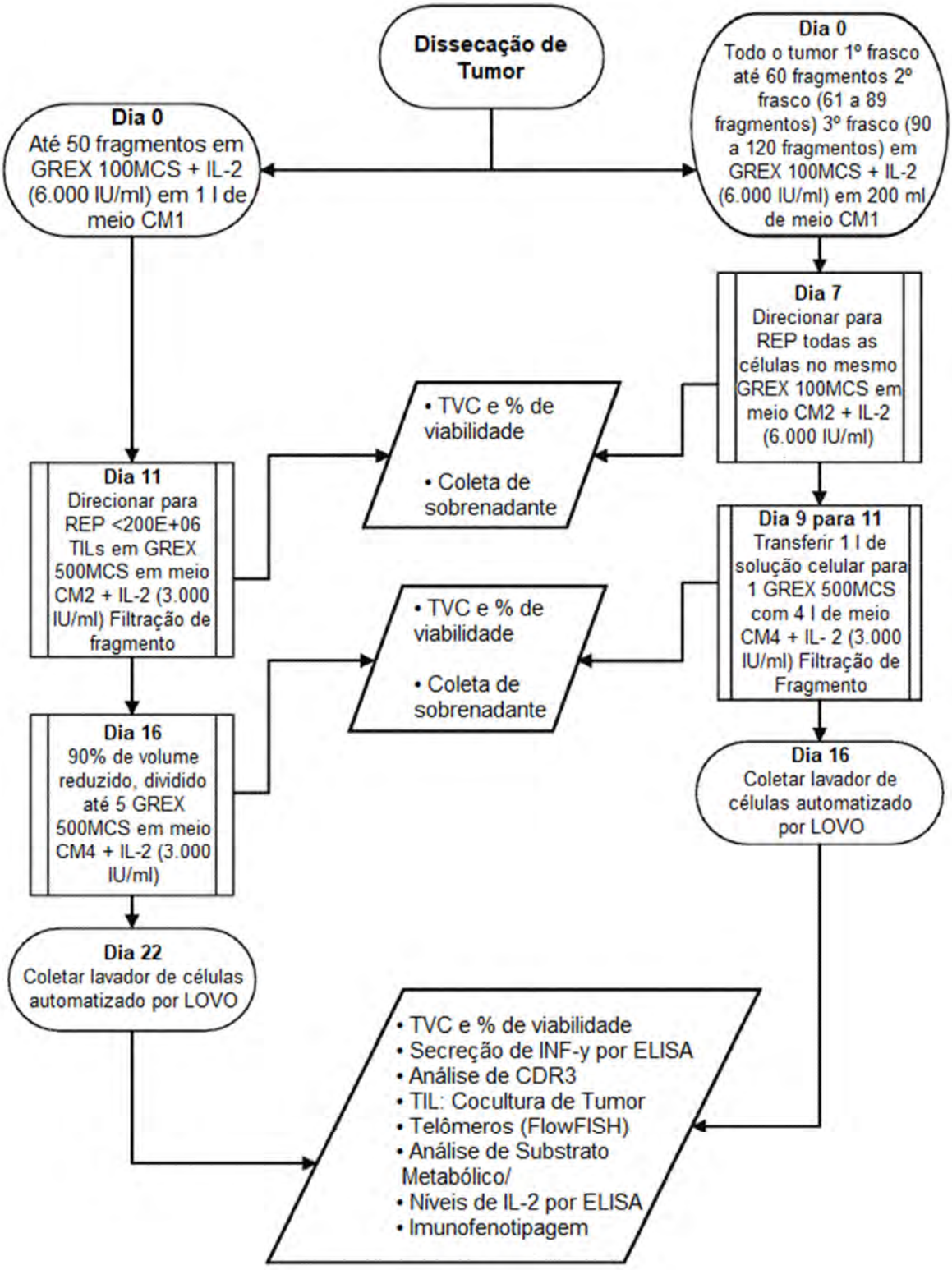
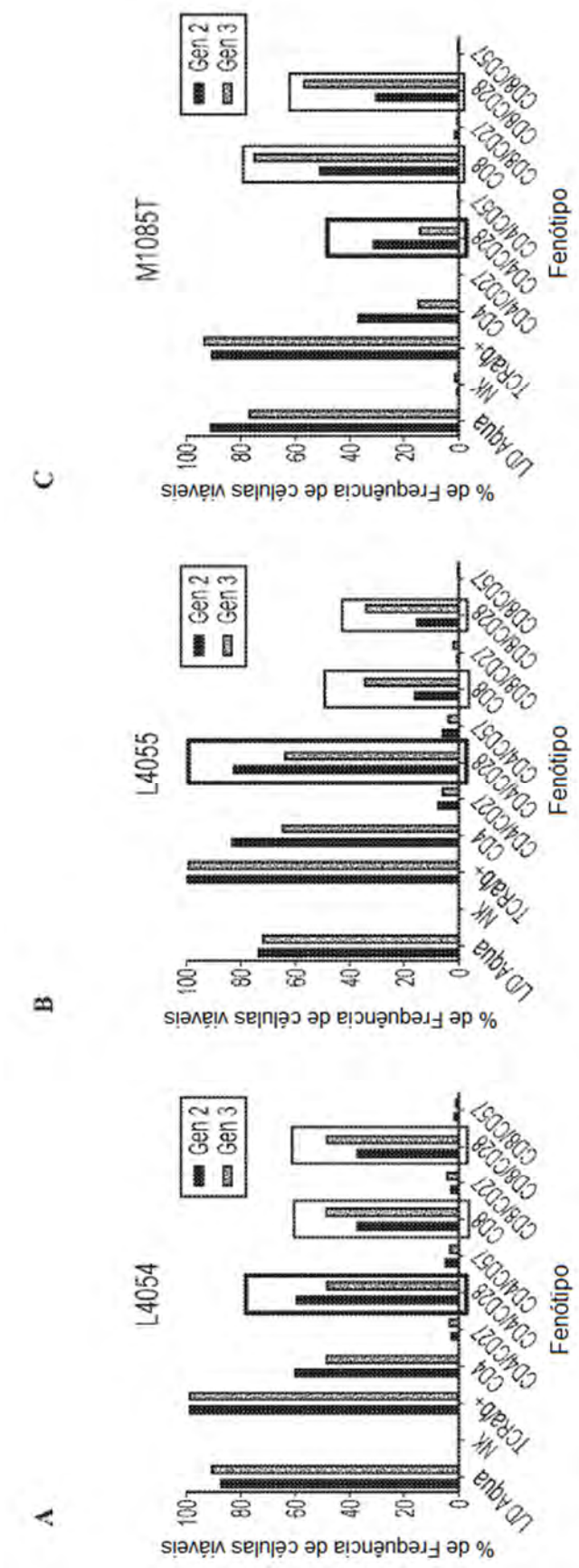
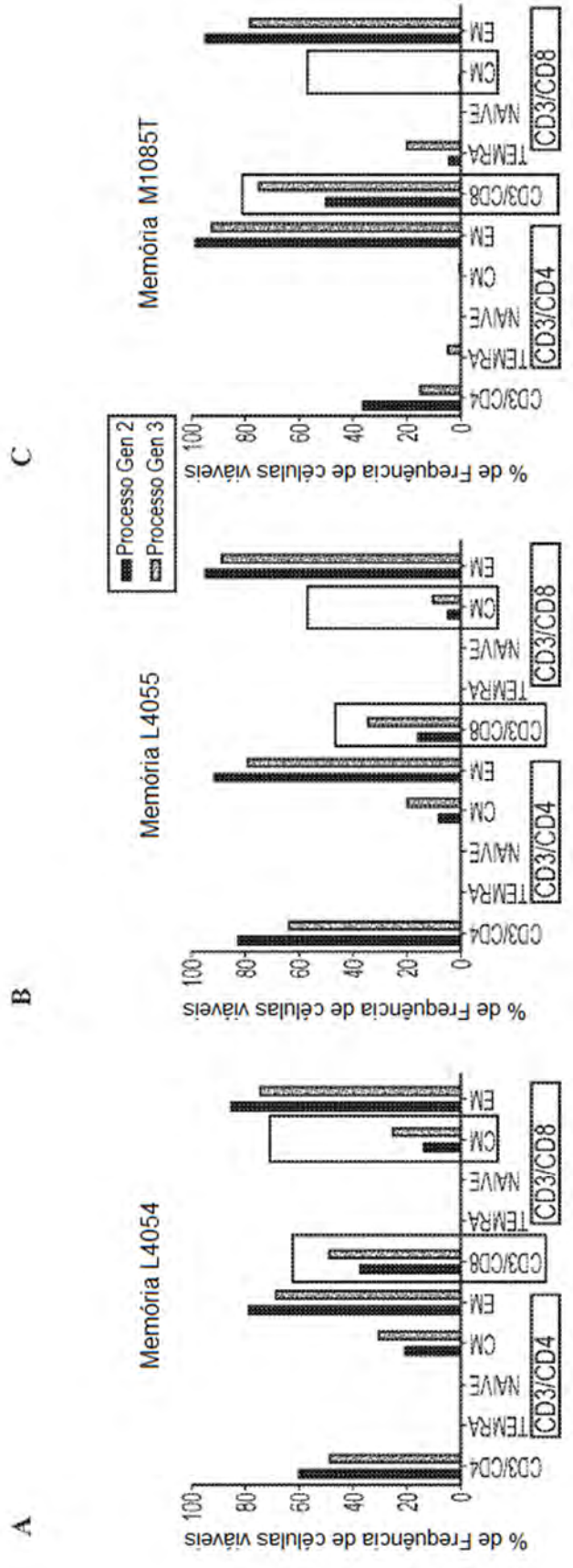

Dissecação de Tumor
Dia 0
Até 50 fragmentos em GREX 100MCS + IL-2 (6.000 IU/ml) em 1 l de meio CM1
Dia 0
Todo o tumor 1º frasco até 60 fragmentos 2º frasco (61 a 89 fragmentos) 3º frasco (90 a 120 fragmentos) em GREX 100MCS + IL-2 (6.000 IU/ml) em 200 ml de meio CM1
Dia 7
Direcionar para REP todas as células no mesmo GREX 100MCS em meio CM2 + IL-2 (6.000 IU/ml)
• TVC e % de viabilidade
• Coleta de sobrenadante
Dia 11
Direcionar para REP <200E+06 TILs em GREX 500MCS em meio CM2 + IL-2 (3.000 IU/ml) Filtração de fragmento
Dia 9 para 11
Transferir 1 l de solução celular para 1 GREX 500MCS com 4 l de meio CM4 + IL- 2 (3.000 IU/ml) Filtração de Fragmento
• TVC e % de viabilidade
• Coleta de sobrenadante
Dia 16
90% de volume reduzido, dividido até 5 GREX 500MCS em meio CM4 + IL-2 (3.000 IU/ml)
Dia 16
Coletar lavador de células automatizado por LOVO
Dia 22
Coletar lavador de células automatizado por LOVO
• TVC e % de viabilidade
• Secreção de INF-y por ELISA
• Análise de CDR3
• TIL: Cocultura de Tumor
• Telômeros (FlowFISH)
• Análise de Substrato Metabólico/
• Níveis de IL-2 por ELISA
• Imunofenotipagem

FIG. 2



ID de 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

FIG. 3



ID de 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

FIG. 4

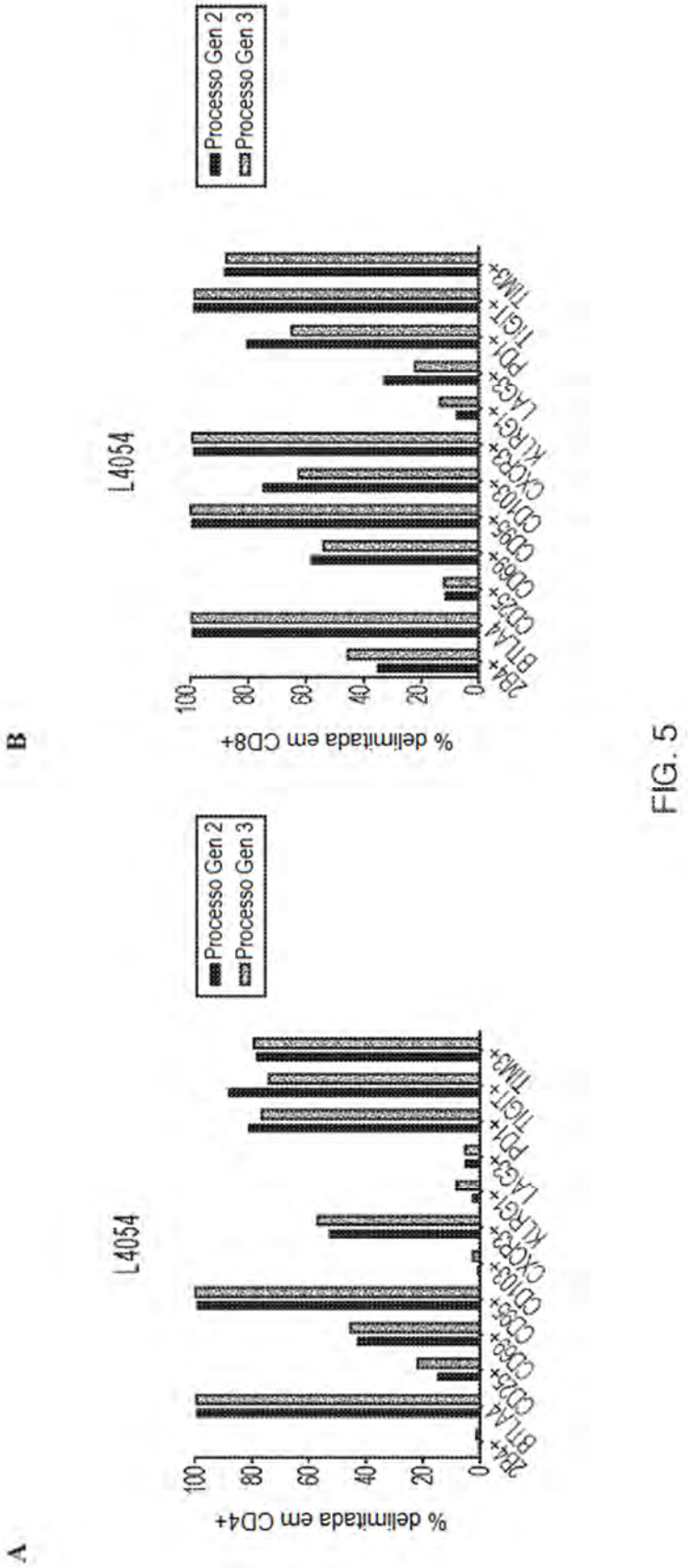

A
L4054
% delimitada em CD4+
100
80
60
40
20
0
Processo Gen 2
Processo Gen 3
2B4+
BTLA4+
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
B
L4054
% delimitada em CD8+
100
80
60
40
20
0
Processo Gen 2
Processo Gen 3
2B4+
BTLA4+
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

FIG. 5

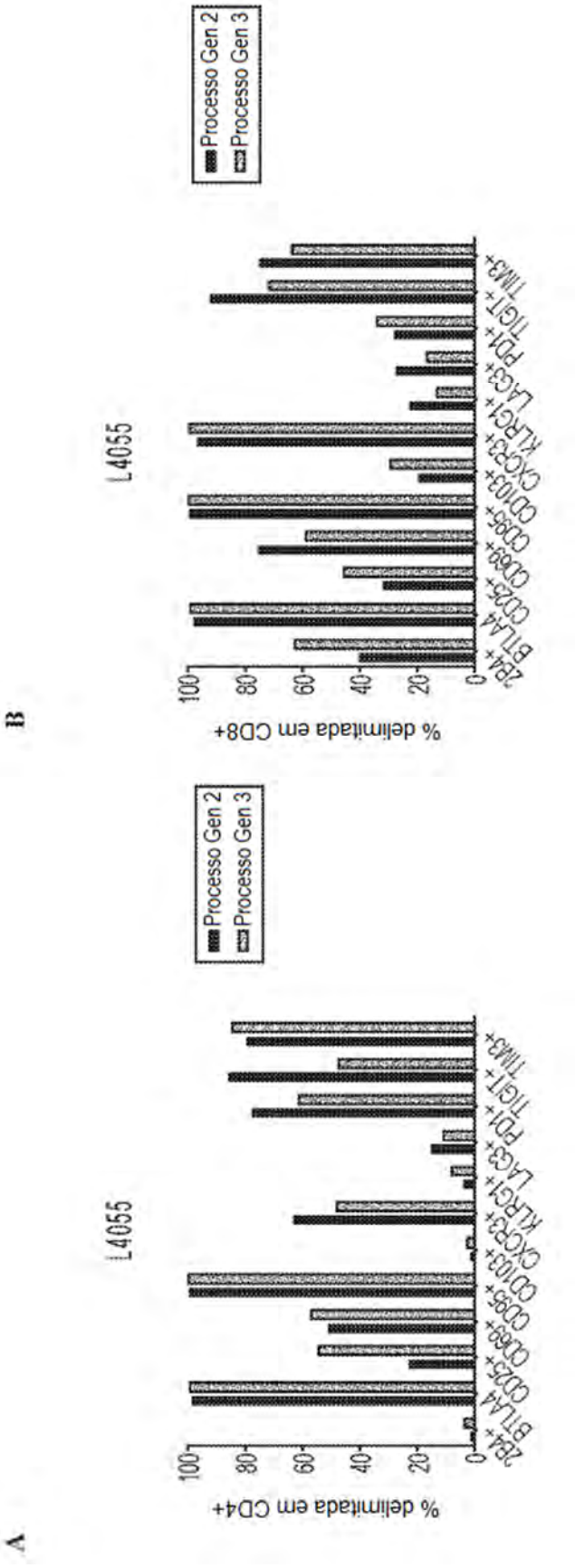

A
L4055
% delimitada em CD4+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4+
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Processo Gen 2
Processo Gen 3
B
L4055
% delimitada em CD8+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4+
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Processo Gen 2
Processo Gen 3

FIG. 6

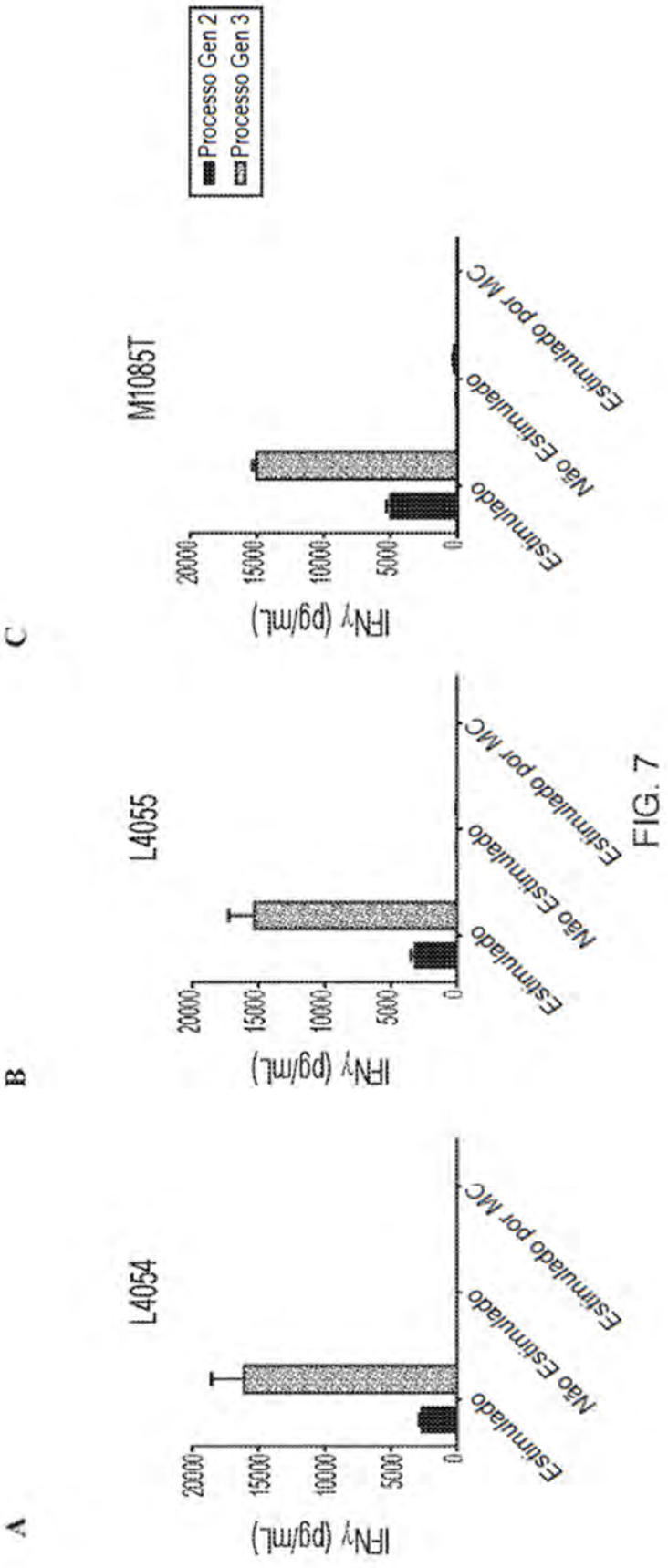

A
L4054
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Estimulado
Não Estimulado
Estimulado por MC
B
L4055
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Estimulado
Não Estimulado
Estimulado por MC
C
M1085T
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Estimulado
Não Estimulado
Estimulado por MC
Processo Gen 2
Processo Gen 3

FIG. 7

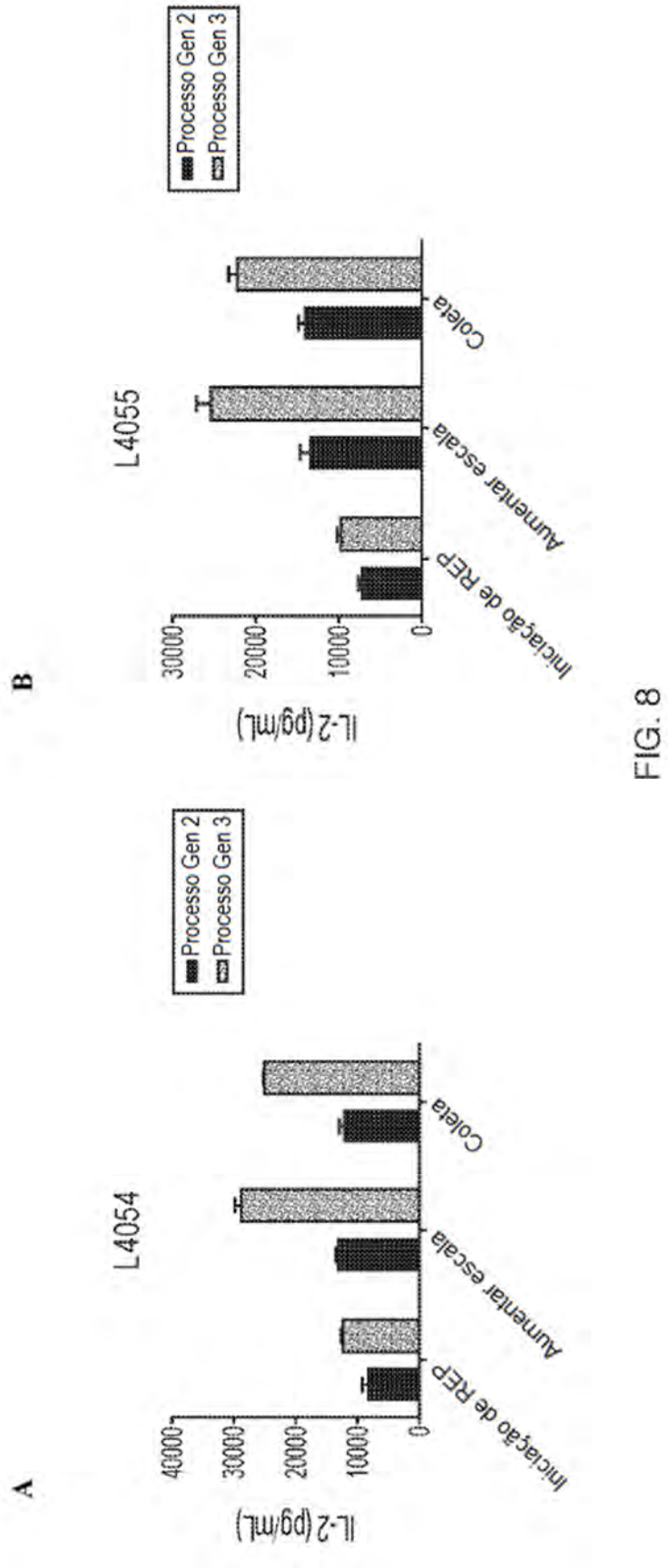

A
L4054
IL-2 (pg/mL)
40000
30000
20000
10000
0
Processo Gen 2
Processo Gen 3
Início de REP
Aumentar escala
Coleta
B
L4055
IL-2 (pg/mL)
30000
20000
10000
0
Processo Gen 2
Processo Gen 3
Início de REP
Aumentar escala
Coleta

FIG. 8

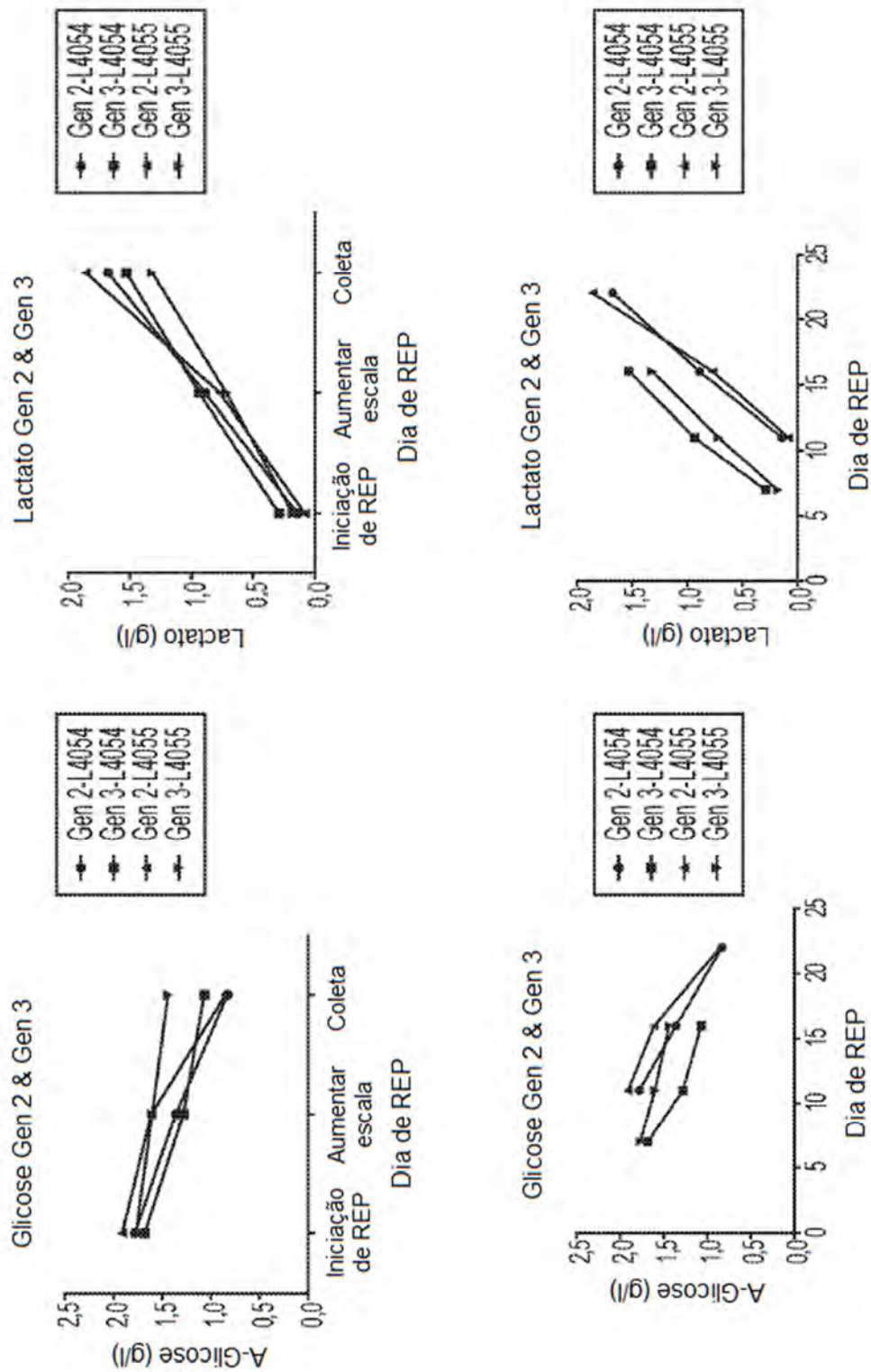

Glicose Gen 2 & Gen 3
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
A-Glicose (g/l)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Iniciação de REP
Aumentar escala
Coleta
Dia de REP
Lactato Gen 2 & Gen 3
Lactato (g/l)
Dia de REP
A
B

FIG. 9

A

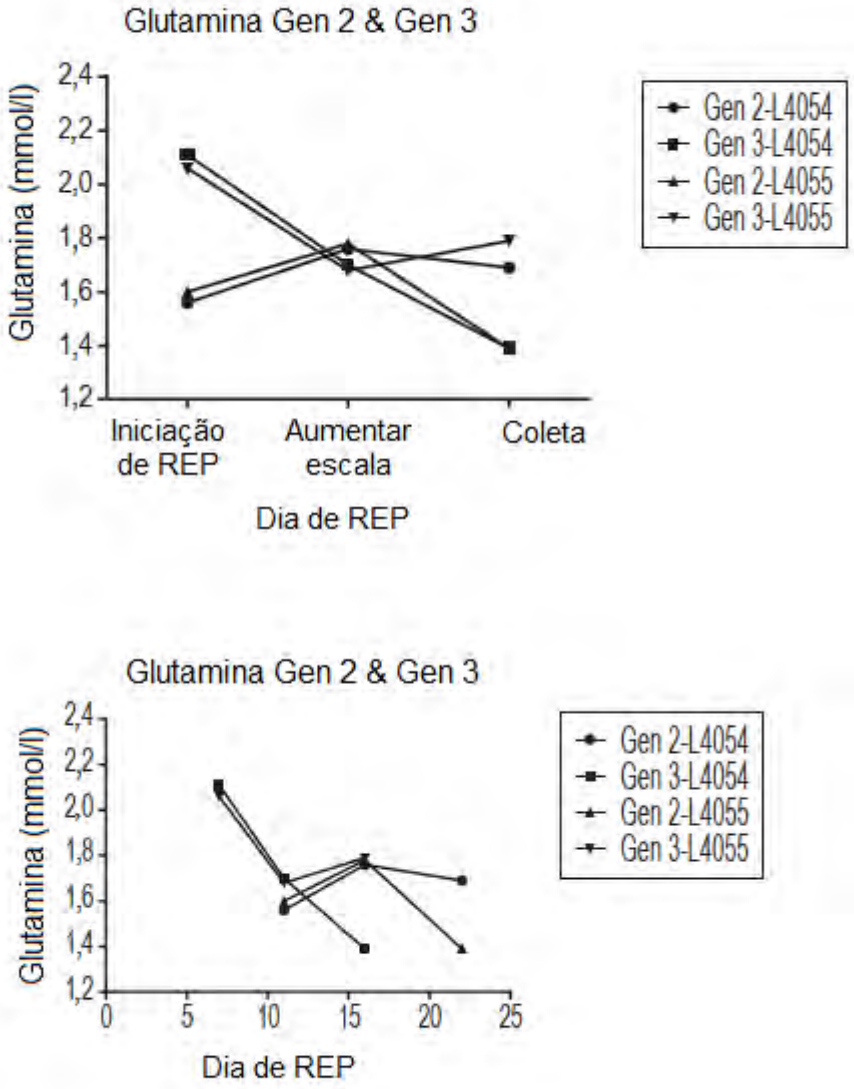
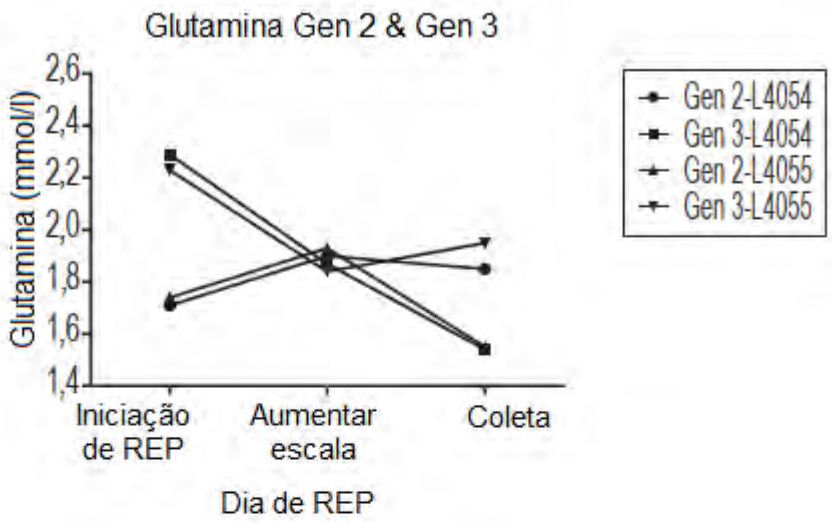

Glutamina Gen 2 & Gen 3
Glutamina (mmol/l)
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
Iniciação de REP
Aumentar escala
Coleta
Dia de REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
Glutamina Gen 2 & Gen 3
Glutamina (mmol/l)
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
0
5
10
15
20
25
Dia de REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

FIG. 10A

B


Glutamina Gen 2 & Gen 3
Glutamina (mmol/l)
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
Iniciação de REP
Aumentar escala
Coleta
Dia de REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

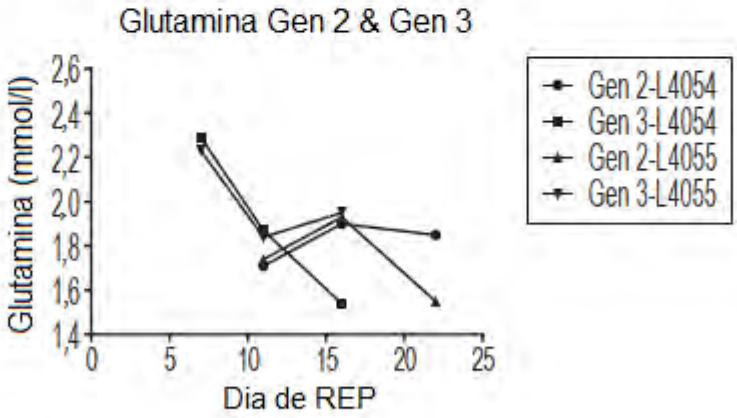
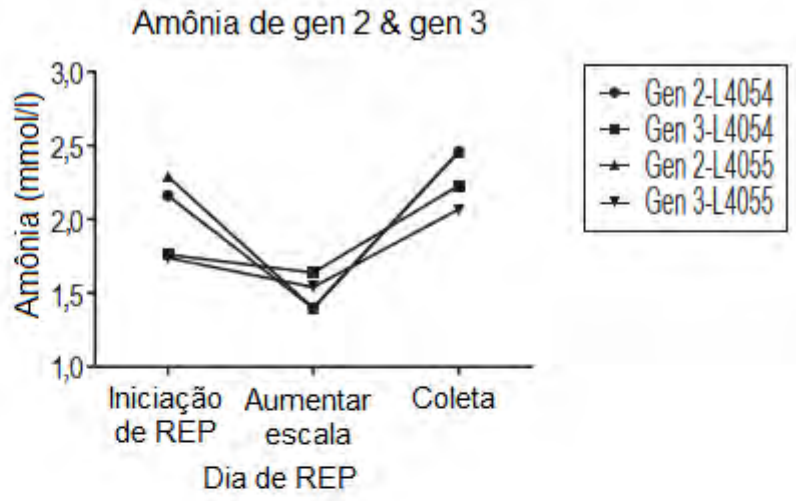

Glutamina Gen 2 & Gen 3
Glutamina (mmol/l)
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
0
5
10
15
20
25
Dia de REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

FIG. 10B

C


Amônia de gen 2 & gen 3
Amônia (mmol/l)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
Iniciação de REP
Aumentar escala
Coleta
Dia de REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

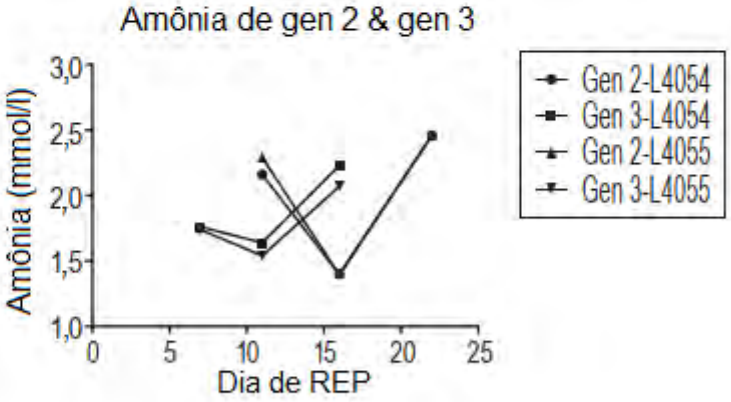

Amônia de gen 2 & gen 3
Amônia (mmol/l)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0
5
10
15
20
25
Dia de REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

FIG. 10C

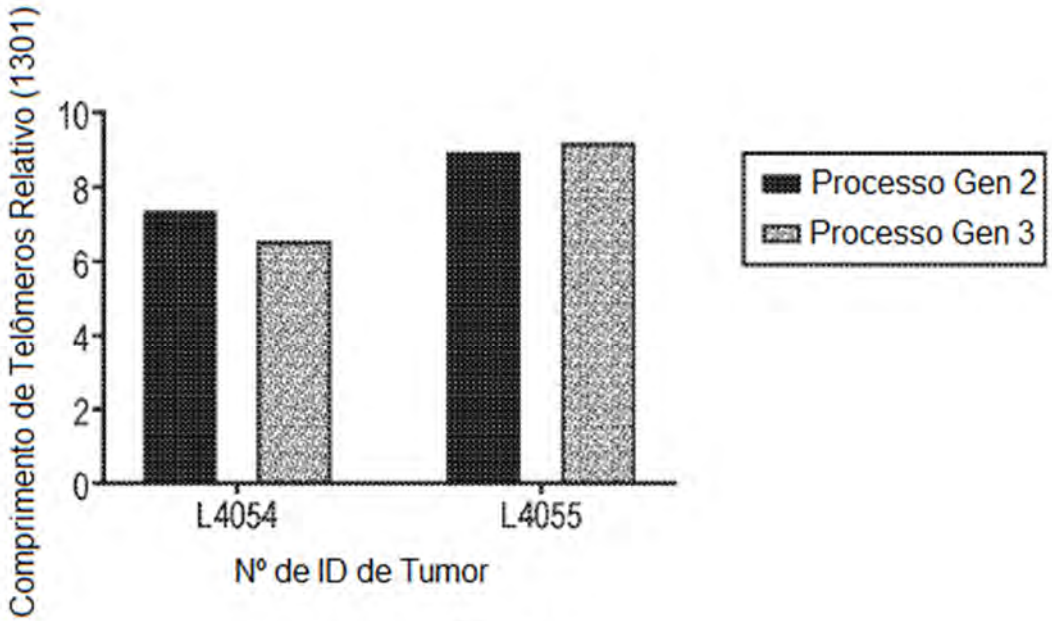

Comprimento de Telômeros Relativo (1301)
10
8
6
4
2
0
L4054
L4055
Nº de ID de Tumor
Processo Gen 2
Processo Gen 3

FIG. 11

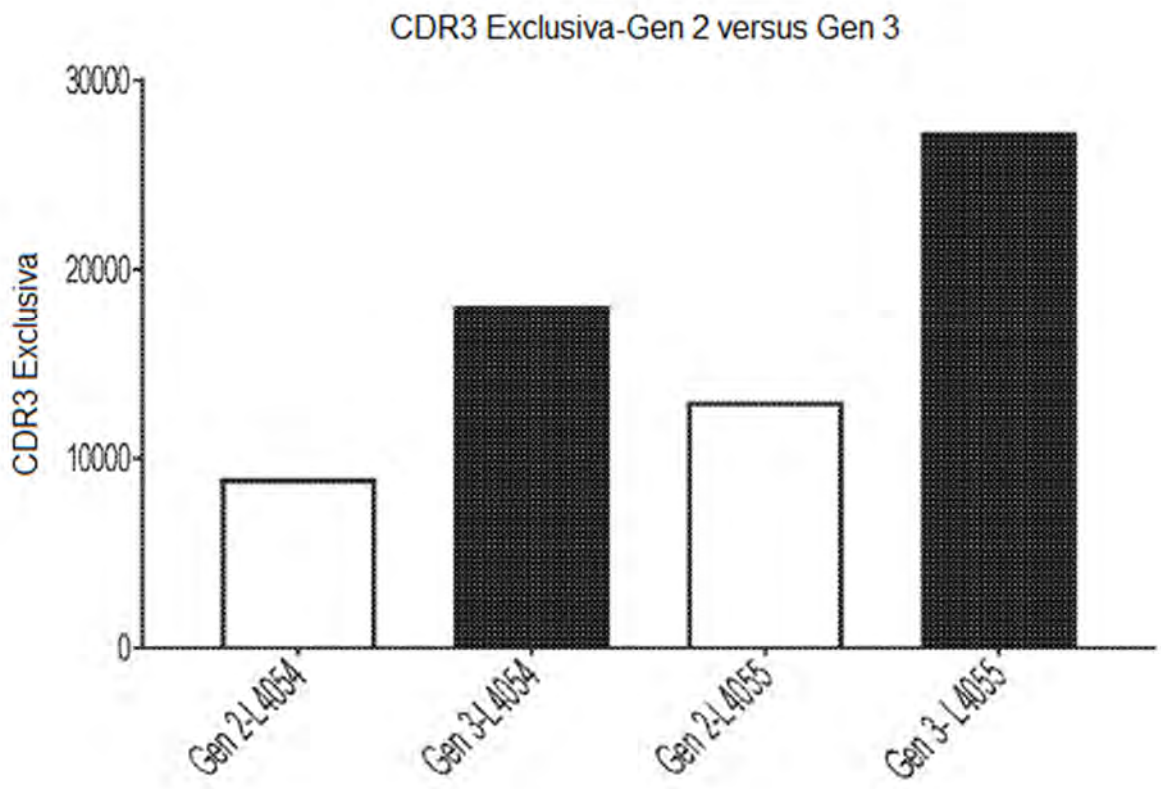
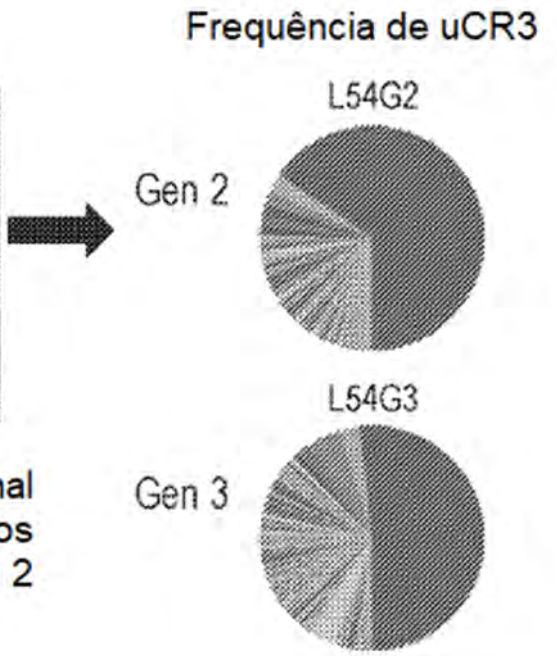

CDR3 Exclusiva-Gen 2 versus Gen 3
CDR3 Exclusiva
30000
20000
10000
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3- L4055

FIG. 12

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 636/745

nº de uCR3 (% de Sobreposição)	Todas as uCR3s		Primeiros 80% de uCR3s	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48,85%)	205	199 (97,07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

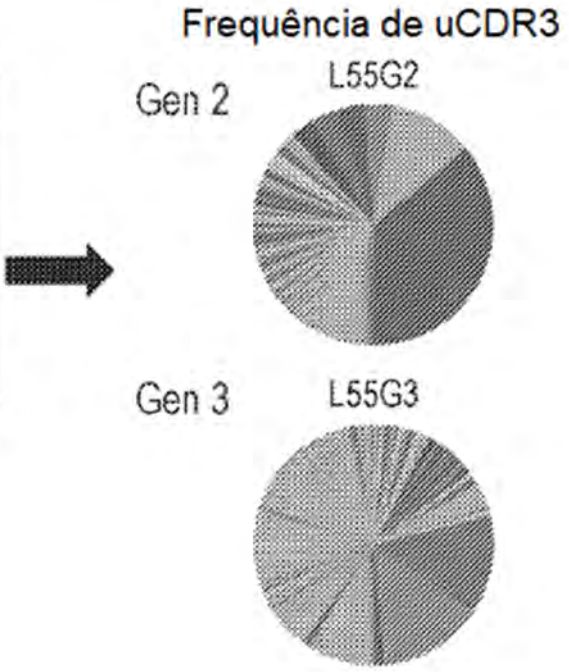


• 199 sequências são compartilhadas entre produto final Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 97,07% dos primeiros 80% de sequências de CDR3 exclusivas a partir de Gen 2 compartilhado com o produto final Gen3.

FIG. 13

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 637/745

nº de uCR3 (% de Sobre-posição)	Todas as uCR3s		Primeiros 80% de uCR3s	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50,77%)	1843	1833 (99,45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616



• 1883 sequências são compartilhadas entre produto final Gen 3 e Gen 2, correspondendo a 99,45% dos primeiros 80% de sequências de CDR3 exclusivas a partir de Gen 2 compartilhado com o produto final Gen3.

FIG. 14

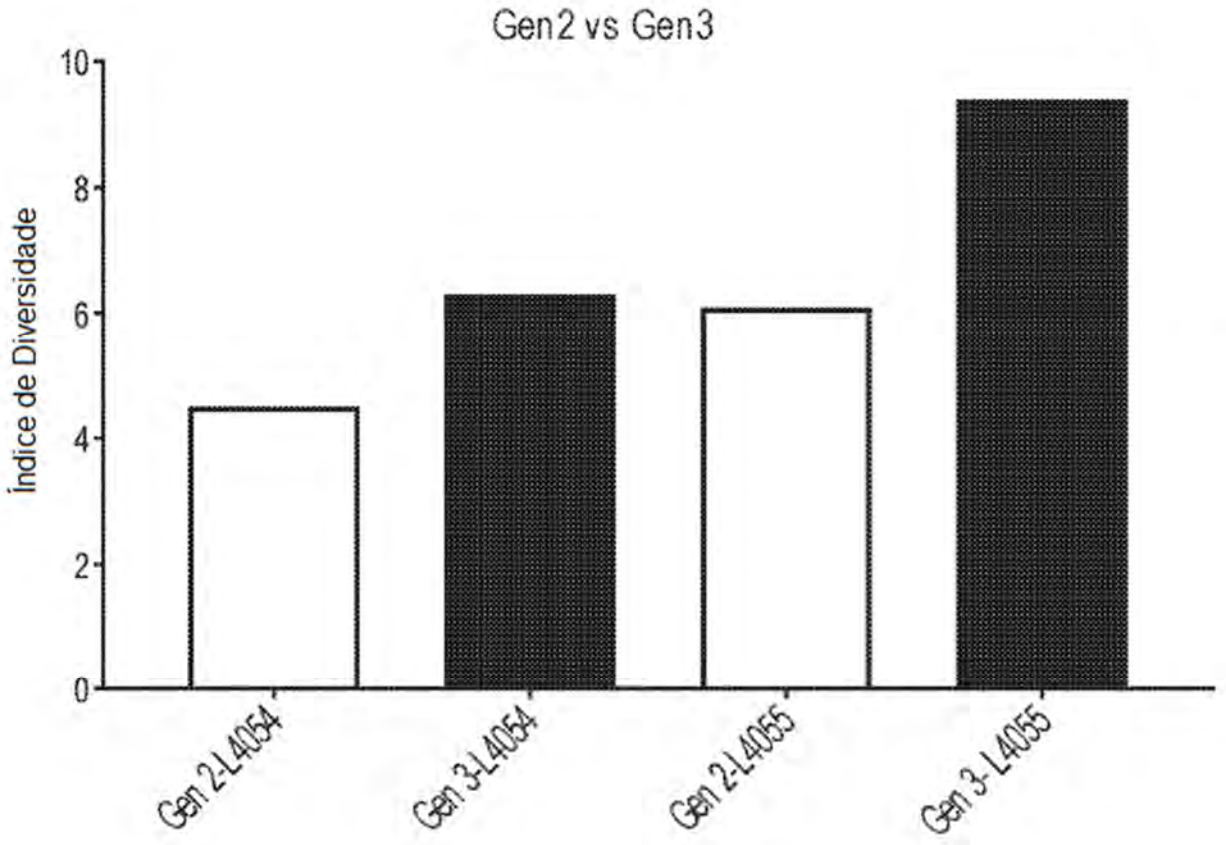

Gen2 vs Gen3
Índice de Diversidade
10
8
6
4
2
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3- L4055

FIG. 15

Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células/ml)	Média de Células Totais*Volume
188	Total	2,46E+05	2,28E+05	2,31E+05	2,35E+05	4,42E+07
	Vivos	2,37E+05	2,27E+05	2,26E+05	2,30E+05	4,32E+07
	Morte	9,26E+03	7,03E+02	4,63E+03	4,86E+03	9,14E+05
	% De 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
	Vivos	7,60E+04	7,54E+04	6,89E+04	7,34E+04	1,38E+07
	Morte	6,61E+03	4,63E+03	7,73E+03	6,32E+03	1,19E+06
	% De 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
	Vivos	1,74E+04	2,80E+04	7,03E+03	1,75E+04	3,50E+06
	Morte	7,03E+03	1,40E+04	3,48E+03	8,17E+03	1,63E+06
	% De Viabilidade	71,20%	66,70%	66,90%	68,27%	

FIG. 16

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Média (células/ml)	Média de Células Totais*Volume
Gen 3 nº L4054 Primeira Rodada	1000	Total	9,11E+05	1,01E+06	1,08E+06	1,00E+06	1,00E+09
		Vivos	8,60E+05	9,34E+05	1,01E+06	9,35E+05	9,35E+08
		Morte	5,09E+04	7,49E+04	6,74E+04	6,44E+04	6,44E+07
		% De 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
		Vivos	8,24E+05	8,67E+05	8,42E+05	8,44E+05	8,44E+08
		Morte	8,17E+04	3,70E+04	3,87E+04	3,58E+04	3,58E+07
		% De 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
		Vivos	1,68E+06	1,57E+06		1,63E+06	3,25E+08
		Morte	6,41E+05	6,79E+05		6,60E+05	1,32E+08
		% De 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
		Vivos	1,06E+06	9,71E+05	9,79E+05	1,00E+06	1,42E+08
		Morte	2,05E+04	1,26E+04	2,12E+04	1,81E+04	2,57E+06
		% De 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
		Vivos	2,88E+05	2,96E+05	2,55E+05	2,80E+05	2,68E+07
		Morte	4,72E+03	9,14E+03	8,26E+03	7,37E+03	7,08E+05
		% De 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
		Vivos	8,05E+04	4,21E+04		6,13E+04	1,23E+07
		Morte	1,04E+04	1,39E+04		1,22E+04	2,43E+06
		% De Viabilidade	88.50%	75,20%		81,85%	

FIG. 17

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células /ml)	Média de Células Totais*Volume
Gen 3 nº L4054 Primeira Rodada-pré-LOVO	1243,1	Total	1,40E+07	1,46E+07		1,43E+07	1,78E+10
		Vivos	1,32E+07	1,35E+07		1,34E+07	1,66E+10
		Morte	8,47E+05	1,12E+06		9,84E+05	1,22E+09
		% De 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
		Vivos	5,72E+07	5,44E+07		5,58E+07	1,84E+10
		Morte	6,35E+06	6,27E+06		6,31E+06	2,08E+09
		% De Viabilidade	90,00%	89,70%		89,85%	

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células /ml)	Média de Células Totais*Volume
Gen 3 nº L4055 Segunda Rodada-pré-LOVO	1032,6	Total	9,49E+06	1,05E+07		1,00E+07	1,03E+10
		Vivos	8,90E+06	9,79E+06		9,35E+06	9,65E+09
		Morte	5,85E+05	6,75E+05		6,30E+05	6,51E+08
		% De 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
		Vivos	2,85E+07	2,46E+07	2.77E+07	2,66E+07	8,67E+09
		Morte	4,56+06	3,61+06	4.12E+06	4,09E+06	1,35E+09
		% De Viabilidade	86,20%	87,20%	87.10%	86,70%	

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células /ml)	Média de Células Totais*Volume
Gen 3 nº M1085T	5000	Total	2,26E+06	2,64E+06		2,45E+06	1,23E+10
		Vivos	1,97E+06	2,31E+06		2,14E+06	1,07E+10
		Morte	2,85E+05	3,30E+05		3,08E+05	1,54E+09
		% De Viabilidade	87,40%	87,50%		87,45%	
Gen 3 n° M1085T pós LOVO, pré adição de CS10	150	Total	6,27E+07	5,44E+07		5,86E+07	8,78E+09
		Vivos	5,50E+07	4,74E+07		5,12E+07	7,68E+09
		Morte	7,70E+06	6,96E+06		7,33E+06	1,10E+09
		% De Viabilidade	87,70%	87,20%		87,45%	

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células /ml)	Média de Células Totais*Volume
Gen 2 nº L4054 Primeira Rodada	913	Total	3,53E+06	4,30E+06		3,92E+06	3,57E+09
		Vivos	3,35E+06	4,00E+06		3,68E+06	3,36E+09
		Morte	1,75E+05	3,03E+05		2,39E+05	2,18E+08
		% De 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
		Vivos	1,16E+07	1,23E+07		1,20E+07	3,49E+09
		Morte	1,27E+06	1,23E+06		1,25E+06	3,65E+08
		% De 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
		Vivos	5,22E+06	5,58E+06		5,40E+06	1,99E+09
		Morte	1,54E+06	1,40E+06		1,47E+06	5,42E+08
		% De Viabilidade	77,20%	79,90%		78,55%	

FIG. 18

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células/ml)	Média de Células Totais*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
		Vivos	3,26E+07	3,73E+07	3,67E+07	3,55E+07	4,92E+10
		Morte	2,93E+06	3,87E+06	3,59E+06	3,46E+06	4,80E+09
		% De 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
		Vivos	1,49E+08	1,58E+08	1,48E+08	1,52E+08	5,01E+10
		Morte	2,16E+07	2,04E+07	2,00E+07	2,07E+07	6,82E+09
		% De Viabilidade	87,30%	88,60%	88,10%	87,95%	

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células/ml)	Média de Células Totais*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
		Vivos	2,89E+07	2,25E+07	2,72E+07	2,62E+07	5,16E+10
		Morte	2,57E+06	2,61E+06	2,52E+06	2,57E+06	5,05E+09
		% De 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
		Vivos	2,03E+08	1,66E+08	1,33E+08	1,67E+08	5,52E+10
		Morte	3,00E+07	2,24E+07	1,94E+07	2,39E+07	7,90E+09
		% De Viabilidade	87,10%	88,10%	87,30%	87,50%	

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células/ml)	Média de Células Totais*Volume
Gen 2 nº M1085T pré-LOVO	N/S	Total				#DIV/0!	#DIV/0!
		Vivos				#DIV/0!	#DIV/0!
		Morte				#DIV/0!	#DIV/0!
		% De Viabilidade				#DIV/0!	
Gen 2 n° M1085T pós LOVO, pré adição de CS10	150	Total	8,51E+07	9,05E+07		8,78E+07	1,32E+10
		Vivos	7,33E+07	7,79E+07		7,56E+07	1,13E+10
		Morte	1,18E+07	1,26E+07		1,22E+07	1,83E+09
		% De Viabilidade	86,10%	86,10%		86,10%	

Para L4054 Gen 2, contagem pós-LOVO foi extrapolada em 4 frascos, porque foi o número total do estudo. 1 frasco foi contaminado e a extrapolação foi feita para o total = 6,67e+10

FIG. 19

	S1/S2/ Todos/ Vivo | Freq. de Pais (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14+| Freq. de Pais (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/ CD3-NK| Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/ CD19| Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/ TCRab| Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/T CRab|CD4 Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/ TCRab| CD4/ CD27 Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/ TCRab| CD4/ CD28 Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/T CRab|CD4/CD 56 Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivo/CD14-/T CRab|CD4/CD 57 Freq. de null (%)
A1 ger12 1st fcs	87,2	1,77E-03	0,66	0	98,9	60,6	3,35	60,1	0,06	5,34
A2 ger2 2nd fcs	73,5	0	0,12	0	99,7	83,1	7,94	82,6	0,14	6,18
A3 ger3 1st fcs	90,4	0	0,197	1,72e-03	98,8	49,1	4,5	48,9	0,18	4,02
A4 ger3 2nd fcs	72,1	2,56E-03	0,44	0,018	99,3	64,4	6,27	64	0,26	4,3
A5 PBMC fcs	93,7	6,07	11,6	6,12	70,9	41,1	35,6	40,4	0,041	0,31

area d foi incluida para fazer o gráfico
TCRab+ são = CD3+

S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q3: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)
TEMRA	NAIVE	CM	EM
0,25	0,073	3,37	96,3
0,16	0,047	2,39	97,4
0,2	0,059	2,29	97,5
0,25	0,18	7,12	92,5
0,91	36,1	16,2	46,9

S1/S2/ Todos/ Vivos/ CD14-/T CRab/ CD8 | Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivos/ CD14-/ TCRab/ CD8/CD27 | Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivos/ CD14-/T CRab/ CD8/CD28 | Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivos/C D14-/TC Rab/CD8 /CD56| Freq. de null (%)	S1/S2/ Todos/ Vivos/C D14-/TC Rab/CD8 /CD57| Freq. de null (%)
37,9	3,25	37,3	0,41	2,31
16,1	1,08	15,6	0,67	0,17
49,2	4,83	48,5	0,71	1,53
34,6	2,46	34	1,57	0,5
29,6	25,8	27,4	0,75	2,81

S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos /Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q3: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)
TEMRA	NAIVE	CM	EM
0,028	0	4,24	95,7
0,042	0,014	4,76	95,2
0,056	6,97E-03	3,11	96,8
0,18	0,13	10,2	89,5
8,05	40,9	3,02	48

S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q5: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q6: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q7: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q8: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)
TEMRA	NAIVE	CM	EM
0,033	9,37E-03	14,1	85,9
0,071	0,014	5,24	94,7
0,077	0,017	25,5	74,4
0,29	0,044	10,6	89,1
22,3	27,1	6,23	44,3

S1/S2/ Todos/ Vivos/ CD14-/TCRgd | Freq. de Pais (%)
0
0
0
0
0

S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q5: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q6: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q7: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)	S1/S2/Todos/ Vivos/ CD14-/TCRab/CD8/Q8: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Freq. de Pais (%)
TEMRA	NAIVE	CM	EM
0,056	0,032	21,1	78,8
0,036	0,014	8,3	91,6
0,059	0,049	30,7	69,2
0,12	0,072	20,1	79,7
11,4	23,1	16,4	49,1

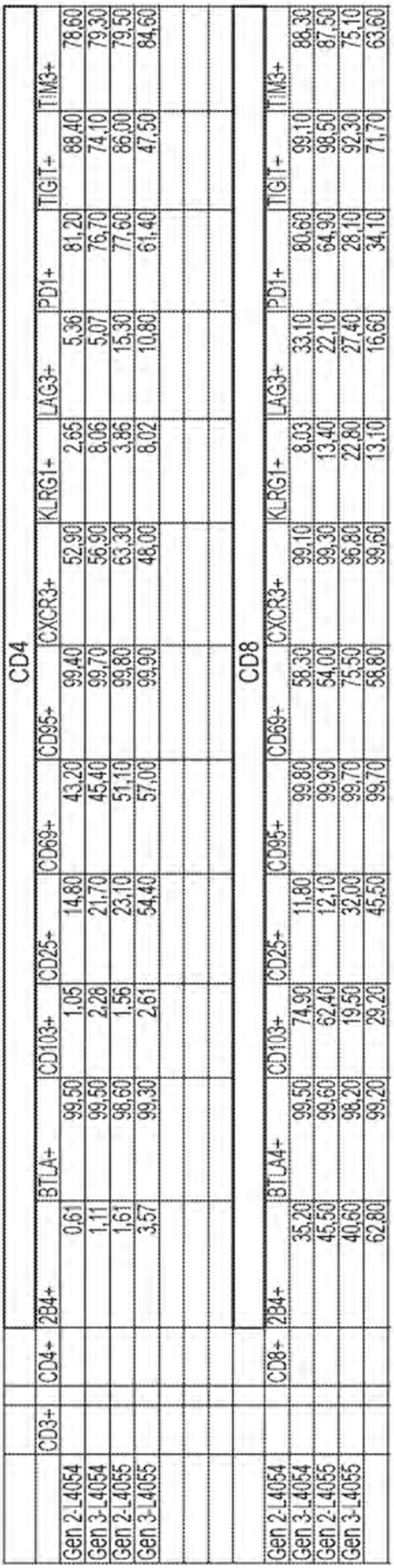
FIG. 20

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 643/745

	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-Dia 22-Coleta	50,4	98	0,61	0,13	0,3	99

CD3 CD8	CD3/CD8 CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-
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

FIG. 21



							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	64,90	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					

FIG. 22

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 645/745

	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	dxG2 estimulado por MC 3	dxG2 estimulado por MC 3	dxG2 estimulado por MC 3	ID de Poço
													Conc/Dil
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	dxG2 estimulado por MC 9	dxG2 estimulado por MC 9	dxG2 estimulado por MC 9	ID de Poço
													Conc/Dil
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	dxG2 estimulado por MC 27	dxG2 estimulado por MC 27	dxG2 estimulado por MC 27	ID de Poço
													Conc/Dil
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	dxG2 estimulado por MC 9	dxG2 estimulado por MC 9	dxG2 estimulado por MC 9	ID de Poço
													Conc/Dil
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	dxG3 estimulado por MC 3	dxG3 estimulado por MC 3	dxG3 estimulado por MC 3	ID de Poço
													Conc/Dil
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	dxG3 estimulado por MC 9	dxG3 estimulado por MC 9	dxG3 estimulado por MC 9	ID de Poço
													Conc/Dil
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	dxG3 estimulado por MC 3	dxG3 estimulado por MC 3	dxG3 estimulado por MC 3	ID de Poço
													Conc/Dil
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	TIL-Gen 3-Não Estimulado 81	TIL-Gen 3-Não Estimulado 81	TIL-Gen 3-Não Estimulado 81	TIL-Gen 3-Não Estimulado 81	TIL-Gen 3-Não Estimulado 81	TIL-Gen 3-Não Estimulado 81	dxG3 estimulado por MC 9	dxG3 estimulado por MC 9	dxG3 estimulado por MC 9	ID de Poço
													Conc/Dil
22,6 22,6													

FIG. 23A

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 646/745

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						Média	Média
A	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,117	0,116	0,117	0,105	0,108	0,102	450	Gen 2- Estimulado+TIL 1:3	2890,216	2084,946	3055,126	2676,76267	2757,81
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,041	0,043	0,041	0,041	0,043	0,041	570	Gen 2- Estimulado+TIL 1:9	2967,887	2117,46	3072,982	2719,42967	
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,076	0,074	0,076	0,064	0,065	0,06	Delta	Gen 2- Estimulado+TIL 1:27	2952,028	2128,412	3035,11	2705,18333	
	994,773	1002,343	1004,079	963,405	694,982	1018,375	1,825	1,421	1,952	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 2- Estimulado+TIL 1:81	3261,251	2361,138	3167,212	2929,867	
				2890,216	2084,946	3055,126	5,474	4,262	5,855	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
B	1,659	1,654	1,65	1,161	0,9	1,215	0,107	0,107	0,108	0,106	0,105	0,102	450	Gen 3- Estimulado+TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	#DIV/0!
	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	Gen 3- Estimulado+TIL 1:9	13273,546	>13500,00	13340,37	13306,9575	16089,32
	1,613	1,608	1,604	1,136	0,853	1,17	0,066	0,066	0,067	0,062	0,063	0,061	Delta	Gen 3- Estimulado+TIL 1:27	16947,994	16962,84	17161,47	17024,1	
	499,866	497,826	496,528	329,765	235,273	341,438	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 3- Estimulado+TIL 1:81	17571,427	18246,77	17992,49	17936,8973	
				2967,887	2117,46	3072,982	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
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	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:3	5,474	4,262	5,855	5,197	5,20
	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	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:9	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	
	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	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:27	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	
	253,244	256,8	249,399	109,334	78,83	112,411	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:81	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	
				2952,028	2128,412	3035,11	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
D	0,549	0,541	0,542	0,258	0,218	0,259	0,102	0,101	0,103	0,111	0,102	0,101	450	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:3	3,435	0,854	2,465	2,25133333	19,74
	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	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:9	10,304	<0,000	<0,000	10,304	
	0,505	0,498	0,499	0,216	0,176	0,212	0,06	0,059	0,061	0,061	0,06	0,057	Delta	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:27	30,239	<0,000	31,588	30,9135	
	125,458	123,174	123,508	40,262	29,15	39,101	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:81	9,644	4,039	92,74	35,4743333	
				3261,251	2361,138	3167,212	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	X dil factor						
E	0,334	0,332	0,332	SUPER-FLUXO	SUPER-FLUXO	SUPER-FLUXO	0,114	0,11	0,113	0,103	0,102	0,104	450	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	0,00
	0,043	0,042	0,042	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,041	0,041	0,042	0,042	0,042	0,043	570	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	
	0,291	0,29	0,29	?????	?????	?????	0,073	0,069	0,072	0,062	0,061	0,061	Delta						
	61,826	61,537	61,594	?????	?????	?????	1,145	0,285	0,822	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]						
				?????	?????	?????	3,435	0,854	2,465	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
F	0,222	0,222	0,224	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,114	0,104	0,107	0,101	0,103	0,101	450	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	0,00
	0,042	0,043	0,042	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,041	0,041	0,042	0,042	0,041	0,042	570	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	
	0,18	0,179	0,181	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,073	0,063	0,066	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	[Concentração]						
				13273,55	>13500,000	13340,37	10,304	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
G	0,174	0,17	0,172	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,114	0,109	0,114	0,106	0,107	0,104	450	Controle Não estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	0,00
	0,041	0,041	0,041	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,042	0,042	0,041	0,042	0,041	0,042	570	Controle Não estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	
	0,132	0,128	0,131	[illegible]	[illegible]	[illegible]	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	[Concentração]						
				16947,99	16962,84	17161,47	30,239	<0,000	31,588	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
H	0,117	0,111	0,114	0,84	0,867	0,857	0,11	0,11	0,115	0,109	0,11	0,113	450	Controle Não estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	<0,000	<0,000	<0,000	0	30,28
	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	Controle Não estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	<0,000	<0,000	60,557	60,557	
	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	[Concentração]						
				17571,43	18246,77	17992,49	9,644	4,039	92,74	<0,000	<0,000	60,557	fator x dill						

FIG. 23B

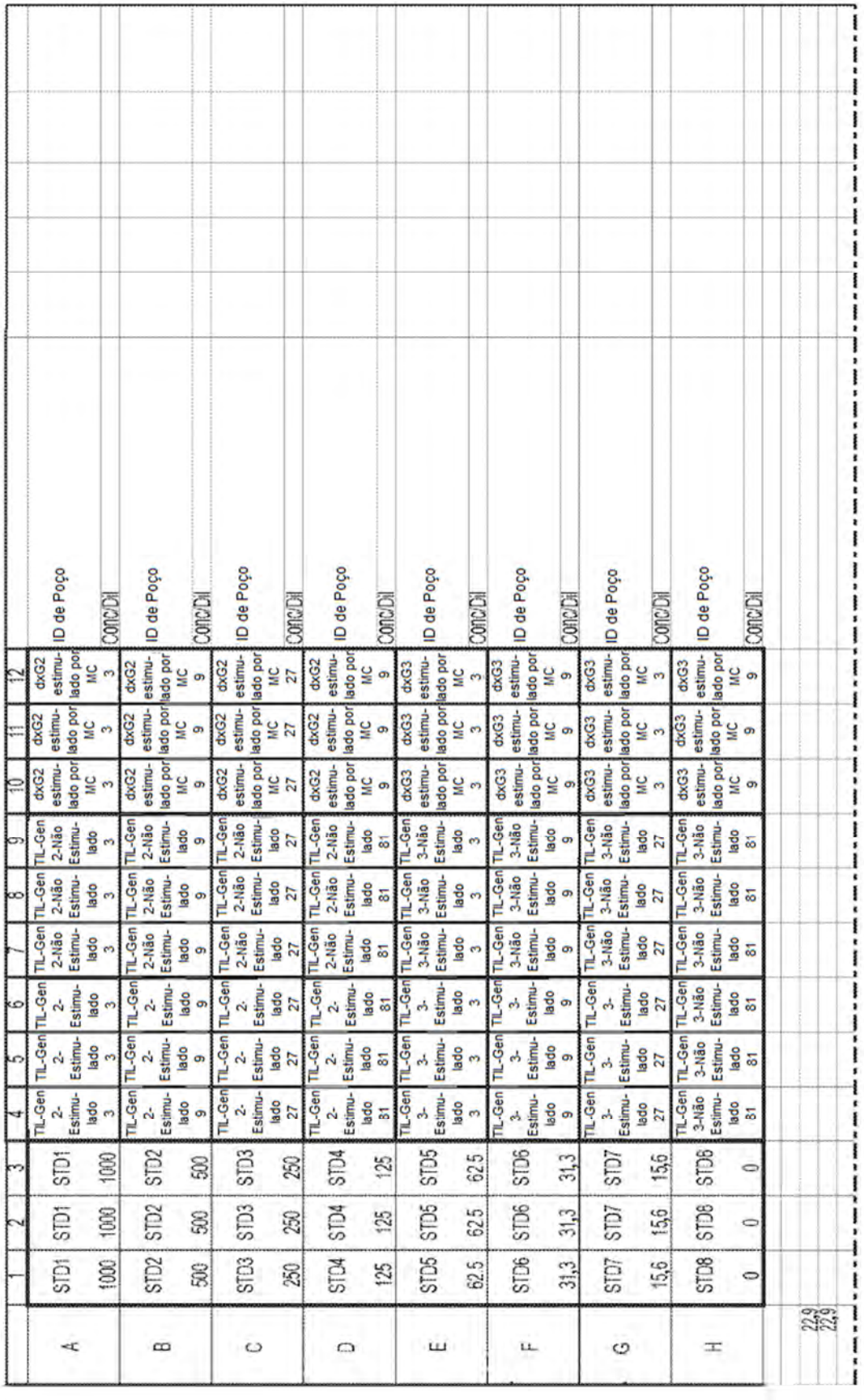

A
B
C
D
E
F
G
H
STD1 1000
STD2 500
STD3 250
STD4 125
STD5 62,5
STD6 31,3
STD7 15,6
STD8 0
ID de Poço
Conc/Dil

FIG. 24A

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 648/745

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						Média	Média
A	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,128	0,126	0,132	0,11	0,111	0,107	450	Gen 2- Estimulado+TIL 1:3	3435,858	2933,14	2905,979	3091,659	3261,65
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,041	0,041	0,042	0,042	0,041	0,042	570	Gen 2- Estimulado+TIL 1:9	3616,262	3001,429	2926,474	3201,388333	
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,087	0,085	0,09	0,069	0,069	0,065	Delta	Gen 2- Estimulado+TIL 1:27	3471,282	3097,07	2994,844	3187,732	
	1001,719	995,223	1003,493	1145,286	977,713	968,66	2,922	2,418	3,712	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 2- Estimulado+TIL 1:81	3910,387	3552,941	3234,126	3565,818	
				3435,858	2933,14	2905,979	8,766	7,254	11,136	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
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	450	Gen 3- Estimulado+TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	#DIV/0!
	0,047	0,046	0,047	0,046	0,045	0,047	0,041	0,042	0,044	0,042	0,041	0,042	570	Gen 3- Estimulado+TIL 1:9	13183,826	13421,925	12822,143	13142,53133	15303,54
	1,622	1,589	1,621	1,365	1,154	1,13	0,078	0,076	0,082	0,07	0,07	0,072	Delta	Gen 3- Estimulado+TIL 1:27	16231,22	16700,175	14586,268	15839,221	
	503,563	491,203	503,336	406,474	333,492	325,164	0,931	0,531	1,786	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 3- Estimulado+TIL 1:81	17140,679	17638,195	16007,402	16928,75867	
				3676,262	3001,429	2926,474	8,383	4,779	16,076	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
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	450	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:3	8,766	7,254	11,136	9,052	27,10
	0,045	0,043	0,045	0,045	0,043	0,045	0,041	0,044	0,042	0,041	0,043	0,043	570	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:9	8,383	4,779	16,076	9,746	
	0,929	0,914	0,894	0,531	0,486	0,473	0,074	0,072	0,083	0,07	0,071	0,071	Delta	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:27	5,632	<0,000	53,672	29,652	
	256,406	251,388	244,654	128,566	114,706	110,92	0,209	<0,000	1,988	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 2- Não Estimulado+TIL 1:81	<0,000	<0,000	59,939	59,939	
				3471,282	3097,07	2994,844	5,632	<0,000	53,672	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
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	450	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:3	19,738	13,255	20,614	17,869	43,26
	0,044	0,042	0,044	0,042	0,043	0,041	0,042	0,043	0,042	0,042	0,041	0,042	570	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:9	13,875	31,096	19,718	21,563	
	0,533	0,509	0,516	0,259	0,243	0,229	0,073	0,067	0,077	0,069	0,07	0,068	Delta	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:27	0,172	<0,000	33,321	16,7465	
	129,057	121,737	123,877	48,276	43,863	39,927	<0,000	<0,000	0,74	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]	Gen 3- Não Estimulado+TIL 1:81	77,18	171,968	92,74	35,4743333	
				3910,387	3552,941	3234,126	<0,000	<0,000	59,939	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
E	0,361	0,35	0,346	SUPER-FLUXO	SUPER-FLUXO	SUPER-FLUXO	0,143	0,135	0,145	0,115	0,112	0,11	450	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	0,00
	0,042	0,042	0,042	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,041	0,042	0,042	0,041	0,043	0,041	570	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	<0,000	<0,000	<0,000	#DIV/0!	
	0,319	0,309	0,304	?????	?????	?????	0,102	0,093	0,103	0,074	0,069	0,068	Delta						
	65,323	62,395	61,049	?????	?????	?????	6,579	4,418	6,871	0,076	<0,000	<0,000	[Concentração]						
				?????	?????	?????	19,738	13,255	20,614	0,228	<0,000	<0,000	fator x dill						
F	0,237	0,233	0,239	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,122	0,144	0,125	0,114	0,112	0,111	450	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	0,228	<0,000	<0,000	0,228	0,11
	0,042	0,043	0,042	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,041	[illegible]	0,042	0,041	0,041	0,042	570	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	<0,000	<0,000	<0,000	0	
	0,195	0,19	0,197	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,081	0,089	0,084	0,073	0,071	0,069	Delta						
	30,739	29,388	31,253	1464,87	1491,325	1424,683	1,542	3,455	2,191	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]						
				13163,83	13421,93	12822,14	13,875	31,096	19,718	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
G	0,182	0,173	0,183	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,115	0,115	0,121	0,114	0,111	0,114	450	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	<0,000	<0,000	<0,000	0	0,00
	0,044	0,041	0,042	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,042	0,041	0,042	0,041	0,041	0,043	570	Controle estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	<0,000	<0,000	<0,000	0	
	0,138	0,132	0,141	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,073	0,073	0,079	0,073	0,07	0,07	Delta						
	15,598	14,006	16,321	601,156	618,525	540,232	0,006	<0,000	1,234	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]						
				16231,22	16700,18	14586,27	0,172	<0,000	33,321	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
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	450	Controle Não estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:3	<0,000	<0,000	<0,000	0	1,53
	0,045	0,042	0,047	0,043	0,045	0,043	0,041	0,041	0,043	0,045	0,044	0,042	570	Controle Não estimulado com meio Gen 2 - TIL 1:9	1,357	4,779	<0,000	3,068	
	0,076	0,075	0,074	0,793	0,812	0,75	0,078	0,083	0,079	0,074	0,076	0,071	Delta						
	0,635	0,408	0,17	211,613	217,755	197,622	0,953	2,123	1,256	0,151	0,531	<0,000	[Concentração]						
				17140,68	17638,2	16007,4	77,18	171,968	101,73	1,357	4,779	<0,000	fator x dill						

FIG. 24B

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 649/745

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1 1000	STD1 1000	STD1 1000	2A-ESFERA +TIL 3	2A-ESFERA +TIL 3	2A-ESFERA +TIL 3	2A-MC 3	2A-MC 3	2A-MC 3	2B-Não Estimulado 3	2B-Não Estimulado 3	2B-Não Estimulado 3	ID de Poço Conc/Dil
B	STD2 500	STD2 500	STD2 500	2A-ESFERA +TIL 9	2A-ESFERA +TIL 9	2A-ESFERA +TIL 9	2A-MC 9	2A-MC 9	2A-MC 9	2B-Não Estimulado 9	2B-Não Estimulado 9	2B-Não Estimulado 9	ID de Poço Conc/Dil
C	STD3 250	STD3 250	STD3 250	2A-ESFERA +TIL 27	2A-ESFERA +TIL 27	2A-ESFERA +TIL 27	2A-MC 27	2A-MC 27	2A-MC 27	2B-Não Estimulado 27	2B-Não Estimulado 27	2B-Não Estimulado 27	ID de Poço Conc/Dil
D	STD4 125	STD4 125	STD4 125	2A-ESFERA +TIL 81	2A-ESFERA +TIL 81	2A-ESFERA +TIL 81	2A-MC 81	2A-MC 81	2A-MC 81	2B-Não Estimulado 81	2B-Não Estimulado 81	2B-Não Estimulado 81	ID de Poço Conc/Dil
E	STD5 62,5	STD5 62,5	STD5 62,5	2A-ESFERA +TIL 3	2A-ESFERA +TIL 3	2A-ESFERA +TIL 3	2B-Não Estimulado 3	2B-Não Estimulado 3	2B-Não Estimulado 3	2B-MC 3	2B-MC 3	2B-MC 3	ID de Poço Conc/Dil
F	STD6 31,3	STD6 31,3	STD6 31,3	2A-ESFERA +TIL 9	2A-ESFERA +TIL 9	2A-ESFERA +TIL 9	2B-Não Estimulado 9	2B-Não Estimulado 9	2B-Não Estimulado 9	2B-MC 9	2B-MC 9	2B-MC 9	ID de Poço Conc/Dil
G	STD7 15,6	STD7 15,6	STD7 15,6	2A-ESFERA +TIL 27	2A-ESFERA +TIL 27	2A-ESFERA +TIL 27	2B-Não Estimulado 27	2B-Não Estimulado 27	2B-Não Estimulado 27	2B-MC 27	2B-MC 27	2B-MC 27	ID de Poço Conc/Dil
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	2A-ESFERA +TIL 81	2A-ESFERA +TIL 81	2A-ESFERA +TIL 81	2B-Não Estimulado 81	2B-Não Estimulado 81	2B-Não Estimulado 81	2B-MC 81	2B-MC 81	2B-MC 81	ID de Poço Conc/Dil
24.1													
24.1													

FIG. 25A

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 650/745

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						Média	Média
A	2,119	2,221	2,271	3,051	3,175	3,136	0,079	0,079	0,081	0,18	0,198	0,191	450	2A- esfera+TIL 1:3					
	1,046	1,078	1,096	0,952	1,032	1,032	0,042	0,042	0,043	0,042	0,043	0,042	570	2A- esfera+TIL 1:9	4656,178	5074,253	5029,349	4919,927	5124,412
	2,071	2,142	2,175	2,1	2,143	2,104	0,037	0,037	0,037	0,1338	0,156	0,149	Delta	2A- esfera+TIL 1:27	4916,763	5266,064	5189,955	5124,261	
	951,995	1012,581	1035,454	1479,442	>1500,000	>1500,000	0,379	0,287	0,472	37,604	44,509	41,927	[Concentração]	2A- esfera+TIL 1:81	5249,956	5464,506	5272,686	5329,049	
				4438,326	>4500,000	>4500,000	1,137	0,861	1,417	112,812	133,527	125,78	fator x dill						
B	1,221	1,22	1,252	1,265	1,361	1,352	0,077	0,077	0,077	0,109	0,115	0,114	450	2B- esfera+TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	
	0,046	0,046	0,046	0,046	0,047	0,047	0,042	0,044	0,042	0,042	0,043	0,042	570	2B- esfera+TIL 1:9				#DIV/0!	
	1,175	1,174	1,206	1,219	1,314	1,304	0,035	0,033	0,035	0,067	0,072	0,072	Delta	2B- esfera+TIL 1:27	15284,891	13019,2	16306,887	14870,33	15061,77
	496,244	495,812	511,027	517,353	563,806	558,817	<0,000	<0,000	<0,000	10,74	12,637	12,564	[Concentração]	2B- esfera+TIL 1:81	16086,64	13205,761	16467,237	15253,21	
				4656,178	5074,253	5029,349	<0,000	<0,000	<0,000	96,66	113,737	113,077	fator x dill						
C	0,677	0,681	0,681	0,531	0,563	0,555	0,075	0,074	0,075	0,087	0,096	0,091	450	2A-Não Estimulado+TIL 1:3	112,812	133,527	125,78	124,0397	107,374
	0,043	0,044	0,044	0,044	0,045	0,043	0,042	0,042	0,042	0,042	0,045	0,042	570	2A-Não Estimulado+TIL 1:9	96,66	113,737	113,077	107,8247	
	0,634	0,637	0,637	0,488	0,518	0,511	0,033	0,032	0,033	0,045	0,05	0,049	Delta	2A-Não Estimulado+TIL 1:27	76,848	131,834	113,974	107,552	
	245,876	247,384	247,428	182,102	195,039	192,221	<0,000	<0,000	<0,000	2,846	4,883	4,221	[Concentração]	2A-Não Estimulado+TIL 1:81	71,65	82,102	116,487	90,07967	
				4916,763	5266,064	5189,955	<0,000	<0,000	<0,000	76,848	131,834	113,974	fator x dill						
D	0,406	0,405	0,407	0,251	0,257	0,25	0,075	0,075	0,077	0,082	0,081	0,084	450	2B-Não Estimulado+TIL 1:3	317,235	324,939	224,765	288,9797	236,1614
	0,044	0,043	0,044	0,044	0,043	0,042	0,042	0,043	0,043	0,044	0,042	0,044	570	2B-Não Estimulado+TIL 1:9	285,917	302,211	210,37	266,166	
	0,363	0,362	0,363	0,207	0,214	0,208	0,033	0,032	0,035	0,039	0,039	0,04	Delta	2B-Não Estimulado+TIL 1:27	205,324	161,226	93,466	153,3387	
	128,798	128,379	128,798	64,814	67,463	65,095	<0,000	<0,000	<0,000	0,885	1,014	1,438	[Concentração]	2B-Não Estimulado+TIL 1:81					
				5249,956	5464,506	5272,686	<0,000	<0,000	<0,000	71,65	82,102	116,487	fator x dill						
E	0,244	0,241	0,241	SUPER-FLUXO	SUPER-FLUXO	SUPER-FLUXO	0,35	0,356	0,275	0,078	0,079	0,079	450	Meio de controle 2A a 1:3	1,137	0,861	1,417	1,138333	1,138778
	0,042	0,042	0,042	0,051	0,053	0,053	0,043	0,043	0,043	0,042	0,042	0,043	570	Meio de controle 2A a 1:9					
	0,201	0,199	0,199	?????	?????	?????	0,307	0,314	0,232	0,036	0,036	0,036	Delta	Meio de controle 2A a 1:27					
	65,323	61,493	61,533	?????	?????	?????	105,745	108,313	74,922	0,079	0,079	<0,000	[Concentração]	Meio de controle 2A a 1:81					
				?????	?????	?????	317,235	324,939	224,765	0,237	0,237	<0,000	fator x dill						
F	0,166	0,165	0,161	3,24	2,463	3,972	0,165	0,17	0,146	0,078	0,079	0,078	450	Meio de controle 2B a 1:3	0,237	0,953	<0,000	0,595	1,47425
	0,042	0,043	0,043	0,055	0,053	0,053	0,043	0,042	0,045	0,042	0,042	0,042	570	Meio de controle 2Ba 1:9	0,457	4,25	<0,000	2,3535	
	0,124	0,122	0,119	3,185	2,475	3,759	0,123	0,128	0,101	0,036	0,037	0,035	Delta	Meio de controle 2B a 1:27					
	31,999	31,384	30,079	>1500,000	1346,731	>1500,000	31,769	33,579	23,374	0,051	0,472	<0,000	[Concentração]	Meio de controle 2B a 1:81					
				>13500,000	12120,579	>13500,000	285,917	302,211	210,37	0,457	4,25	<0,000	fator x dill						
G	0,122	0,119	0,117	3,24	2,463	3,972	0,102	0,097	0,092	0,072	0,072	0,07	450						
	0,043	0,042	0,043	0,055	0,053	0,053	0,043	0,044	0,045	0,043	0,045	0,043	570						
	0,078	0,076	0,074	3,185	2,475	3,759	0,058	0,054	0,046	0,029	0,028	0,027	Delta						
	14,956	14,181	13,334	566,107	482,193	603,959	7,605	5,971	3,462	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]						
				15284,891	13019,2	16306,887	205,324	161,226	93,466	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						
H	0,077	0,084	0,077	0,572	0,489	0,583	0,098	0,082	0,086	0,074	0,073	0,07	450						
	0,042	0,042	0,042	0,046	0,045	0,046	0,049	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043	570						
	0,036	0,042	0,036	0,526	0,443	0,537	0,05	0,038	0,043	0,031	0,03	0,027	Delta						
	<0,000	2,136	0,023	198,6	163,034	203,299	4,534	0,756	2,305	<0,000	<0,000	<0,000	[Concentração]						
				16086,64	13205,761	16467,237	367,254	61,271	186,668	<0,000	<0,000	<0,000	fator x dill						

FIG. 25B

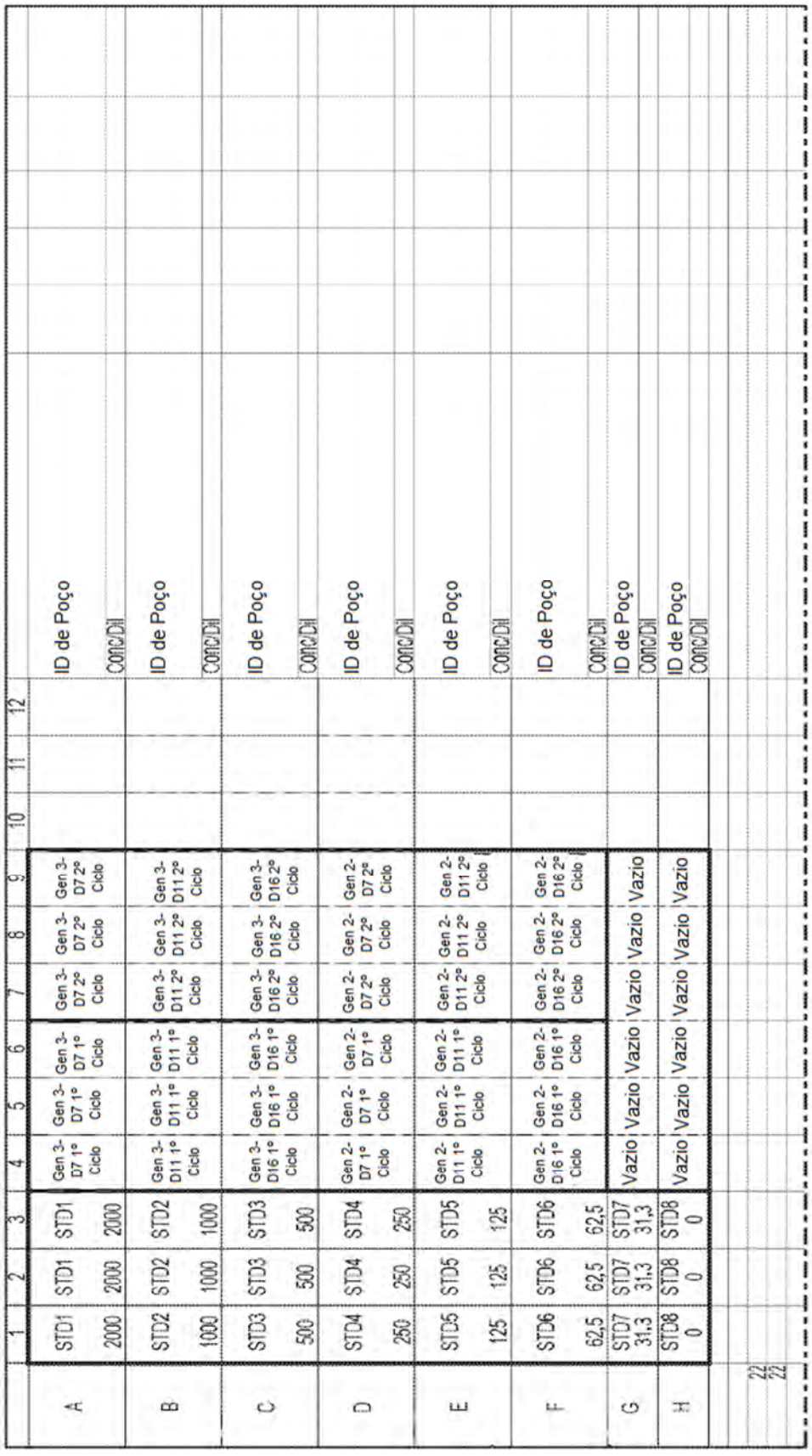
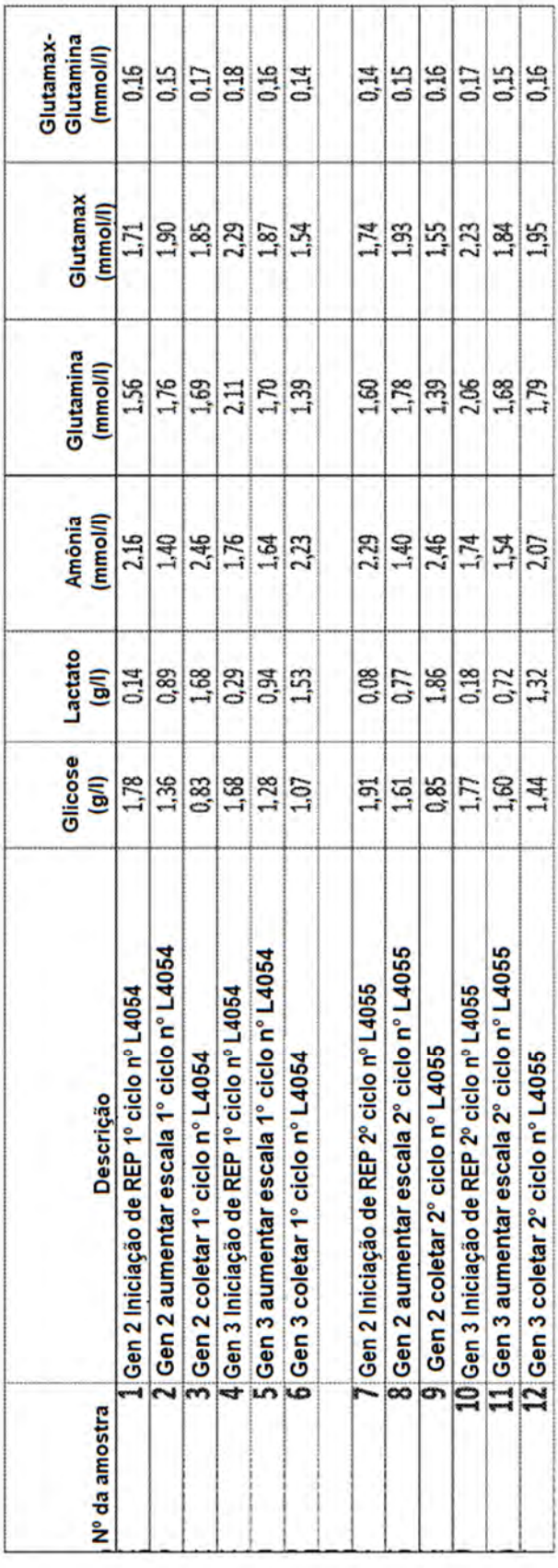

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A STD1 STD1 STD1 Gen 3- D7 1º Ciclo Gen 3- D7 1º Ciclo Gen 3- D7 1º Ciclo Gen 3- D7 2º Ciclo Gen 3- D7 2º Ciclo Gen 3- D7 2º Ciclo ID de Poço
2000 2000 2000 Conc/Dil
B STD2 STD2 STD2 Gen 3- D11 1º Ciclo Gen 3- D11 1º Ciclo Gen 3- D11 1º Ciclo Gen 3- D11 2º Ciclo Gen 3- D11 2º Ciclo Gen 3- D11 2º Ciclo ID de Poço
1000 1000 1000 Conc/Dil
C STD3 STD3 STD3 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 ID de Poço
500 500 500 Conc/Dil
D STD4 STD4 STD4 Gen 2- D7 1º Ciclo Gen 2- D7 1º Ciclo Gen 2- D7 1º Ciclo Gen 2- D7 2º Ciclo Gen 2- D7 2º Ciclo Gen 2- D7 2º Ciclo ID de Poço
250 250 250 Conc/Dil
E STD5 STD5 STD5 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 ID de Poço
125 125 125 Conc/Dil
F STD6 STD6 STD6 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 ID de Poço
62,5 62,5 62,5 Conc/Dil
G STD7 STD7 STD7 Vazio Vazio Vazio Vazio Vazio Vazio ID de Poço
31,3 31,3 31,3 Conc/Dil
H STD8 STD8 STD8 Vazio Vazio Vazio Vazio Vazio Vazio ID de Poço
0 0 0 Conc/Dil
22
22

FIG. 26A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,228	2,247	2,249	0,218	0,22	0,215	0,187	0,187	0,184			
	0,057	0,052	0,061	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	1,458	1,451	1,428	0,415	0,412	0,435	0,394	0,392	0,356			
	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043	0,044	0,044			
	1,086	1,123	1,128	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	233,9443	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	0,046	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	124,995	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	121,895	139,491	135,738	149,459			
G	0,088	0,088	0,089	2,265	2,263	2,27	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	2,213	2,221	2,174	2,122	2,186			
	28,375	28,237	28,514	2014,9	2081,651	1970,439	1973,799	1920,845	1986,127			
H	0,05	0,048	0,048	2,272	2,257	2,243	2,224	2,254	2,248			
	0,043	0,042	0,041	0,05	0,05	0,052	0,057	0,052	0,059			
	0,007	0,006	0,007	2,223	2,211	2,191	2,167	2,202	2,189			
	3,1	2,399	2,573	2023,073	2016,943	1960,16	1986,84	2002,036	1988,165			

450								
570	Fator de Diluição=100							
Delta		Leitura A	Leitura B	Leitura C	Leitura A*100	Leitura B*100	Leitura C*100	Média
[Concentração]	Gen 3 Iniciação de REP 1° ciclo	124,530	126,082	121,662	12453,0	12608,2	12166,2	12409,1
450	Gen 3 aumentar escala 1° ciclo	282,400	280,328	299,854	28240,0	28032,8	29985,4	28752,7
570	Gen 3 coletar 1° ciclo	252,774	247,768	250,557	25277,4	24776,8	25055,7	25036,6
Delta								
[Concentração]	Gen 2 Iniciação de REP 1° ciclo	79,199	77,702	93,523	7919,9	7770,2	9352,3	8347,5
450	Gen 2 aumentar escala 1° ciclo	136,754	131,526	131,682	13675,4	13152,6	13166,2	13332,1
570	Gen 2 coletar 1° ciclo	117,564	130,125	121,895	11756,4	13012,5	12189,5	12319,5
Delta								
[Concentração]								
450	Gen 3 Iniciação de REP 2° ciclo	99,302	100,904	92,083	9930,2	10090,4	9206,3	9743,0
570	Gen 3 aumentar escala 2° ciclo	264,954	262,893	233,453	26495,4	26289,3	23345,3	25376,7
Delta	Gen 3 coletar 2° ciclo	233,943	219,211	212,888	23394,3	21921,1	21288,8	22201,4
[Concentração]								
450	Gen 2 Iniciação de REP 2° ciclo	76,431	71,588	71,737	7643,1	7158,8	7173,7	7325,2
570	Gen 2 aumentar escala 2° ciclo	147,807	132,695	125,539	14780,7	13269,5	12553,9	13534,7
Delta	Gen 2 coletar 2° ciclo	139,491	135,738	149,459	13949,1	13573,8	14945,9	14156,3
[Concentração]								
450								
570								
Delta								
[Concentração]								
450								
570								
Delta								
[Concentração]								
450								
570								
Delta								
[Concentração]								

FIG. 26B



Nº 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 Iniciação de REP 1° ciclo nº L4054	1,78	0,14	2,16	1,56	1,71	0,16
2	Gen 2 aumentar escala 1° ciclo nº L4054	1,36	0,89	1,40	1,76	1,90	0,15
3	Gen 2 coletar 1° ciclo nº L4054	0,83	1,68	2,46	1,69	1,85	0,17
4	Gen 3 Iniciação de REP 1° ciclo nº L4054	1,68	0,29	1,76	2,11	2,29	0,18
5	Gen 3 aumentar escala 1° ciclo nº L4054	1,28	0,94	1,64	1,70	1,87	0,16
6	Gen 3 coletar 1° ciclo nº L4054	1,07	1,53	2,23	1,39	1,54	0,14
7	Gen 2 Iniciação de REP 2° ciclo nº L4055	1,91	0,08	2,29	1,60	1,74	0,14
8	Gen 2 aumentar escala 2° ciclo nº L4055	1,61	0,77	1,40	1,78	1,93	0,15
9	Gen 2 coletar 2° ciclo nº L4055	0,85	1,86	2,46	1,39	1,55	0,16
10	Gen 3 Iniciação de REP 2° ciclo nº L4055	1,77	0,18	1,74	2,06	2,23	0,17
11	Gen 3 aumentar escala 2° ciclo nº L4055	1,60	0,72	1,54	1,68	1,84	0,15
12	Gen 3 coletar 2° ciclo nº L4055	1,44	1,32	2,07	1,79	1,95	0,16

FIG. 27

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 654/745

	$FIL	S/L/1301 | Geométrica	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
SD	-	999	41,3

FIG. 28

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 655/745

Estudo	Amostra	ID de Amostra	Espécie	Cadeia	Leituras	CDR3	CD3 Exclusiva	D50
20180511_Estudo1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_Estudo1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_Estudo1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0,1
20180511_Estudo1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0,9

FIG. 29

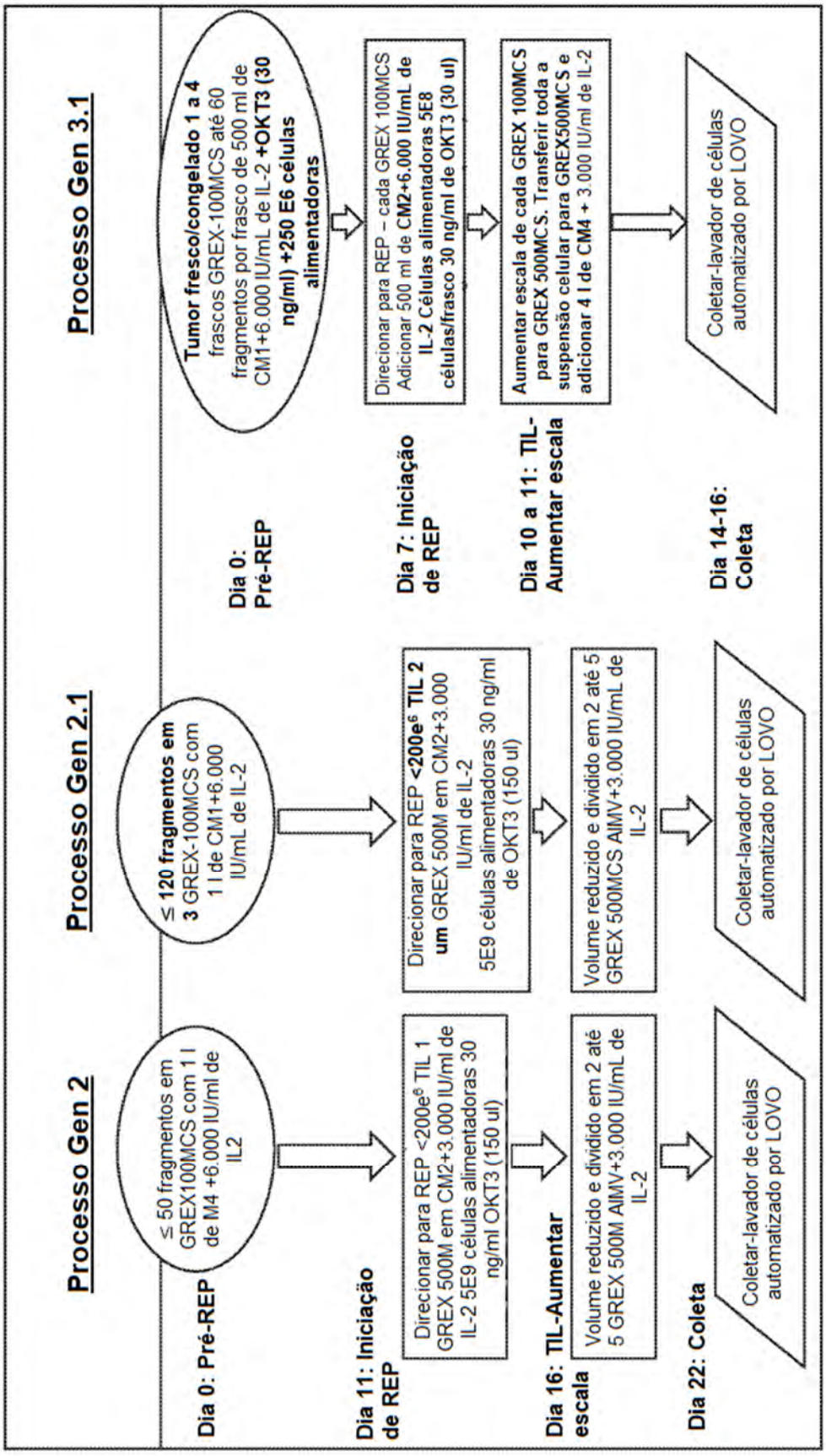

Processo Gen 2
Processo Gen 2.1
Processo Gen 3.1
Dia 0: Pré-REP
≤ 50 fragmentos em GREX100MCS com 1 l de M4 +6.000 IU/ml de IL2
≤ 120 fragmentos em 3 GREX-100MCS com 1 l de CM1+6.000 IU/mL de IL-2
Tumor fresco/congelado 1 a 4 frascos GREX-100MCS até 60 fragmentos por frasco de 500 ml de CM1+6.000 IU/mL de IL-2 +OKT3 (30 ng/ml) +250 E6 células alimentadoras
Dia 0: Pré-REP
Dia 11: Iniciação de REP
Direcionar para REP <200e6 TIL 1 GREX 500M em CM2+3.000 IU/ml de IL-2 5E9 células alimentadoras 30 ng/ml OKT3 (150 ul)
Direcionar para REP <200e6 TIL 2 um GREX 500M em CM2+3.000 IU/ml de IL-2 5E9 células alimentadoras 30 ng/ml de OKT3 (150 ul)
Direcionar para REP – cada GREX 100MCS Adicionar 500 ml de CM2+6.000 IU/mL de IL-2 Células alimentadoras 5E8 células/frasco 30 ng/ml de OKT3 (30 ul)
Dia 7: Iniciação de REP
Dia 16: TIL-Aumentar escala
Volume reduzido e dividido em 2 até 5 GREX 500M AIMV+3.000 IU/mL de IL-2
Volume reduzido e dividido em 2 até 5 GREX 500MCS AIMV+3.000 IU/mL de IL-2
Aumentar escala de cada GREX 100MCS para GREX 500MCS. Transferir toda a suspensão celular para GREX500MCS e adicionar 4 l de CM4 + 3.000 IU/ml de IL-2
Dia 10 a 11: TIL-Aumentar escala
Dia 22: Coleta
Coletar-lavador de células automatizado por LOVO
Coletar-lavador de células automatizado por LOVO
Coletar-lavador de células automatizado por LOVO
Dia 14-16: Coleta

FIG. 30

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 657/745

ETAPA	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0 Otimizado
Pré-REP- dia 0	≤ 50 fragmentos/ 1 G-Rex 100MCS - **11 dias**	≤ 180 fragmentos/ 3 G-Rex, meio aquecido CM1 pré-formulado 100MCS **- 11 dias**	***Tumor fresco ou congelado*** Tumor Inteiro com ≤ 30 fragmentos até 60 fragmentos por 1 G-Rex. 100MCS (até 4 G-Rex), meio aquecido pré-formulado - **7 dias. Pré-REP, Células alimentadoras 2,5 E8 + OKT-3 (30ng/ml)**
Iniciação de REP	Direcionar para REP- Dia 11- **<200 E6 TIL** 1 G-Rex 500MCS	Direcionar para REP- Dia 11- **<200 E6 TIL** meio aquecido de CM2 pré-formulado em um G-Rex 500MCS	Direcionar para REP - Dia **7-todas as células TIL- mesmo G-Rex 100MCS (100MCS até 4 GREX), Meio padrão ou Meio definido (livre de soro). Adição de células alimentadoras 5 E8 +OKT-3 (30 ng/ml)**
Propagação ou aumentar escala de TIL	Divisão de 1 para 5 G-REX 500MCS **dia 16**	Divisão de meio aquecido de CM4 pré-formulado de 2 para 5 G-REX 500MCS **dia 16**	A partir de G-REX 100MCS transferir suspensão de TIL para G-REX 500MCS, até 4 GREX 500 MCS-Meio padrão ou meio definido (livre de soro) **Aumentar escala no dia 10 ou 11**
Coleta	**Coleta dia 22,** lavador de células automatizado por LOVO	**Coleta dia 22,** lavador de células automatizado por LOVO (5 ciclos de lavagem)	**Coleta dia 14 ou 16** lavador de células automatizado por LOVO (5 ciclos de lavagem)
Formulação Final	Produto Criopreservado 300 IU/ml de IL2- CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto Criopreservado 300 IU/ml de IL2- CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto Criopreservado 300 IU/ml de IL2- CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas
Tempo de Processo	**22 dias**	**22 dias**	**16 dias**

FIG. 31

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 658/745

Dia do Processo	Condições	Gen 3.1
Dia 0- pré-iniciação de REP	Meio CM1	500 ml
	IL-2 (6000 IU/ml)	+
	OKT-3 (30ng/ml)	+
	Alimentadoras (250 E+06)	+

Dia do Processo	Condições	Gen 3.1
Dia 7- iniciação de REP	Meio CM2	500 ml
	IL-2 (6000 IU/ml)	+
	OKT-3 (30 ng/ml) adicionado no Dia 7	+
	Alimentadoras adicionadas no Dia 7	500 E06
	Alimentadoras totais no Dia	750 E+06

Dia do Processo	Condições	Gen 3.1
Dia 9-11 - Aumentar escala	A partir de G-REX 100MCS transferir suspensão de TIL para 1 G-REX 500MCS (até 3 GREX 500MCS)	Sim
Dia 16 - Coleta	Lavador de células automatizado por LOVO	Sim

FIG. 32

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 659/745

Comparação do Processo	Principais Mudanças do Processo	Benefícios
Gen 2 : Gen 2.1	• Iniciar processo com dois frascos, em vez de um frasco • Dividir camada alimentadora de iniciação de REP entre 2 frascos de G-Rex500MCS • Pré-formular o meio e aquecer antes de usar	• Potencial duplicação da contagem final de células (dose com repertório TIL aumentado. • Redundância de processo em todo o processo
Gen 2.1 : Gen 3.1	• Tumor fresco ou congelado • Dias 14 -16 do processo (a partir do dia 22) • Reduz a camada alimentadora total no processo • Camada aimentadora e OKT3 presente no Dia 0 • REP iniciado com fragmentos • 100MCS aumenta escala para 500MCS • Aumentar escala para múltiplos frascos de pré-REP • Meio padrão e Meio definido (livre de soro)	• Potencial duplicação da contagem final de células (dose com repertório TIL aumentado. • Redundância de processo em todo o processo • Potência aumentada • Fenótipo aprimorado • Tempo de processo reduzido • Teste de reagente reduzido • Variabilidade de processo reduzida • Reagentes definidos • Repertório aumentado • Impurezas reduzidas (alimentadoras) • Dose comparável ou superior.

FIG. 33

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 660/745

Comparação do Processo	Principais Mudanças do Processo	Aprimoramento Desejado	Critérios para sucesso	Resultado
Gen 2 : Gen 3.0	• 14-16 dias • Iniciar REP com fragmentos até 4 frascos. • 100MCS aumenta escala para 500MCS	• Potência aumentada • Fenótipo aprimorado • Tempo de processo reduzido	• Aumentar potência conforme medida por INF-g✓ • Fenótipo comparável ✓ • Dose comparável ✓ • Pureza comparável ✓ (célula alimentadora) • Manter diversidade clonal ✓	• Potência aumentada sobre Gen2 • Expressão aprimorada de CD28 em células CD8 • Capacidade máxima de frasco enriquecido no dia 16 em Gen 3.1 • Uso de célula alimentadora reduzido • Diversidade aumentada

FIG. 34

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 661/745

Processo	Gen 2	Gen 3
L4054	Meio padrão	Meio padrão
L4055	Meio padrão	Meio padrão
M1085T	Meio padrão	Meio padrão

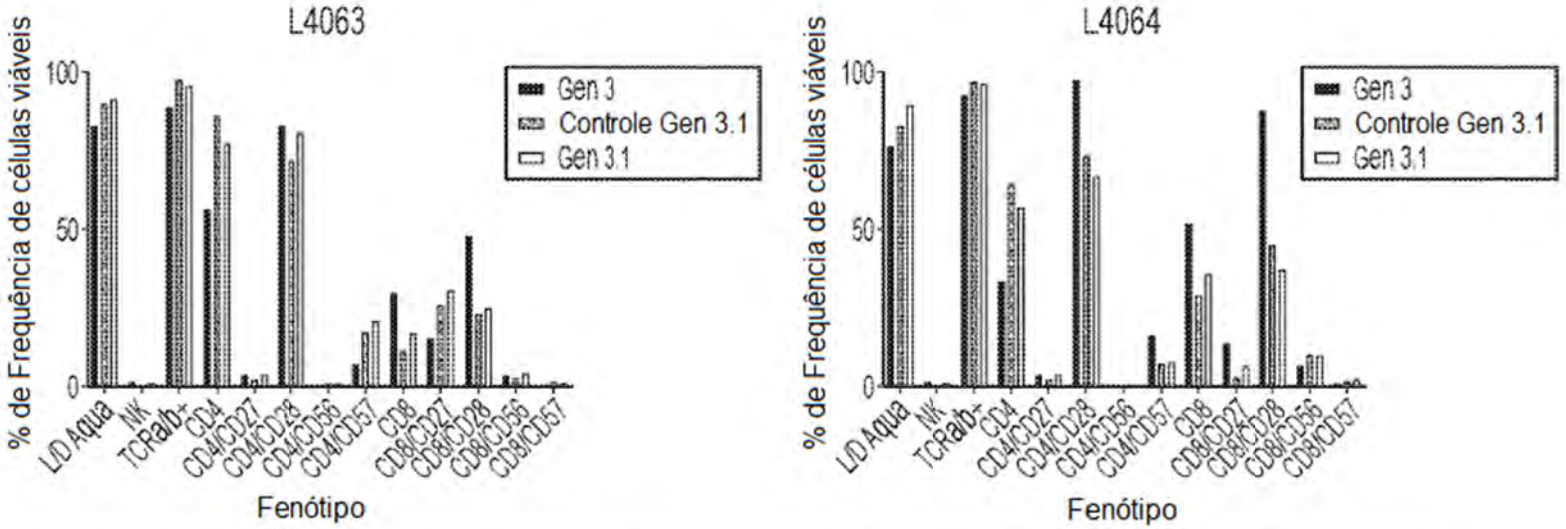
Processo	Gen 3	Gen 3.1 control	Gen 3.1
L4063	Meio padrão	Meio padrão	Meio padrão
L4064	Meio definido	Meio definido	Meio definido

Meio padrão:
Pré-REP: CM1
Iniciação de REP : CM2
Dividir ou Aumentar escala : CM4

Meio definido:
Otimizador de CTS (Meio livre de soro) em cada dia do processo

FIG. 35

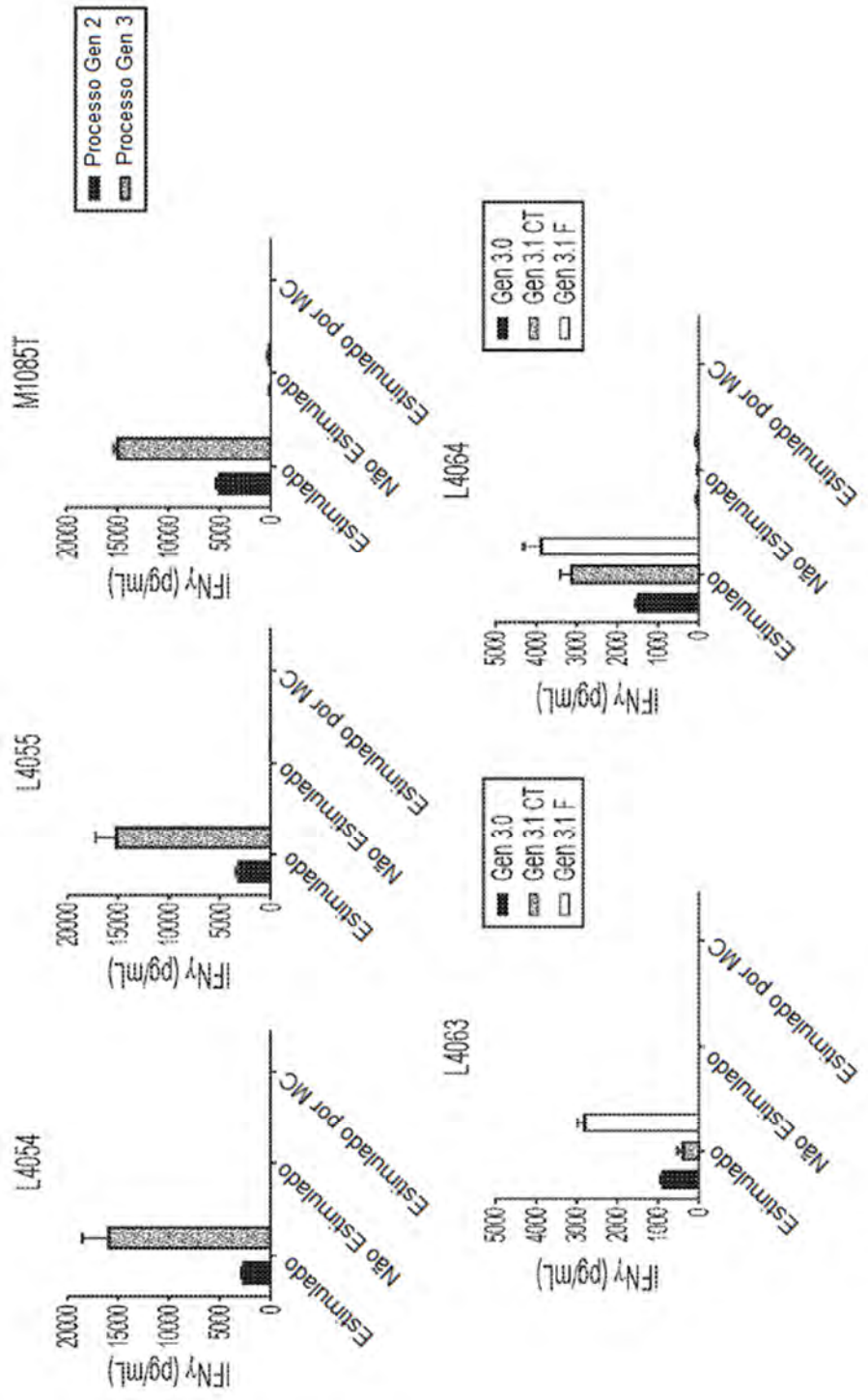
Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 662/745



ID de Tumor	Meio padrão L4063			Meio definido L4064		
Processo	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1
Nº de Fragmentos	53	53	53	21	21	21

ID de Tumor	L4063 em Meio Padrão			L4064 em Meio otimizador CTS		
Processo	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1 Teste	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1 Teste
Número de fragmentos	53	53	53	21	21	21
TVC Médio por fragmento	1,37E+08	3,19E+08	3,53E+08	5,90E+08	7,57E+08	9,29E+08
% De Viabilidade na Coleta	79,53%	89,43%	94,80%	88,80%	81,90%	84,90%
Coleta de TVC	**7,26E+09**	**1,69E+10**	**1,87E+10 ***	**1,24E+10**	**1,59E+10**	**1,95E+10 ***

FIG. 36



Meio padrão L4063:

Meio definido L4064

Dia do Processo	Condições	Gen 3.0	Gen 3.1 CT (controle)	Gen 3.1 F
Dia 0- iniciação pré-REP	Meio CM1	500 ml	500 ml	500 ml
	IL-2 (6000 IU/ml)	+	+	+
	OKT-3 (30 ng/ml)	-	+	+
	Alimentadoras (250 E+06)	-	-	+

FIG. 37

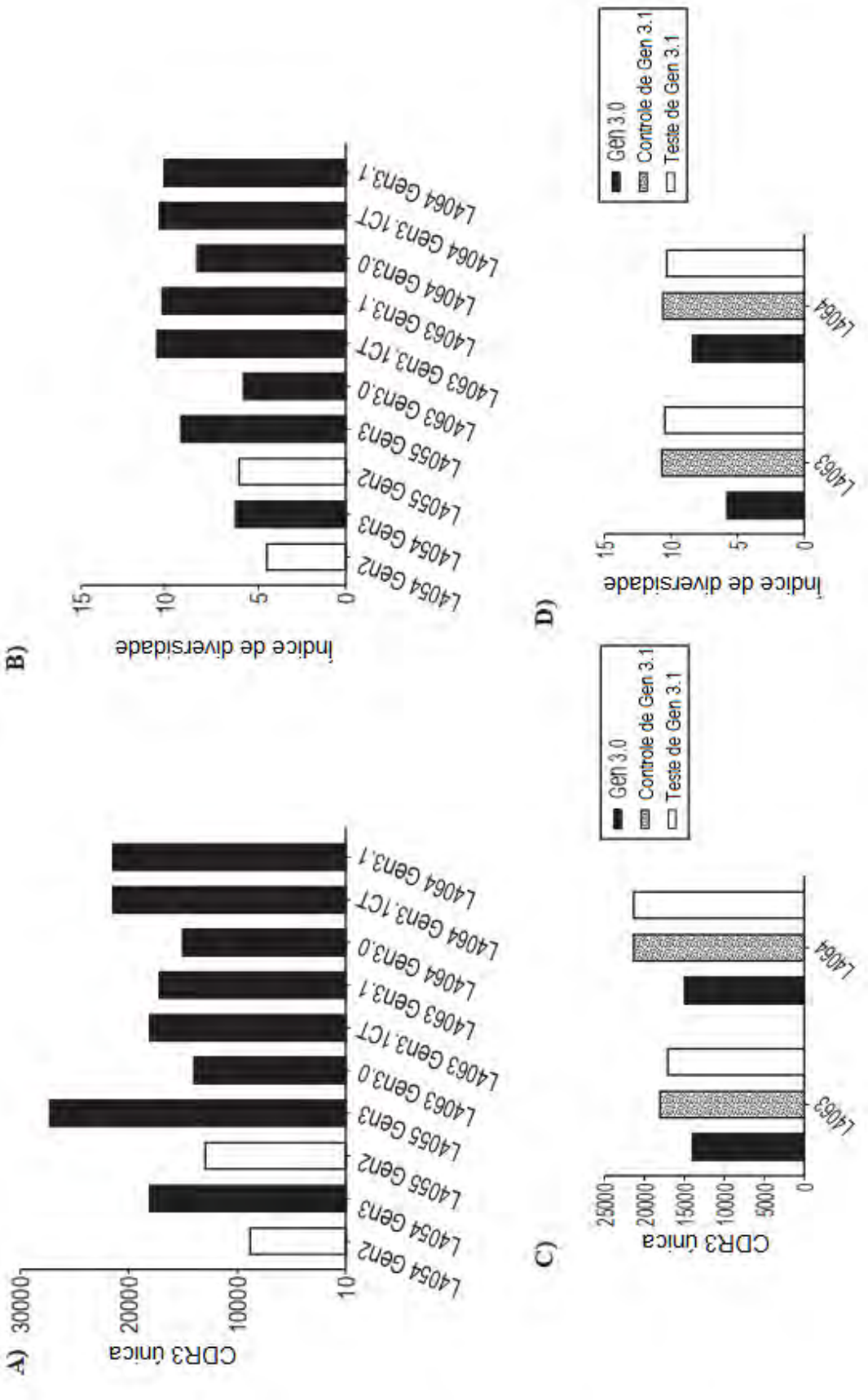

A)
CDR3 única
30000
20000
10000
10
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1
B)
Índice de diversidade
15
10
5
0
C)
Gen 3.0
Controle de Gen 3.1
Teste de Gen 3.1
25000
20000
15000
10000
5000
0
L4063
L4064
D)
Gen 3.0
Controle de Gen 3.1
Teste de Gen 3.1
Índice de diversidade
15
10
5
0
L4063
L4064

FIG. 38

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 665/745

Condições no Dia 0	Gen 3.0	Gen 3.1 (controle)	Gen 3.1
Meios	500 ml	500 ml	500 ml
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/ml)	-	+	+
Alimentadoras (250 E+06)	-	-	+

Número de uCDR3 (% de Sobre-posição)	Todas as uCDR3s			Topo 80% de uCDR3s		
	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Controle Gen 3.1	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

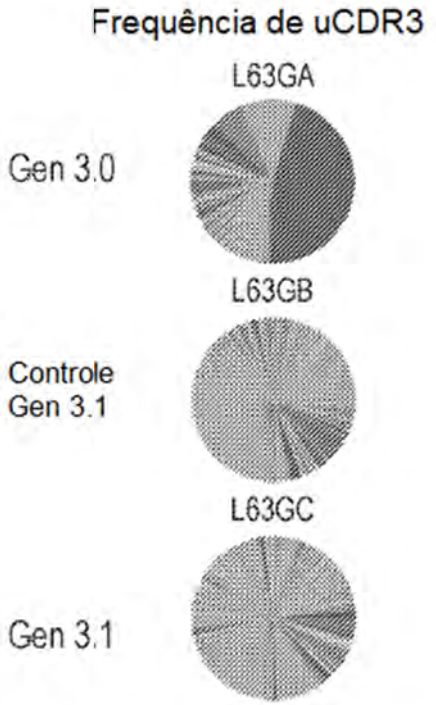


FIG. 39

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 666/745

Condições no Dia 0	Gen 3.0	Gen 3.1 (controle)	Gen 3.1
Meios	500 ml	500 ml	500 ml
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/ml)	-	+	+
Alimentadoras (250 E+06)	-	-	+

Número de uCDR3 (% de Sobre-posição)	Todas as uCDR3s			Topo 80% de uCDR3s		
	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.0	Controle Gen 3.1	Gen 3.1
Gen 3.0	15107	5486 (36)	5541 (37)	2479	2186 (88)	2163 (87)
Controle Gen 3.1	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3264

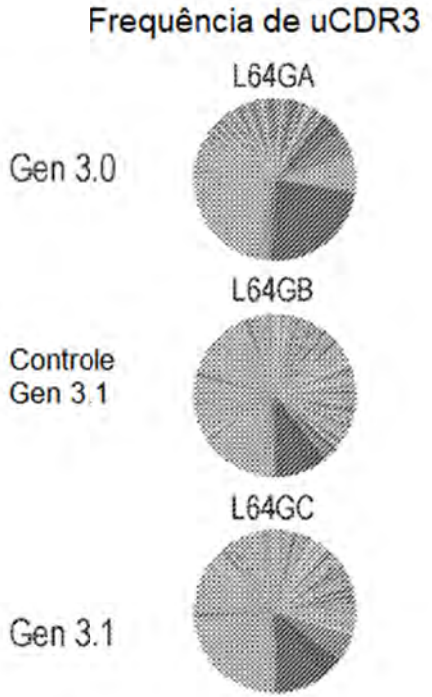


FIG. 40

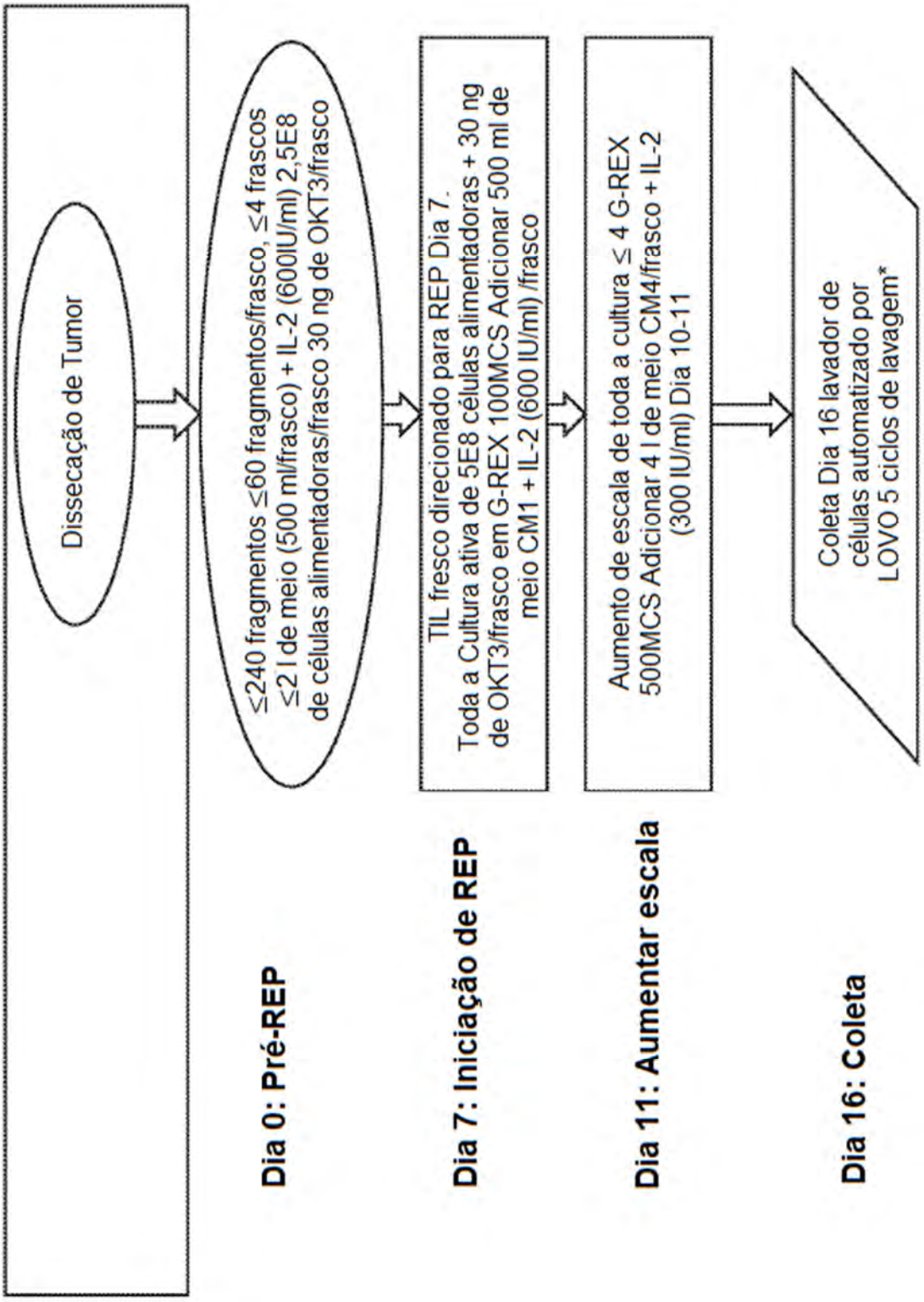

Dissecação de Tumor
≤240 fragmentos ≤60 fragmentos/frasco, ≤4 frascos
≤2 l de meio (500 ml/frasco) + IL-2 (600IU/ml) 2,5E8
de células alimentadoras/frasco 30 ng de OKT3/frasco
Dia 0: Pré-REP
TIL fresco direcionado para REP Dia 7.
Toda a Cultura ativa de 5E8 células alimentadoras + 30 ng
de OKT3/frasco em G-REX 100MCS Adicionar 500 ml de
meio CM1 + IL-2 (600 IU/ml) /frasco
Dia 7: Iniciação de REP
Aumento de escala de toda a cultura ≤ 4 G-REX
500MCS Adicionar 4 l de meio CM4/frasco + IL-2
(300 IU/ml) Dia 10-11
Dia 11: Aumentar escala
Coleta Dia 16 lavador de
células automatizado por
LOVO 5 ciclos de lavagem*
Dia 16: Coleta

FIG. 41

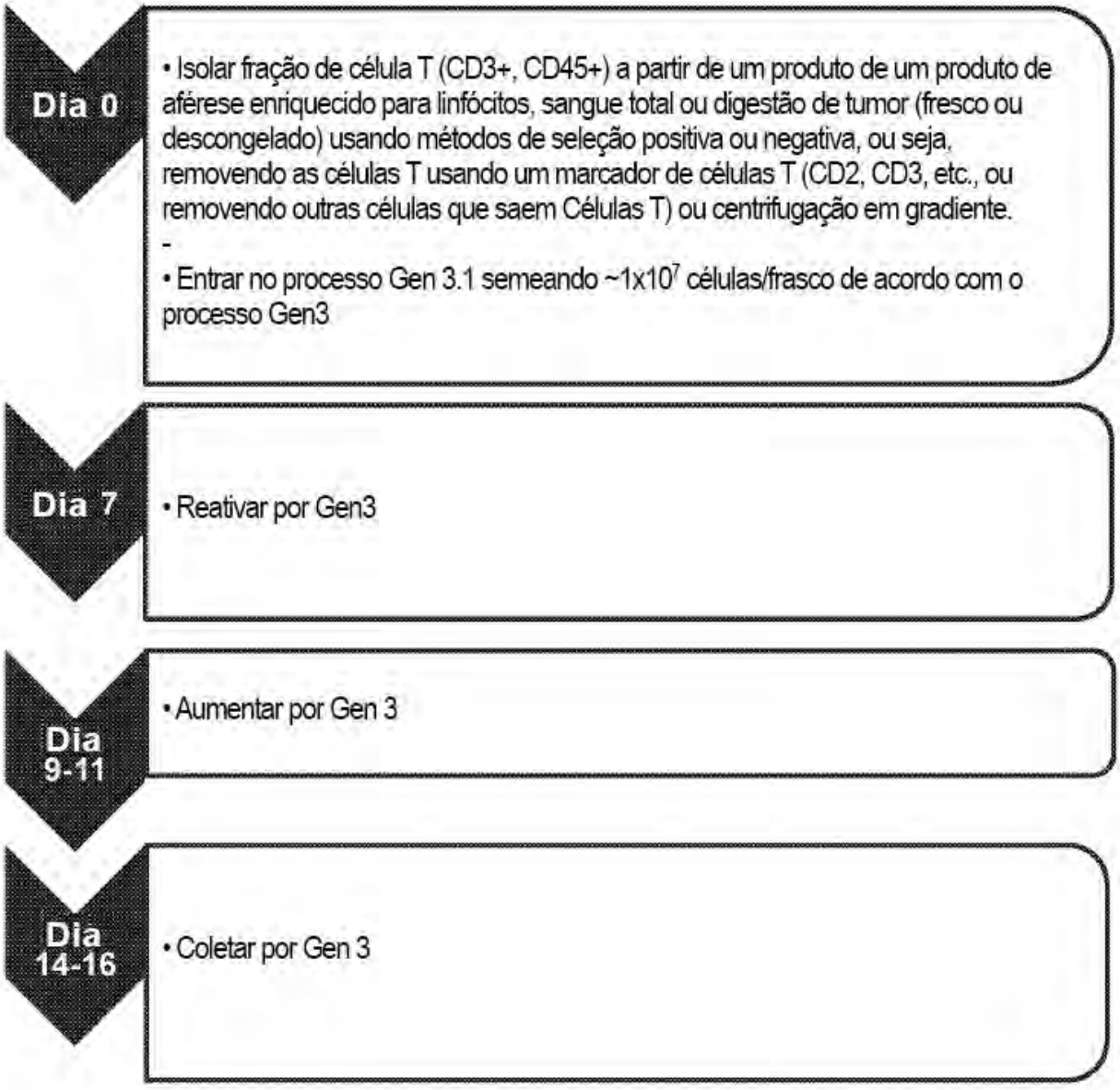

Dia 0
• Isolar fração de célula T (CD3+, CD45+) a partir de um produto de um produto de aférese enriquecido para linfócitos, sangue total ou digestão de tumor (fresco ou descongelado) usando métodos de seleção positiva ou negativa, ou seja, removendo as células T usando um marcador de células T (CD2, CD3, etc., ou removendo outras células que saem Células T) ou centrifugação em gradiente.
-
• Entrar no processo Gen 3.1 semeando ~1x10^7 células/frasco de acordo com o processo Gen3
Dia 7
• Reativar por Gen3
Dia 9-11
• Aumentar por Gen 3
Dia 14-16
• Coletar por Gen 3

FIG. 42

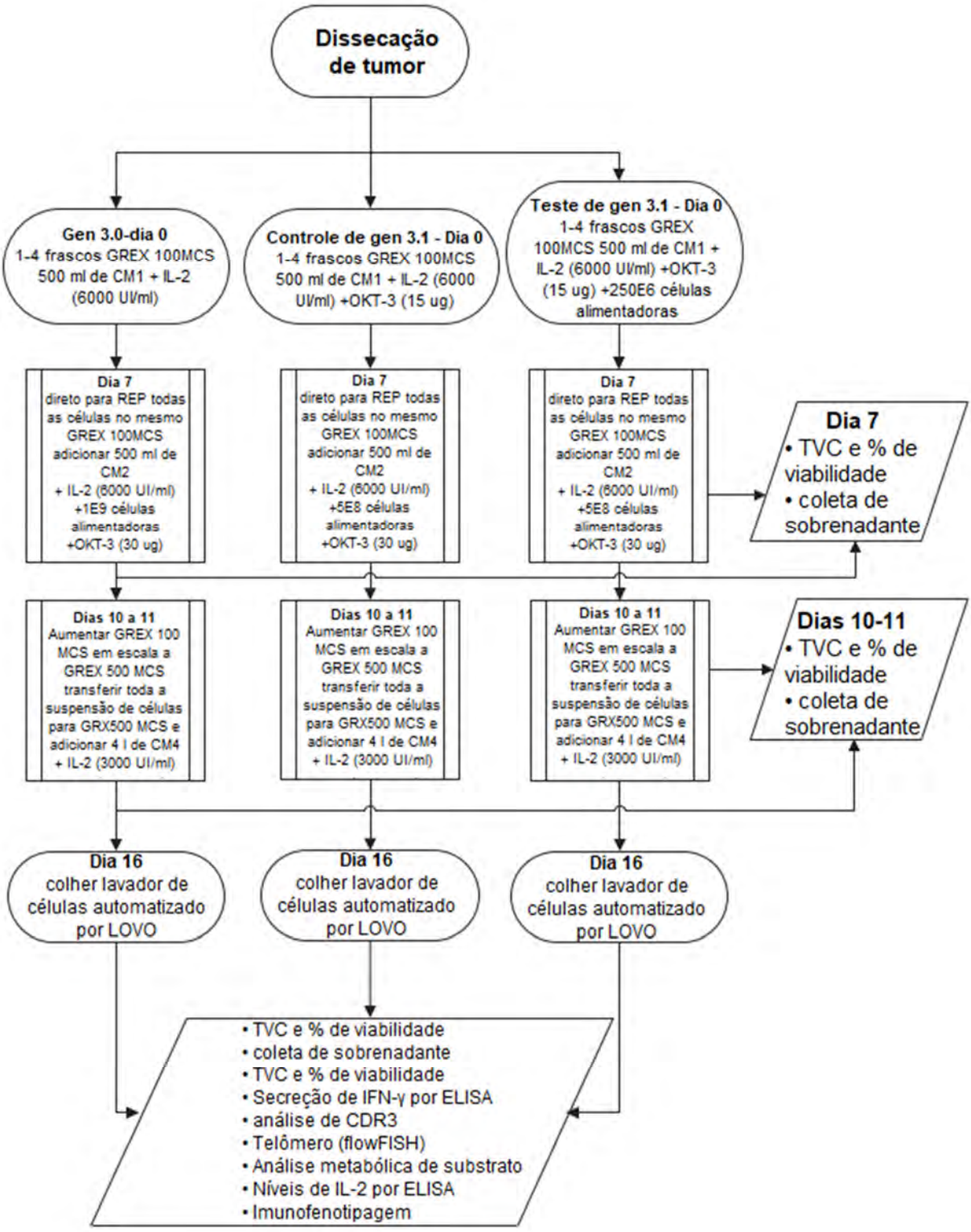

Dissecação de tumor
Gen 3.0-dia 0
1-4 frascos GREX 100MCS 500 ml de CM1 + IL-2 (6000 UI/ml)
Controle de gen 3.1 - Dia 0
1-4 frascos GREX 100MCS 500 ml de CM1 + IL-2 (6000 UI/ml) +OKT-3 (15 ug)
Teste de gen 3.1 - Dia 0
1-4 frascos GREX 100MCS 500 ml de CM1 + IL-2 (6000 UI/ml) +OKT-3 (15 ug) +250E6 células alimentadoras
Dia 7
direto para REP todas as células no mesmo GREX 100MCS adicionar 500 ml de CM2 + IL-2 (6000 UI/ml) +1E9 células alimentadoras +OKT-3 (30 ug)
Dia 7
direto para REP todas as células no mesmo GREX 100MCS adicionar 500 ml de CM2 + IL-2 (6000 UI/ml) +5E8 células alimentadoras +OKT-3 (30 ug)
Dia 7
direto para REP todas as células no mesmo GREX 100MCS adicionar 500 ml de CM2 + IL-2 (6000 UI/ml) +5E8 células alimentadoras +OKT-3 (30 ug)
Dia 7
• TVC e % de viabilidade
• coleta de sobrenadante
Dias 10 a 11
Aumentar GREX 100 MCS em escala a GREX 500 MCS transferir toda a suspensão de células para GRX500 MCS e adicionar 4 l de CM4 + IL-2 (3000 UI/ml)
Dias 10 a 11
Aumentar GREX 100 MCS em escala a GREX 500 MCS transferir toda a suspensão de células para GRX500 MCS e adicionar 4 l de CM4 + IL-2 (3000 UI/ml)
Dias 10 a 11
Aumentar GREX 100 MCS em escala a GREX 500 MCS transferir toda a suspensão de células para GRX500 MCS e adicionar 4 l de CM4 + IL-2 (3000 UI/ml)
Dias 10-11
• TVC e % de viabilidade
• coleta de sobrenadante
Dia 16
colher lavador de células automatizado por LOVO
Dia 16
colher lavador de células automatizado por LOVO
Dia 16
colher lavador de células automatizado por LOVO
• TVC e % de viabilidade
• coleta de sobrenadante
• TVC e % de viabilidade
• Secreção de IFN-γ por ELISA
• análise de CDR3
• Telômero (flowFISH)
• Análise metabólica de substrato
• Níveis de IL-2 por ELISA
• Imunofenotipagem

FIG. 43

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 670/745

Dia de processo	Condições	Teste de Gen 3.1
	Meio CM1	**500 ml**
Dia 0- iniciação de pré-REP	**IL-2 (6000 UI/ml)**	**+**
	OKT-3 (15 ng)	**+**
	Alimentadoras (250 E*06)	**+**

Dia de processo	Condições	Teste de Gen 3.1
Dia 7- **Iniciação de REP**	**Meio CM2**	**500 ml**
	IL-2 (6000 UI/ml)	**+**
	OKT-3 (30 ng) adicionado no Dia 7	**+**
	Alimentadoras adicionadas no Dia 7	**500 E06**
	Alimentadoras totais no Dia	**750 E*06**
	Condições	**Teste de Gen 3.1**
	Transferência a partir de G-REX100MCS de suspensão de TILs para 1 G-REX 500MCS (até 3 GREX500MCS)	**Sim**
	Lavador de células automatizado por LOVO	**Sim**

Dia de processo	Condições	Teste de Gen 3.1
Dias 9-11 – Aumento de escala	Transferência a partir de G-REX100MCS de suspensão de TILs para 1 G-REX 500MCS (até 3 GREX500MCS)	**Sim**
Dia 16- Colheita	Lavador de células automatizado por LOVO	**Sim**

FIG. 44

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 671/745

ID de Tumor	L4063 em meio padrão			L4064 em meio otimizado por CTS		
Process	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Número de fragmentos	53	53	53	21	21	21
TVC média por fragmento	1,37E+08	3,19E+08	3,53E+08	5,90E+08	7,57E+08	9,29E+08
% de viabilidade na colheita	79,53%	89,43%	94,80%	88,80%	81,90%	84,90%
TVC de colheita	**7,26E*09**	**1,69E+10**	**1,87E+10***	**1,24E+10**	**1,59E+10**	**1,95E+10***

FIG. 45

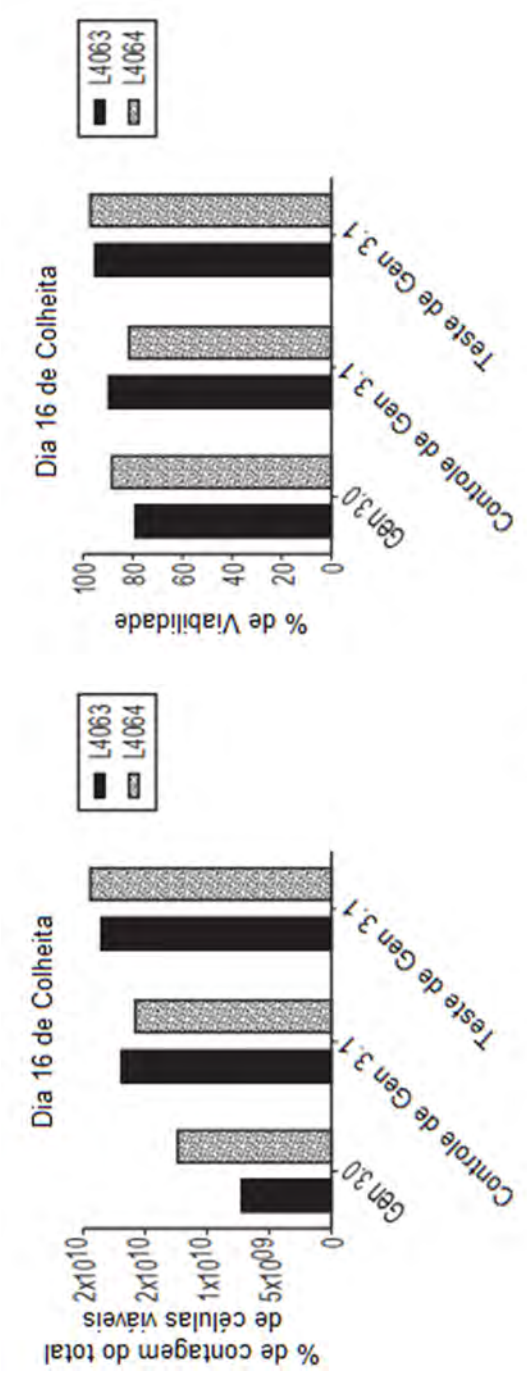
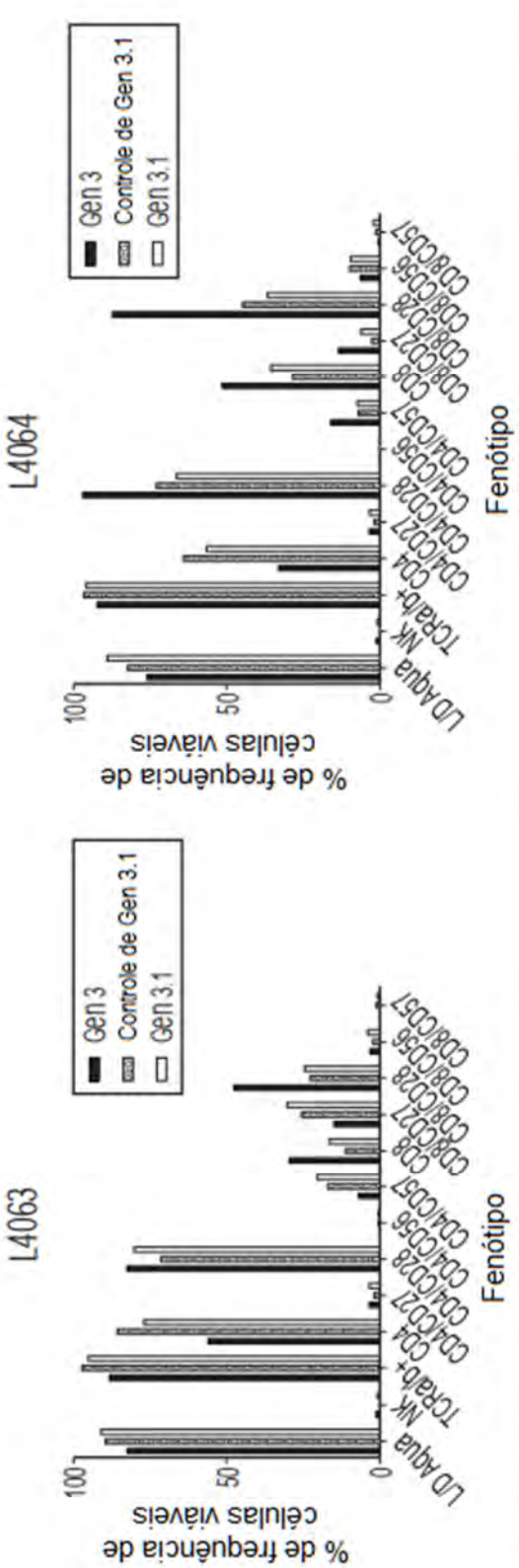

L4063
L4064
Dia 16 de Colheita
% de Viabilidade
100
80
60
40
20
0
Gen 3.0
Controle de Gen 3.1
Teste de Gen 3.1
L4063
L4064
Dia 16 de Colheita
% de contagem do total de células viáveis
2x10^10
2x10^10
1x10^10
5x10^09
0
Gen 3.0
Controle de Gen 3.1
Teste de Gen 3.1

FIG. 46



ID de Tumor	Meio padrão L4063			Meio definido L4064		
Processo	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Gen 3.1
Número de fragmentos	53	53	53	21	21	21

FIG. 47

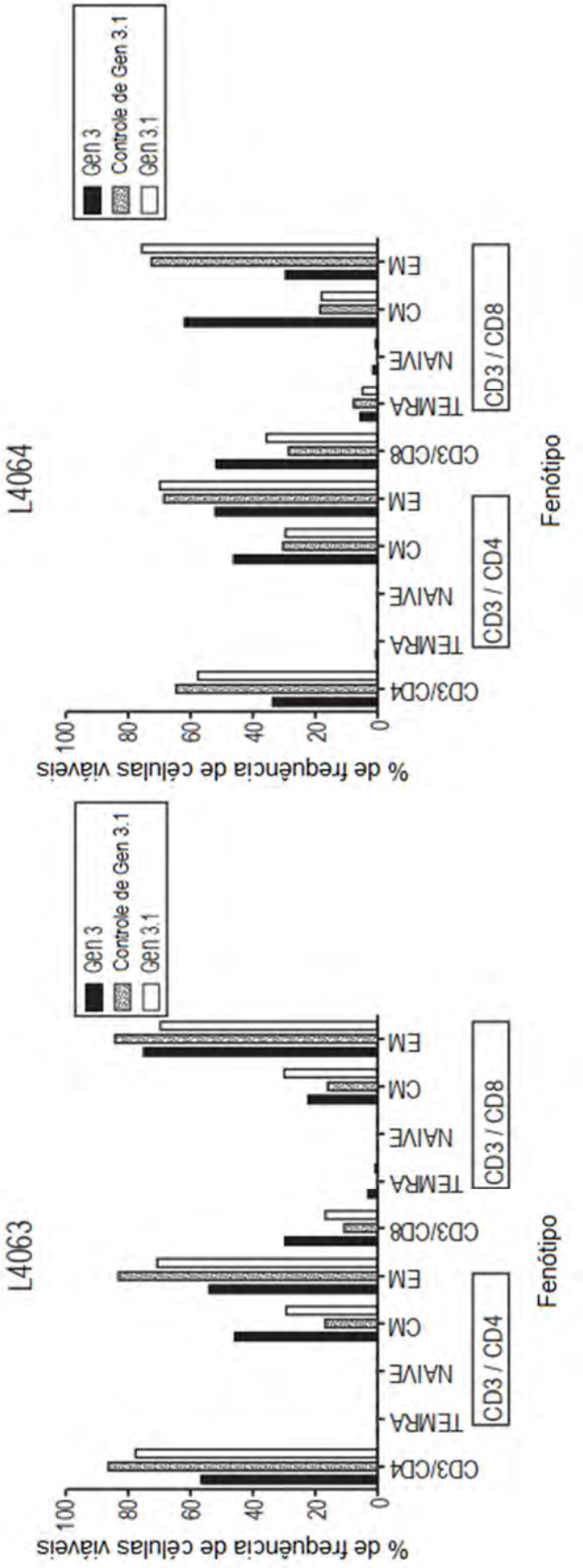

L4063
L4064
Gen 3
Controle de Gen 3.1
Gen 3.1
% de frequência de células viáveis
100
80
60
40
20
0
CD3/CD4
TEMRA
NAIVE
CM
EM
CD3/CD8
CD3 / CD4
CD3 / CD8
Fenótipo

FIG. 48

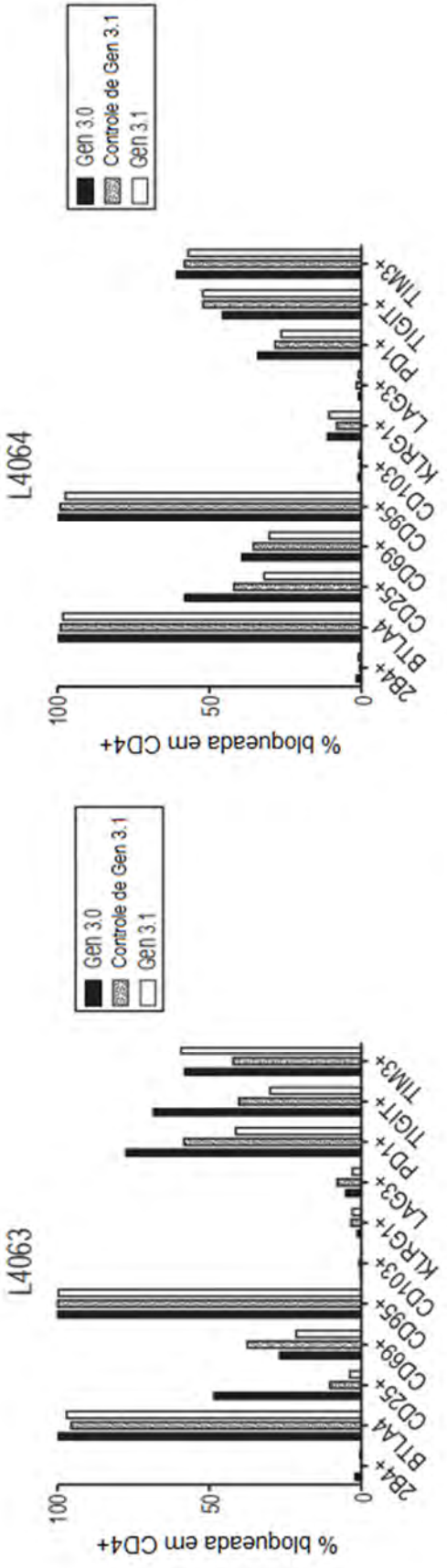

L4063
L4064
Gen 3.0
Controle de Gen 3.1
Gen 3.1
% bloqueada em CD4+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

FIG. 49

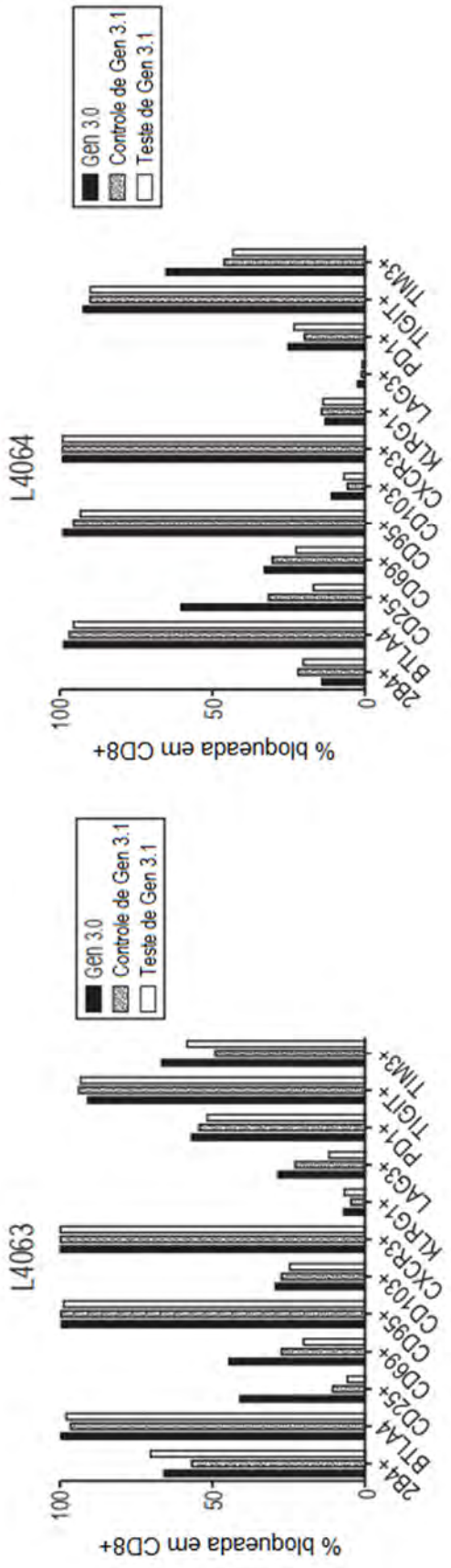
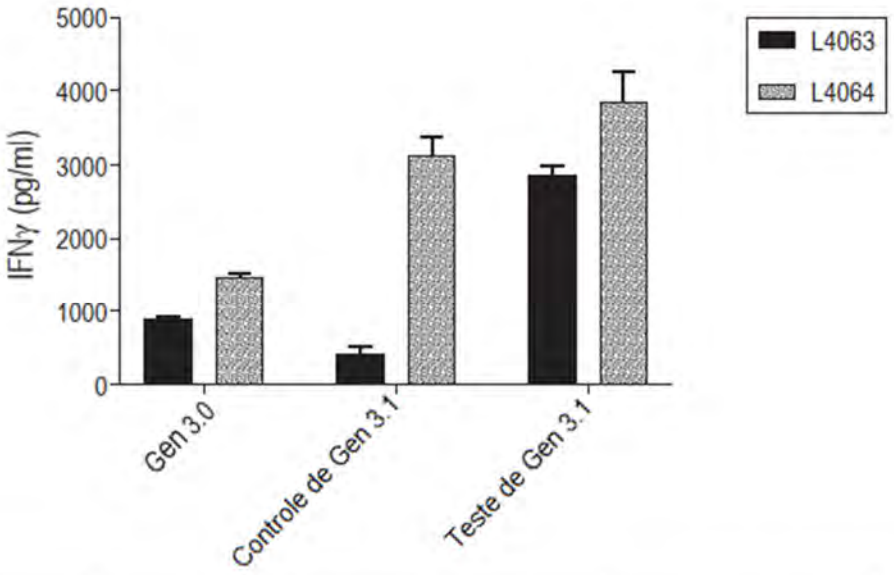
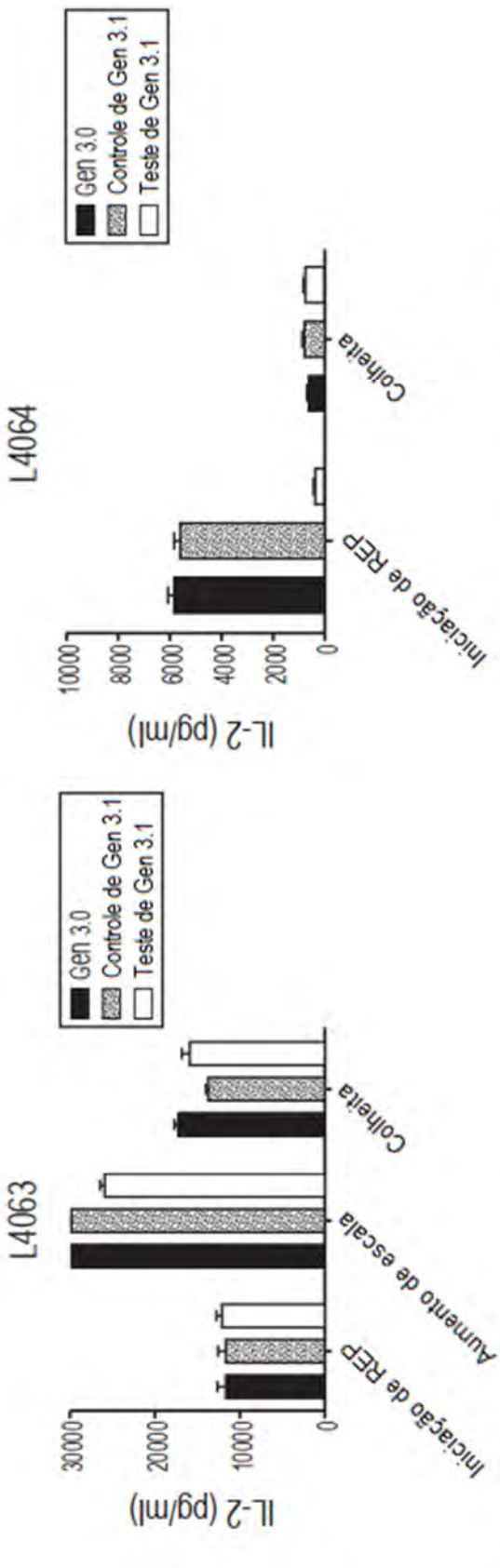

L4064
Gen 3.0
Controle de Gen 3.1
Teste de Gen 3.1
% bloqueada em CD8+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
L4063
Gen 3.0
Controle de Gen 3.1
Teste de Gen 3.1
% bloqueada em CD8+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

FIG. 50



Dia de processo	Condições	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Dia 0- iniciação de pré-REP	Meio CM1	500 ml	500 ml	500 ml
	IL-2 (6000 UI/ml)	+	+	+
	OKT-3 (30 ng/ml)	w	+	+
	Alimentadoras (250 E+06)			+

FIG. 51



L4063- meio padrão de Gen 2:

L4064- meio otimizador de CIS

*ELISA realizado com diluente AIM V

FIG. 52

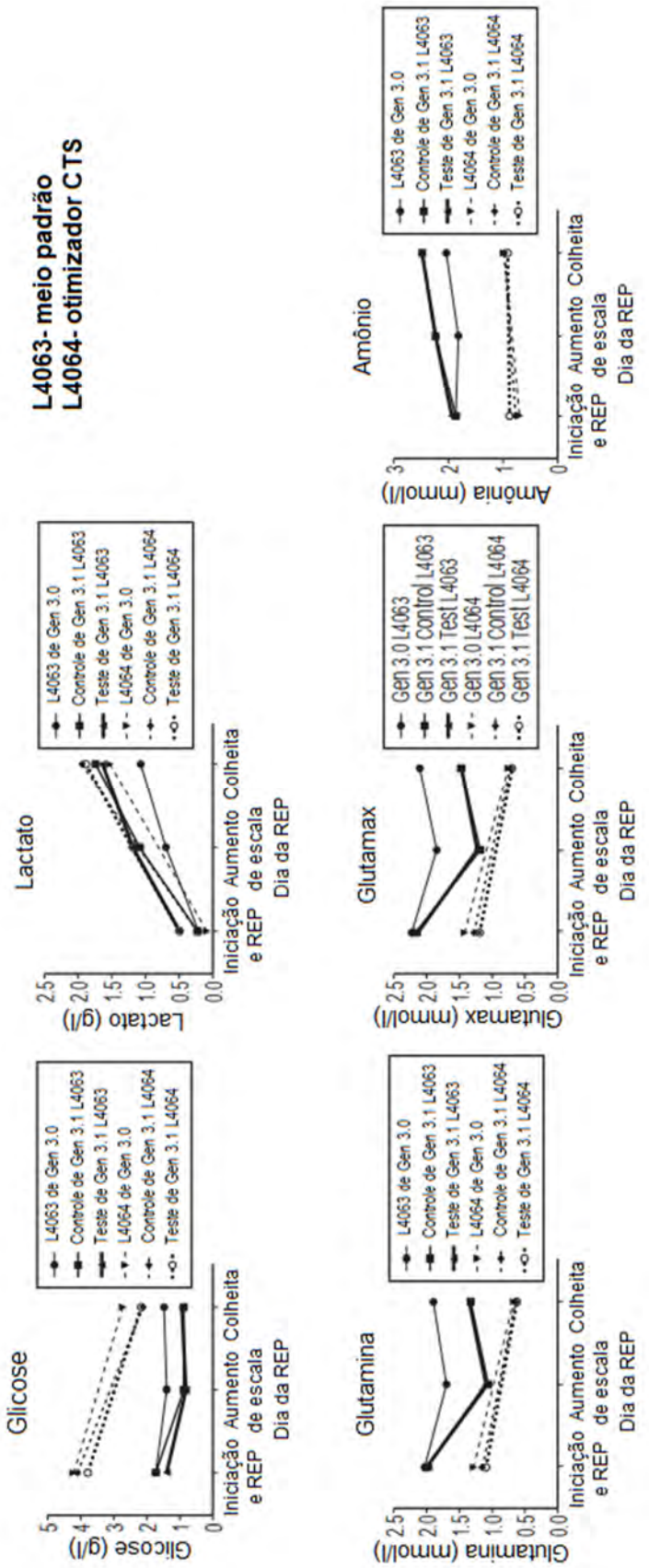

L4063- meio padrão
L4064- otimizador CTS
Glicose
Glicose (g/l)
Lactato
Lactato (g/l)
Amônio
Amônia (mmol/l)
Glutamina
Glutamina (mmol/l)
Glutamax
Glutamax (mmol/l)
L4063 de Gen 3.0
Controle de Gen 3.1 L4063
Teste de Gen 3.1 L4063
L4064 de Gen 3.0
Controle de Gen 3.1 L4064
Teste de Gen 3.1 L4064
Gen 3.0 L4063
Gen 3.1 Control L4063
Gen 3.1 Test L4063
Gen 3.0 L4064
Gen 3.1 Control L4064
Gen 3.1 Test L4064
Iniciação e REP
Aumento de escala
Colheita
Dia da REP

FIG. 53

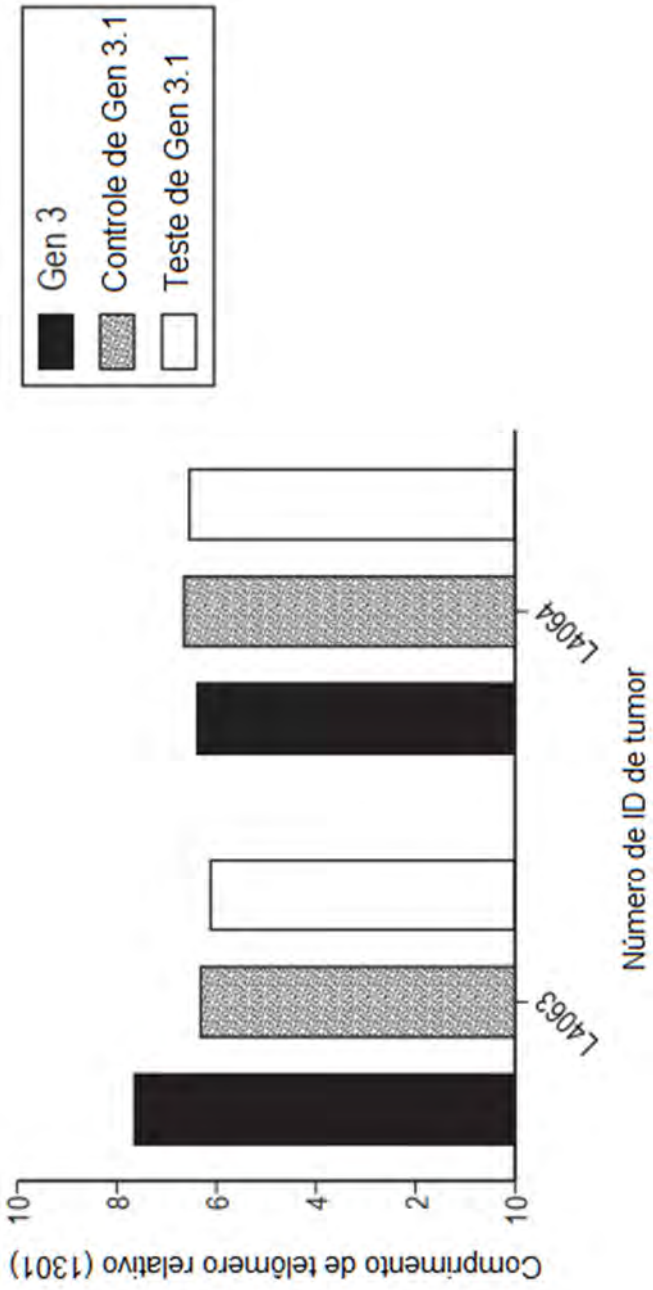

Gen 3
Controle de Gen 3.1
Teste de Gen 3.1
Comprimento de telômero relativo (1301)
10
8
6
4
2
0
L4063
L4064
Número de ID de tumor

FIG. 54

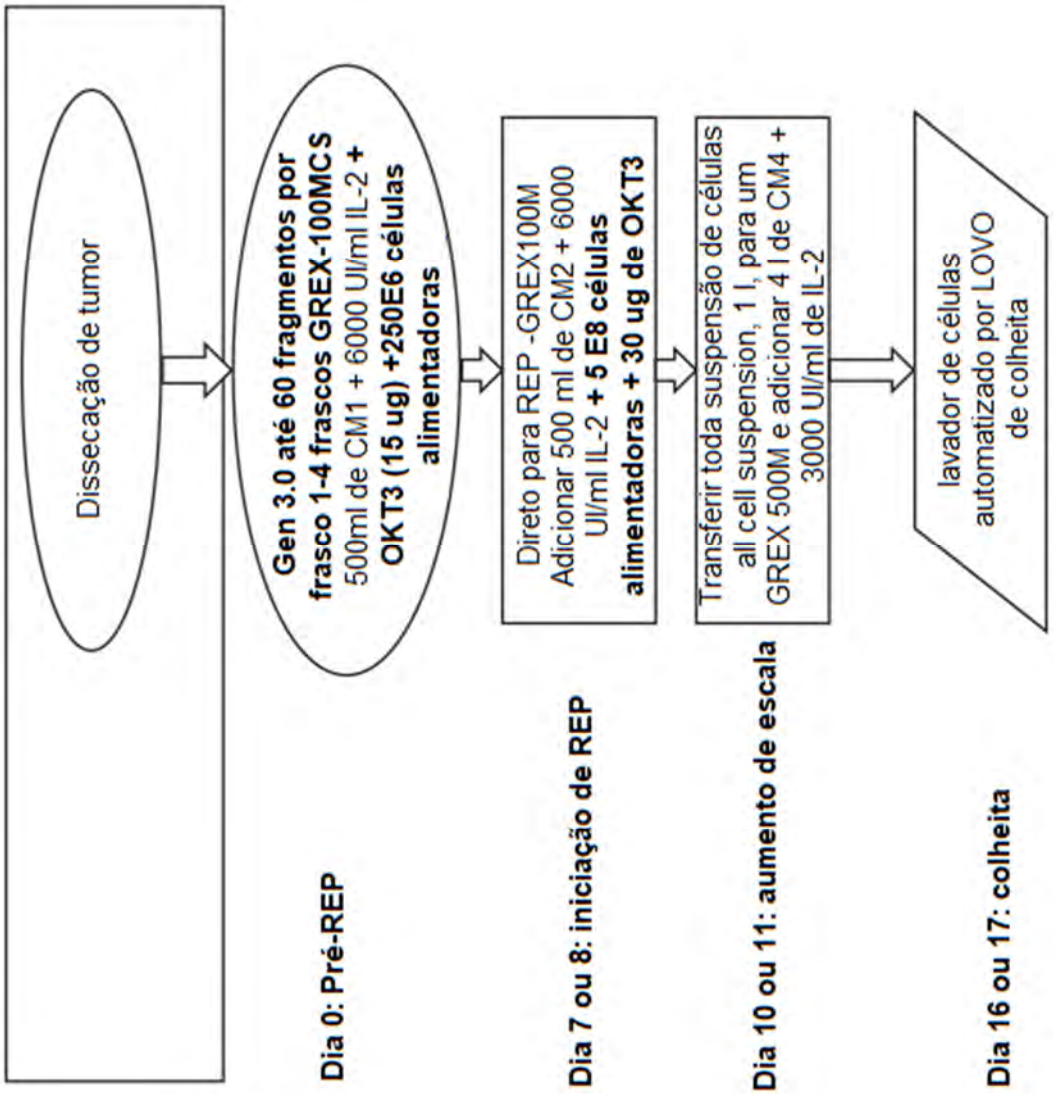

Dissecação de tumor
Gen 3.0 até 60 fragmentos por frasco 1-4 frascos GREX-100MCS
500ml de CM1 + 6000 UI/ml IL-2 + OKT3 (15 ug) +250E6 células alimentadoras
Direto para REP -GREX100M
Adicionar 500 ml de CM2 + 6000 UI/ml IL-2 + 5 E8 células alimentadoras + 30 ug de OKT3
Transferir toda suspensão de células all cell suspension, 1 l, para um GREX 500M e adicionar 4 l de CM4 + 3000 UI/ml de IL-2
lavador de células automatizado por LOVO de colheita
Dia 0: Pré-REP
Dia 7 ou 8: iniciação de REP
Dia 10 ou 11: aumento de escala
Dia 16 ou 17: colheita

FIG. 55

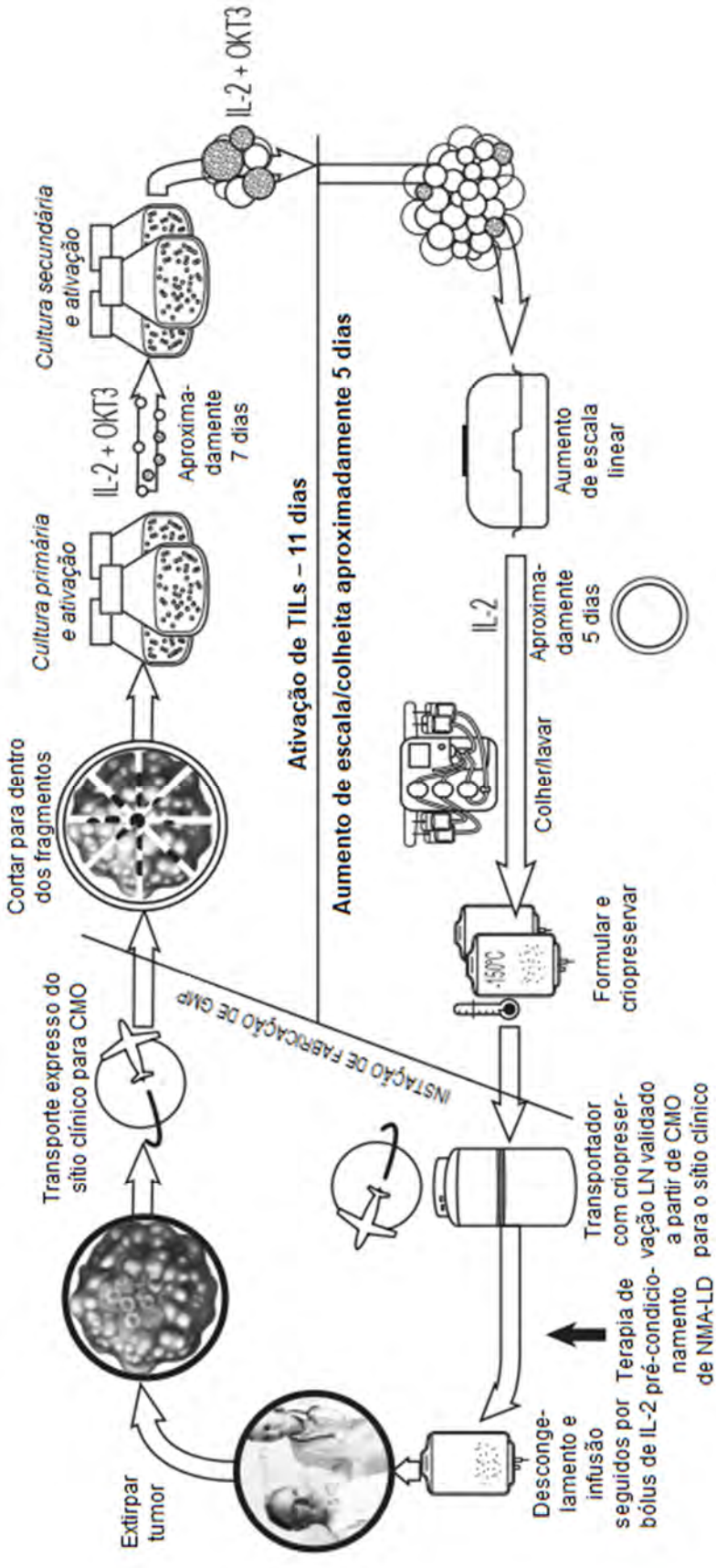

Extirpar tumor
Desconge-lamento e infusão
seguidos por bólus de IL-2
Terapia de pré-condicio-namento de NMA-LD
Transportador com criopreser-vação LN validado a partir de CMO para o sítio clínico
Formular e criopreservar
-150°C
Colher/lavar
IL-2
Aproxima-damente 5 dias
Aumento de escala linear
Aproxima-damente 7 dias
IL-2 + OKT3
Cultura secundária e ativação
IL-2 + OKT3
Cultura primária e ativação
Cortar para dentro dos fragmentos
Transporte expresso do sítio clínico para CMO
INSTAÇÃO DE FABRICAÇÃO DE GMP
Ativação de TILs – 11 dias
Aumento de escala/colheita aproximadamente 5 dias

FIG. 56

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 683/745

	Gen 2	Gen 3
Tempo de Cultura Total	22d	16-17d
Pré-REP		
Fragmentos/frasco	=60 fragmentos em 1 frasco	=60 fragmentos/frasco em até 4 frascos
Volume de meio	1 l – adição único	1 l- 2 x adições de 500 ml
Números de células pré-REP alvo	=200e6TIL	Todas as células carregadas ao longo do processo contínuo
Triagem	Sem triagem	Sem triagem
Seleção de frascos	Sem seleção	Esterilidade Bac-T, inspeção visual para contaminantes
REP/Aumento de escala		
Alimentadoras		Reduzida em = 40%
Meio	Contém HSAB	Definidos
Aumento de escala	cultura em pool Redução de volume para 500 ml no Dia 5 dividido em até 5 frascos (2500 cm2)	Frascos aumentados em escala linearmente e tratados como subcomponentes
OKT3	150 uq	=180 ug na escala máxima
IL2	Dose alta	Dose alta
Número de frascos	1-5	1-4
Redução de volume de colheita	Fechou 10:1	Fechou 10:1
Concentrado/Lavagem	LOV0100:1	LOVO 1000:1
Formulação	1:1 CS10(DMSO a 5%)	1:1 CS10(DMSO a 5%)
Transporte	LN em fase de vapor	LN em fase de vapor
Infusão	IV de gravidade descongelada	IV de gravidade descongelada

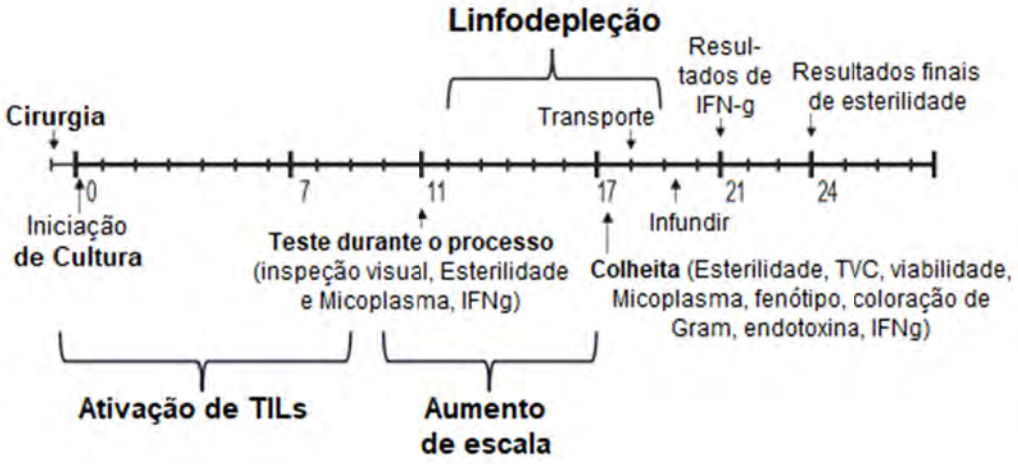
FIG. 57A

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 684/745

	Gen 2	Gen 3
Tempo de Cultura Total	22d	16
Fragment Culture		
Fragmentos/frasco	<60 fragmentos em 1 frasco	≤60 fragmentos/frasco em até 14 frascos
Volume de meio	1 l – adição único	1 l - 2 x adições de 500 ml
Números de células pré-REP alvo	≤200e6TIL	Todas as células carregadas ao longo do processo contínuo
Triagem	Sem triagem	Sem triagem
Seleção de frascos	Sem seleção	Esterilidade Bac-T, inspeção visual para contaminantes
REP/Aumento de escala		
Alimentadoras		Reduzida em ≥ 40%
Meio	Contém HSAB	Definidos
Aumento de escala	cultura em pool Redução de volume para 500 ml no Dia 5 dividido em até 5 frascos (2500 cm2)	Frascos aumentados em escala linearmente e tratados como subcomponentes
0KT3	150ug	≤180 ug na escala máxima
IL2	Dose alta	Dose alta
Número de frascos	1-5	1-4
Redução de volume de colheita	Fechou 10:1	Fechou 10:1
Concentrado/Lavagem	LOVO 100:1	LOVO 1000:1
Formulação	1:1 CS10 (DMSO a 5%)	1:1 CS10 (DMSO a 5%)
Transporte	LN em fase de vapor	LN em fase de vapor
Infusão	IV de gravidade descongelada	IV de gravidade descongelada

FIG. 57B

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 685/745



LD em:
Viabilidade nos Dias 10-11
Fenótipo nos Dias 10-11
mycoplasma nos Dias 10-11
IFNg* nos Dias 10-11

Liberar para infusão em:
Coloração de Gram
Esterilidade nos Dias 10-11
Micoplasma nos Dias 16-17
Endotoxina nos Dias 16-17
Fenotipagem nos Dias 16-17
Contagem TVC nos Dias 16-17
Viabilidade nos Dias 16-17

Liberação final (CoA)
IFNg Congelado/Descongelado (ELISA) nos Dias 16-17
Endoxina nos Dias 16-17
Fenotipagem nos Dias 16-17
Contagem TVC nos Dias 16-17
Viabilidade nos Dias 16-17
Esterilidade nos Dias 16-17

***Reestimulação para ELISA nos Dias 10-11 ocorrerá a partir de uma amostra em processamento fresca/congelada relatável no Dia 14**

FIG. 58

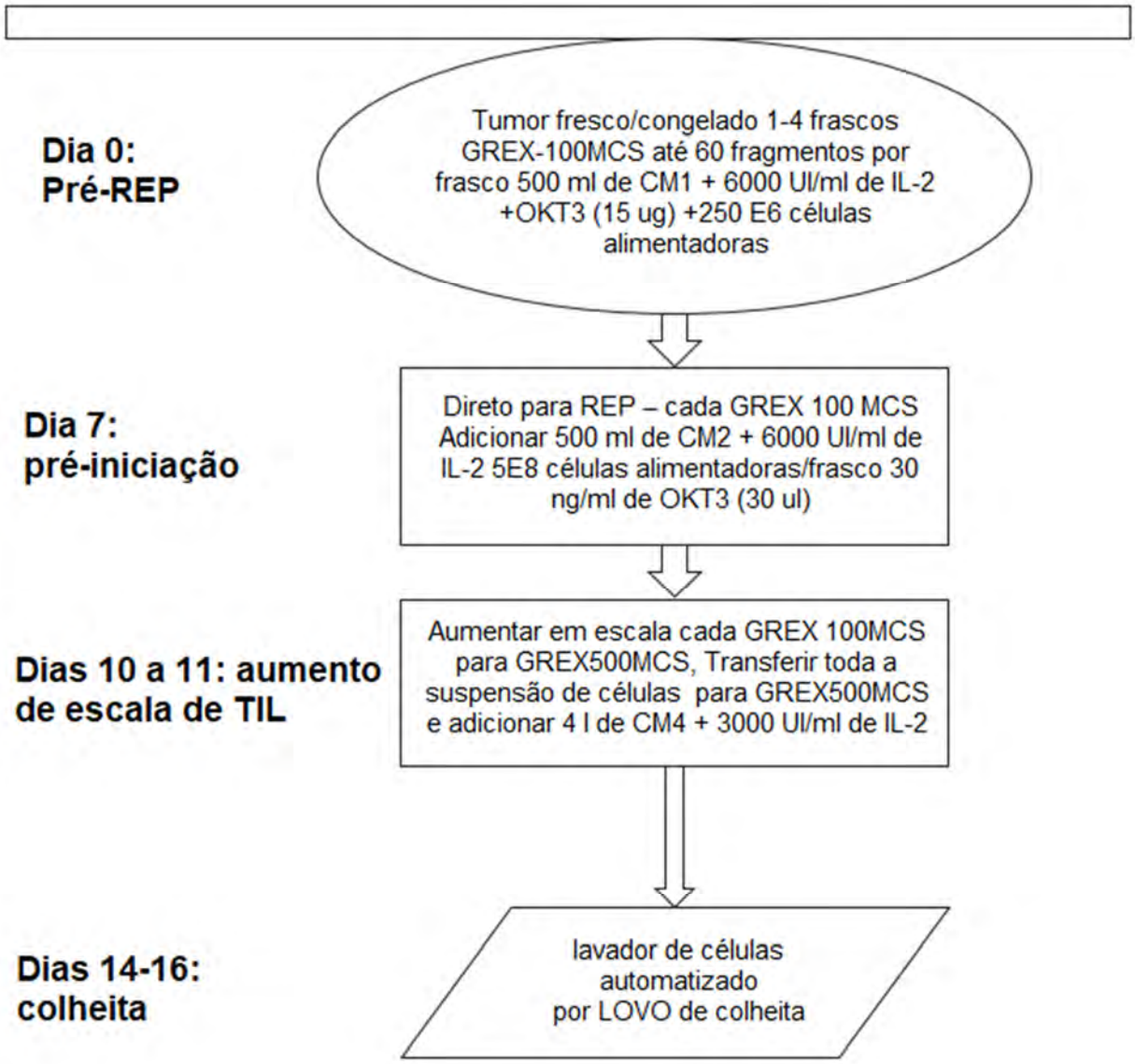

Dia 0:
Pré-REP
Tumor fresco/congelado 1-4 frascos GREX-100MCS até 60 fragmentos por frasco 500 ml de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2 +OKT3 (15 ug) +250 E6 células alimentadoras
Dia 7:
pré-iniciação
Direto para REP – cada GREX 100 MCS Adicionar 500 ml de CM2 + 6000 UI/ml de IL-2 5E8 células alimentadoras/frasco 30 ng/ml de OKT3 (30 ul)
Dias 10 a 11: aumento de escala de TIL
Aumentar em escala cada GREX 100MCS para GREX500MCS, Transferir toda a suspensão de células para GREX500MCS e adicionar 4 l de CM4 + 3000 UI/ml de IL-2
Dias 14-16:
colheita
lavador de células automatizado por LOVO de colheita

FIG. 59

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 687/745

Resumo de dados dos testes nos Dias 16/17

Parâmetro do teste	1ª rodada de engenharia no Dia 17 10 de março de 2019	2ª rodada de engenharia no Dia 17 11 de março 2019	3ª rodada de engenharia do Dia 17 25 de março 2019	Gen2 (n = 47)		
				Média	Mediana	Desvio Padrão
TVC Pré-LOVO	17,3E+09	46,1E+09				
% de viabilidade de Pré-LOVO	90,5%	94,3%				
TVC Pós-LOVO	17,9E+09	59,4E+09	48,2E+09			
% de viabilidade Pós-LOVO	85,3%	90,7%	89%			
% de recuperação de TVC Pós-LOVO	103,5%	128,9%				
% de CD45+/CD3+	88,0%	98,3%				
IFNγ (pg/ml)	11,618	19,235		10,005	9,637	5,128
GrzB (pg/ml)	11,326	27,441		19,929	16,040	
Esterilidade	Pendente (*)	Pendente (*)				
Endotoxina (Total de unidades EU)	154,2 EU	195,9 EU				
Micoplasma	Negativo	Negativo				
Coloração de Gram	Nenhum organismo detectado	Nenhum organismo detectado				

FIG. 60

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 688/745

**Vai até toda a amostra de TILs (100% viva, CD14-, com a exceção dos monócitos)*

Característica	Rodada de engenharia número 1	Rodada de engenharia número 2
Células NK (CD3-CD56+) (%)	10,9	1,5
Células B (CD3-CD19+)(%)	0,2	0,2
Monócitos (CD14+) (%)	0,0	0,0
TCRαβ(%)	87,1	96,3
TCRγδ(%)	1,2	1,6
Soma	99,4	99,6

**Vai até 100% de TCRab*

Característica	Rodada de engenharia número 1	Rodada de engenharia número 2
Virgem: CCR7+CD45RA+ (%)	0,0	0,1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	92,2	84,4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	7,7	15,5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0,1	0,1
Soma	100,0	100,0

**Vai até 100% viva, CD14-*

Característica	Rodada de engenharia número 1	Rodada de engenharia número 2
TCRαβ+CD4+(%)	89,6	71,8
TCRαβ+CD8+(%)	10,0	27,8
Soma	99,6	99,6

FIG. 61

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 689/745

** Vai até toda a amostra de TILs (100% viva, CD14-, com a exceção de monócitos)*

Característica	Execução de PD nº 1 L4063	Execução de PD nº 214064
Células NK (CD3-CD56+) (%)	1,04	0,52
Células B (CD3-CD19+)(%)	0,0076	0,013
Monócitos (CD14+) (%)	0,032	0,043
TCRαβ (%)	95,5	96,7
TCRγ6(%)	2	1,86
Soma	98,6	99,14

**Vai até 100% de TCRab*

Característica	Execução de PD nº L4063	Execução de PD nº 214064
Virgem: CCR7+CD45RA+(%)	0,35	0,07
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	97,4	96,7
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	1,39	2,78
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0,88	0,44
Soma	100,0	100,0

Característica	Execução de PD nº L4063	Execução de PD nº 214064
TCRαβ+CD4+(%)	77,5	57,4
TCRaβ+CD8+(%)	16,8	36,1
Soma	94,3	93,5

FIG. 62

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 690/745

Característica	OV-8025			OV-8026			OV-8028			OV-8022		
	FRER*	Gen 2[Y]	Gen 3.1	FRER[Y]	Gen 2	Gen 3.1	FRER	Gen 2[Y]	Gen 3.1	FRER	Gen 2[Y]	Gen 3.1*
Pureza												
Células T (CD45+CD3+)(%)	-	-	99,2	-	75,1	97,5	97	-	97,6	53,6	16,4	-
Células NK (CD3'CD56+)(%)	-	-	0,2	-	8,4	1,1	0,4	-	0,1	44,6	81,1	-
Células B (CD3-CD19+) (%)	-	-	0	-	2,1	0	0	-	0	1,3	3,3	-
Monócitos (CD14+)(%)	-	-	0	-	0,2	0	0	-	0	2	0,1	-
Identidade de células T												
TCR αβ (%)	-	-	98,8	-	71,9	96,4	98,7	-	99,4	52,2	12,4	-
TCR γδ (%)	-	-	0,3	-	0,8	0.6	0	-	0,1	0,1	0	-
$CD3^+ CD4^+$ (%)	-	-	85,7	-	63,1	81,5	81,8	-	92,3	77,3	48,6	-
$CD3^+ CD8^+$ (%)	-	-	12	-	23	14,4	15,5	-	5,2	16,6	26,1	-
Fenótipo de memória -TCRαβ+												
Virgem: CCR7+CD45RA+(%)	-	-	0	-	0,4	0	2.1	-	0	0	0,1	-
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	-	-	98,5	-	88.7	97.5	93.6	-	97,1	89,1	93,8	-
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	-	-	1	-	7,5	0,6	1,9	-	2,5	0,1	0	-
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	-	-	0,4	-	3,4	1,8	2,4	-	0,3	10,8	6,1	-

FR ER, tumor congelado, REP anterior

*Condição não testar

[Y], amostragem de tecido, contagem TVC baixa ou sem células viáveis no descongelamento

FIG. 63

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 691/745

Característica	Hierarquia	Rodada de engenharia número 1	Rodada de engenharia número 2
Células NK (CD3-CD56+) (%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/CD3-/NK | Freq. de nulo (%)	10,9	1,5
Células B(CD3-CD19+)(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/CD19| Freq. de nulo (%)	0,2	0,2
Monócitos (CD14+) (%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14+1 Freq. de parental (%)	0,0	0,0
TCRαβ(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab|Freq. de nulo(%)	87,1	96,3
TCRγ5(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRqd | Freq. de nulo (%)	1,2	1,6
TCRaβ+CD4+(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/CD41 Freq. de parental (%)	89,6	71,8
TCRaβ+CD8+(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/CD81 Freq. de parental (%)	10,0	27,8
Virgem: CCR7+CD45RA+(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q2: CCR7+, CD45RA+1 Freq. de parental (%)	0,0	0,1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	81 /S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q4: CCR7-, CD45RA-1 Freq. de parental (%)	92,2	84,4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	81 /S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q3: CCR7+, CD45RA-1 Freq. de parental (%)	7,7	15,5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q1: CCR7-, CD45RA+1 Freq. de parental (%)	0,1	0,1
Virgem: CD62L+CD45RA+(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q6: CD62L+, CD45RA+1 Freq. de parental (%)	0,2	0,1
T-EM: CD62L-CD45RA-(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q8: CD62L-, CD45RA-1 Freq. de parental (%)	47,7	49,5
T-CM: CD62L+CD45RA-(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q7: CD62L+, CD45RA-1 Freq. de parental (%)	52,1	50,4
T-EFF/TEMRA: CD62L-CD45RA+(%)	S1/S2/Tudo/Vivo/CD14-/TCRab/Q5: CD62L-, CD45RA+1 Freq. de parental (%)	0,1	0,0

*Vai até CD3+CD45+ %

Característica	Rodada de engenharia número 1	Rodada de engenharia número 2
TCRαβ(%)	87,1	96,3
TCRγ6(%)	1,2	1,6
Soma	88,3	97,9

FIG. 64

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 692/745

Característica	Hierarquia	CD4+		CD8+	
		Rodada de engenharia número 1	Rodada de engenharia número 2	Rodada de engenharia número 1	Rodada de engenharia número 2
CD27+(%)	S1/S2/tudo/Vivo/CD14-/TCRab/CD4 ou CD8/CD4+/8+CD27+ | Freq. de parental (%)	0,7	2,0	2,1	12,7
CD28+(%)	S1/S2/tudo/Vivo/CD14-/TCRab/CD4 ou CD8/CD4+/8+CD28+ | Freq. de parental (%)	41,2	50,1	3,6	13,9
CD57+(%)	S1/S2/tudo/Vivo/CD14-/TCRab/CD4+/8+CD57+ | Freq. de parental (%)	1,0	6,9	0,1	3,7
2B4+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/btla | Freq. de parental (%)	4,5	5,5	69,1	55,7
BTLA4+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/2b4 | Freq. de parental (%)	67,5	86,1	79,6	89,1
CCR4t(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/CCR4+ | Freq. de parental (%)	94,1	93,6	84,2	96,6
CD25+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/CD25 | Freq. de parental (%)	63,1	61,0	47,5	51,8
CD69+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/CD69 | Freq. de parental (%)	47,0	22,8	45,4	25,8
CD95+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/CD95 | Freq. de parental (%)	99,2	98,1	99,1	97,6
CD103+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/CD1C3 | Freq. de parental (%)	4,2	10,7	25,0	36,9
CXCR3+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/CXCR3 Freq. de parental (%)	58,1	76,7	89,3	88,3
KLRG1+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/KLRG11 Freq. de parental (%)	0,3	8,9	3,1	35,8
LAG3+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/Lag31 Freq. de parental (%)	5,0	3,3	19,4	21,2
PD1+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/PD11 Freq. de parental (%)	29,3	22,1	11,2	7,2
TIGIT+(%)	SfS/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/Tigit | Freq. de parental (%)	68,1	53,2	74,9	65,8
TIM3+(%)	S/S/Vivo/CD3/CD4 ou CD8/TIM3 | Freq. de parental (%)	93,6	81,8	91,2	84,4

FIG. 65



Amostra	1:100 Estim./1:50 Não estim.			1:200 Estim./1:100 Não estim.			1:400 Estim./1:200 Não estim.			Média	Estim.-Não estim.	Indução de dobra
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Eng. 1 Estimulada	13001,49	16033,00	14083,24	11008,85	15254,59	12534,24	9985,83	14237,22	11669,82	13089,81	11325,97	7,42
Eng. 1 Não estimulada	2155,31	2445,64	2108,37	1727,43	1982,96	1566,52	1119,057	1611,132	1158,179	1763,84		
Eng. 1 Estimulada de controle	26491,92	31766,20	31601,13	26385,05	30852,42	29752,34	26175,43	33462,43	29728,52	29579,49	13486,52	1,84
Eng. 1 Não estimulada de controle	16209,90	16478,69	16936,51	15659,69	16385,60	17083,36	15419,07	15683,49	14980,40	16092,97		

Amostra	1:100 Estim./1:50 Não estim.			1:200 Estim./1:100 Não estim.			1:400 Estim./1:200 Não estim.			Média	Estim.-Não estim.	Indução de dobra
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Eng. 2 Estimulada	31509,54	30435,33	33822,81	27299,28	29091,87	29432,13	29027,45	30685,94	31138,70	30271,45	27441,29	10,70
Eng. 2 Não estimulada	3236,50	3442,58	3630,97	2764,12	2839,66	2892,96	2047,795	2291,994	2324,838	2830,16		
Eng. 2 Estimulada de controle	21515,93	20346,31	19425,54	18299,25	17398,91	18131,38	18825,27	18412,15	18278,94	18959,30	6189,32	1,48
Eng. 2 Não estimulada de controle	13716,23	13445,80	13563,89	12782,28	12678,37	13122,65	11898,75	11675,48	12046,29	12769,97		

FIG. 66

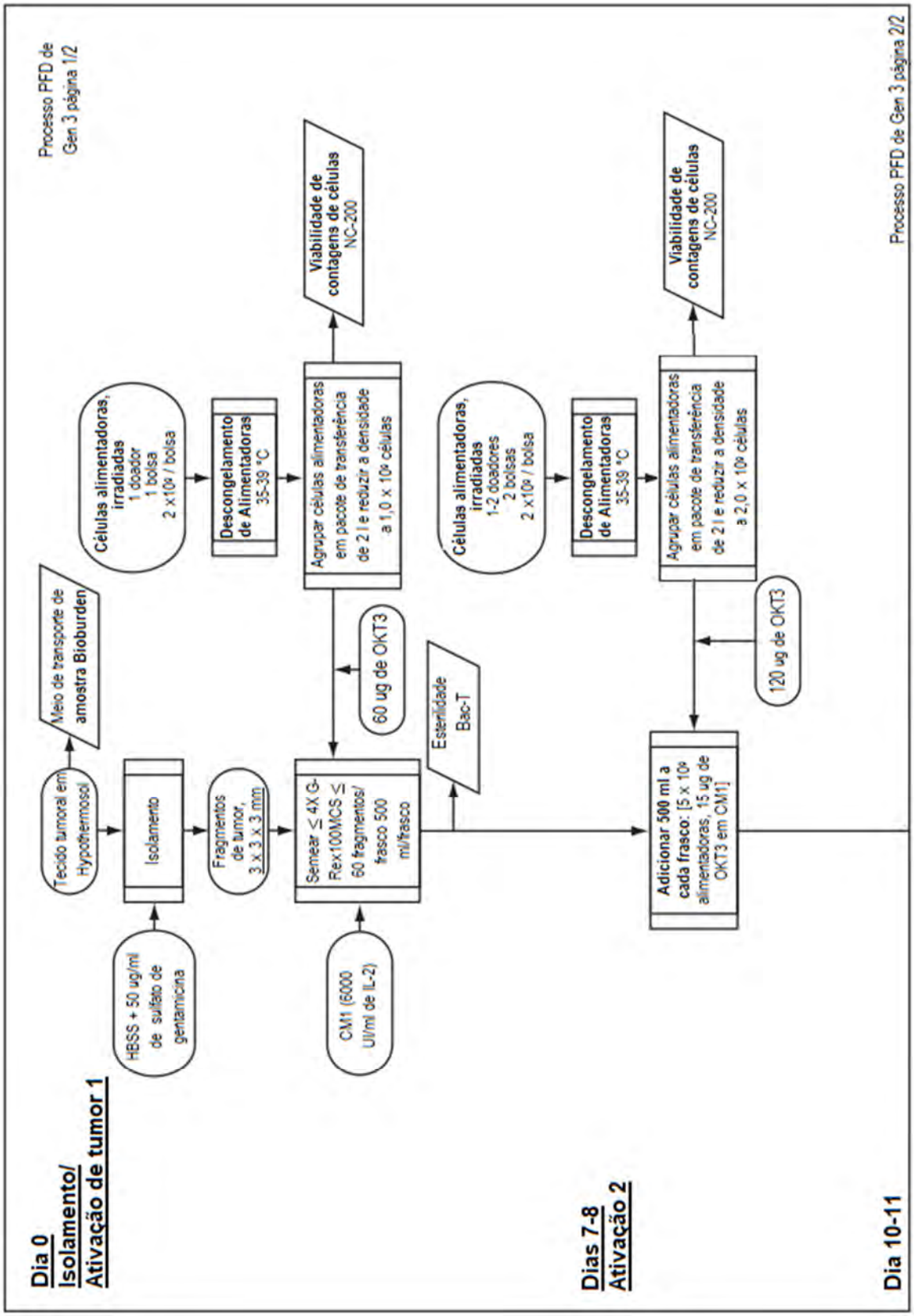

Processo PFD de Gen 3 página 1/2
Dia 0
Isolamento/
Ativação de tumor 1
Tecido tumoral em Hypothermosol
Meio de transporte de amostra Bioburden
Isolamento
HBSS + 50 ug/ml de sulfato de gentamicina
Fragmentos de tumor, 3 x 3 x 3 mm
Semear ≤ 4X G-Rex100MCS ≤ 60 fragmentos/ frasco 500 ml/frasco
CM1 (6000 UI/ml de IL-2)
60 ug de OKT3
Esterilidade Bac-T
Células alimentadoras, irradiadas 1 doador 1 bolsa 2 x10⁸ / bolsa
Descongelamento de Alimentadoras 35-39 °C
Agrupar células alimentadoras em pacote de transferência de 2 l e reduzir a densidade a 1,0 x 10⁸ células
Viabilidade de contagens de células NC-200
Dias 7-8
Ativação 2
Adicionar 500 ml a cada frasco: [5 x 10⁸ alimentadoras, 15 ug de OKT3 em CM1]
Células alimentadoras, irradiadas 1-2 doadores 2 bolsas 2 x10⁸ / bolsa
Descongelamento de Alimentadoras 35-39 °C
Agrupar células alimentadoras em pacote de transferência de 2 l e reduzir a densidade a 2,0 x 10⁸ células
Viabilidade de contagens de células NC-200
120 ug de OKT3
Dia 10-11
Processo PFD de Gen 3 página 2/2

FIG. 67A

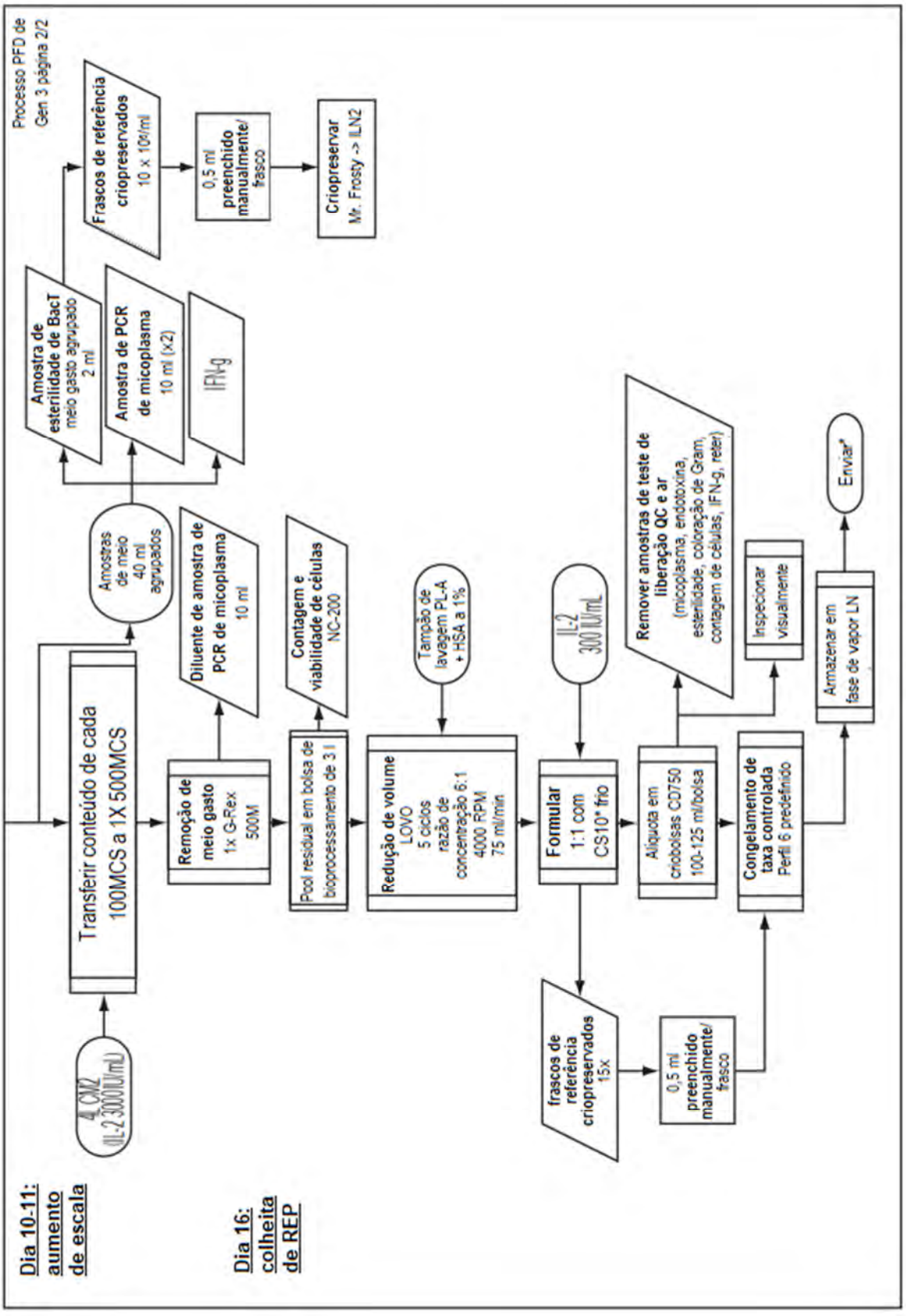

Processo PFD de Gen 3 página 2/2
Dia 10-11: aumento de escala
Dia 16: colheita de REP
4 CM2 IL-2 3000IU/mL
Transferir conteúdo de cada 100MCS a 1X 500MCS
Remoção de meio gasto 1x G-Rex 500M
Amostras de meio 40 ml agrupados
Diluente de amostra de PCR de micoplasma 10 ml
Pool residual em bolsa de bioprocessamento de 3 l
Contagem e viabilidade de células NC-200
Redução de volume LOVO 5 ciclos razão de concentração 6:1 4000 RPM 75 ml/min
Tampão de lavagem PL-A + HSA a 1%
Formular 1:1 com CS10° frio
IL-2 300 IU/mL
frascos de referência criopreservados 15x
0,5 ml preenchido manualmente/ frasco
Alíquota em criobolsas CD750 100-125 ml/bolsa
Congelamento de taxa controlada Perfil 6 predefinido
Remover amostras de teste de liberação QC e ar (micoplasma, endotoxina, esterilidade, coloração de Gram, contagem de células, IFN-g, reter)
Inspecionar visualmente
Armazenar em fase de vapor LN
Enviar*
Amostra de esterilidade de BacT meio gasto agrupado 2 ml
Amostra de PCR de micoplasma 10 ml (x2)
IFN-g
Frascos de referência criopreservados 10 x 10⁶/ml
0,5 ml preenchido manualmente/ frasco
Criopreservar Mr. Frosty -> LN2

FIG. 67B

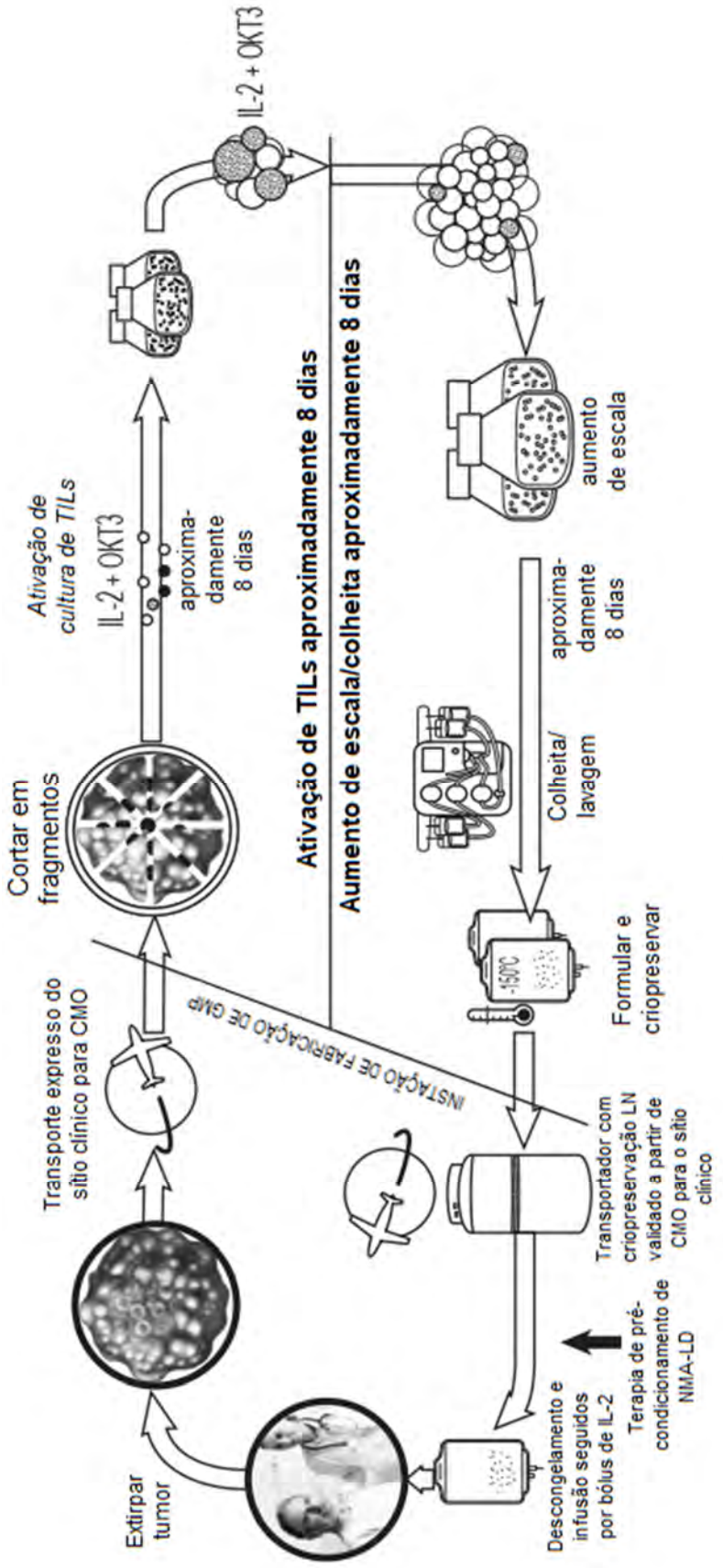

Extirpar tumor
Descongelamento e infusão seguidos por bólus de IL-2
Terapia de pré-condicionamento de NMA-LD
Transportador com criopreservação LN validado a partir de CMO para o sítio clínico
Formular e criopreservar
-150°C
Colheita/ lavagem
aproxima-damente 8 dias
aumento de escala
Transporte expresso do sítio clínico para CMO
Cortar em fragmentos
Ativação de cultura de TILs
IL-2 + OKT3
aproxima-damente 8 dias
IL-2 + OKT3
Aumento de escala/colheita aproximadamente 8 dias
Ativação de TILs aproximadamente 8 dias
INSTALAÇÃO DE FABRICAÇÃO DE GMP

FIG. 68

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 697/745

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 aquecido CM1 previamente formulado 100MCS-**11 dias**	***Tumor fresco ou congelado*** Tumor inteiro com < 30 fragmentos até 60 fragmentos por 1 G-Rex. 100MCS (até 4 G-Rex), meio aquecido previamente formulado - **7 dias. Pré-REP, 250e6 células alimentadoras + OKT-3 (15 ug)**
Iniciação de REP	Direto para REP- Dia 11- **<200e^6 TILs** 1 G-Rex 500MCS	Direto para REP- Dia 11- <200 e^6 TILs Meio aquecido CM2 previamente formulado in one G-Rex 500MCS	Direto para REP – Dia **7- todas as células TIL-mesmo G-Rex 100MCS (100MCS até 4 GREX), Meio padrão ou meio definido (livre de soro). Adição de 500e6 células alimentadoras +OKT-3 (30 ug)**
Propagação ou aumento de escala de TILs	1 a 5 G-REX 500MCS **Dia de divisão 16**	2 a 5 G-REX 500MCS Meio aquecido CM4 previamente formulado **Dia de divisão 16**	Transferir a partir de G-REX 100MCS uma suspensão de TILs para G- REX 500MCS, até 4 GREX 500 MCS-Meio padrão ou meio definido (livre de soro) **Aumento de escala nos dias 10 ou 11**
Colheita	**Colheita dia 22,** Lavador de células automatizado por LOVO	**Colheita dia 22,** Lavador de células automatizado por LOVO (5 ciclos de lavagem)	**Colheita dias 14 ou 16** Lavador de células automatizado por LOVO (5 ciclos de lavagem)
Formulação final	Produto criopreservado 300 UI/ml de IL2-CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto criopreservado 300 UI/ml de IL2-CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas	Produto criopreservado 300 UI/ml de IL2-CS10 em LN_2, múltiplas alíquotas
Tempo de processo	**22 dias**	**22 dias**	**16 dias**

FIG. 69

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 698/745

Comparação de processo	Alterações de processo	Diferenças
Gen 2: Gen 2.1	• Iniciar processo com dois frascos em vez de um frasco • Dividir camada de alimentadoras de iniciação de REP entre dois frascos G-Rex500MCS • Formular previamente o meio e aquecer o mesmo antes do uso	• Potencialmente dobrar a contagem final de células (dose) com repertório de TILs aumentado. • Redundância do processo ao longo do processo
Gen 2.1: Gen 3.1	• Tumor fresco ou congelado • processo de 14-16 dias (a partir do dia 22) • Reduzir camada de alimentadoras totais no processo • Camada de alimentadoras e OKT3 presentes no Dia 0 • REP iniciada com fragmentos • 10OMCS aumenta em escala para 500MCS • Aumenta em escala para múltiplos frascos de pré-REP • Meio padrão e meio definido (livre de soro)	• Potência aumentada • Fenótipo aprimorado • Tempo de processo diminuído • Teste de reagente reduzido • Variabilidade de processo diminuída • Reagentes definidos • Repertório aumentado • Impurezas reduzidas (alimentadora) • Comparável ou dose mais alta.

FIG. 70

Dia de processo	Condições	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Dia 0: Ativação e isolamento de fragmentos de tumor	Meio (*)	500 ml	500 ml	500 ml
	IL-2	6000 IU/ml	6000 IU/ml	6000 IU/ml
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	Alimentadoras	-	-	2.5E+06
Dia de processo	**Condições**	**Gen 3.0**	**Controle de Gen 3.1**	**Teste de Gen 3.1**
Dias 7 - 8: Reativação de cultura de TILs	Media (*)	500 ml	500 ml	500 ml
	IL-2	6000 UI/ml	6000 UI/ml	6000 UI/ml
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	Alimentadoras	1E+09	500E+06	500E+06
	Total de Alimentadoras adicionadas ao longo do Dia Day 7	1E+09	500E+06	750E+06
Dia de processo	**Condições**	**Gen 3.0**	**Controle de Gen 3.1**	**Teste de Gen 3.1**
Dias 10-11: Aumento em escala de cultura	Transferir a partir de GREX100 uma suspensão de TILs totais para 1GREX 500 contendo 4 l de meio com IL-2 (3000 UI/ml)			
Dia de processo	**Condições**	**Gen 3.0**	**Controle de Gen 3.1**	**Teste de Gen 3.1**
Dias 16-17:	Lavador de células automatizado por LOVO e criopreservação com			

(*) Meio pode ser meio padrão ou meio livre de soro CTS.

FIG. 71

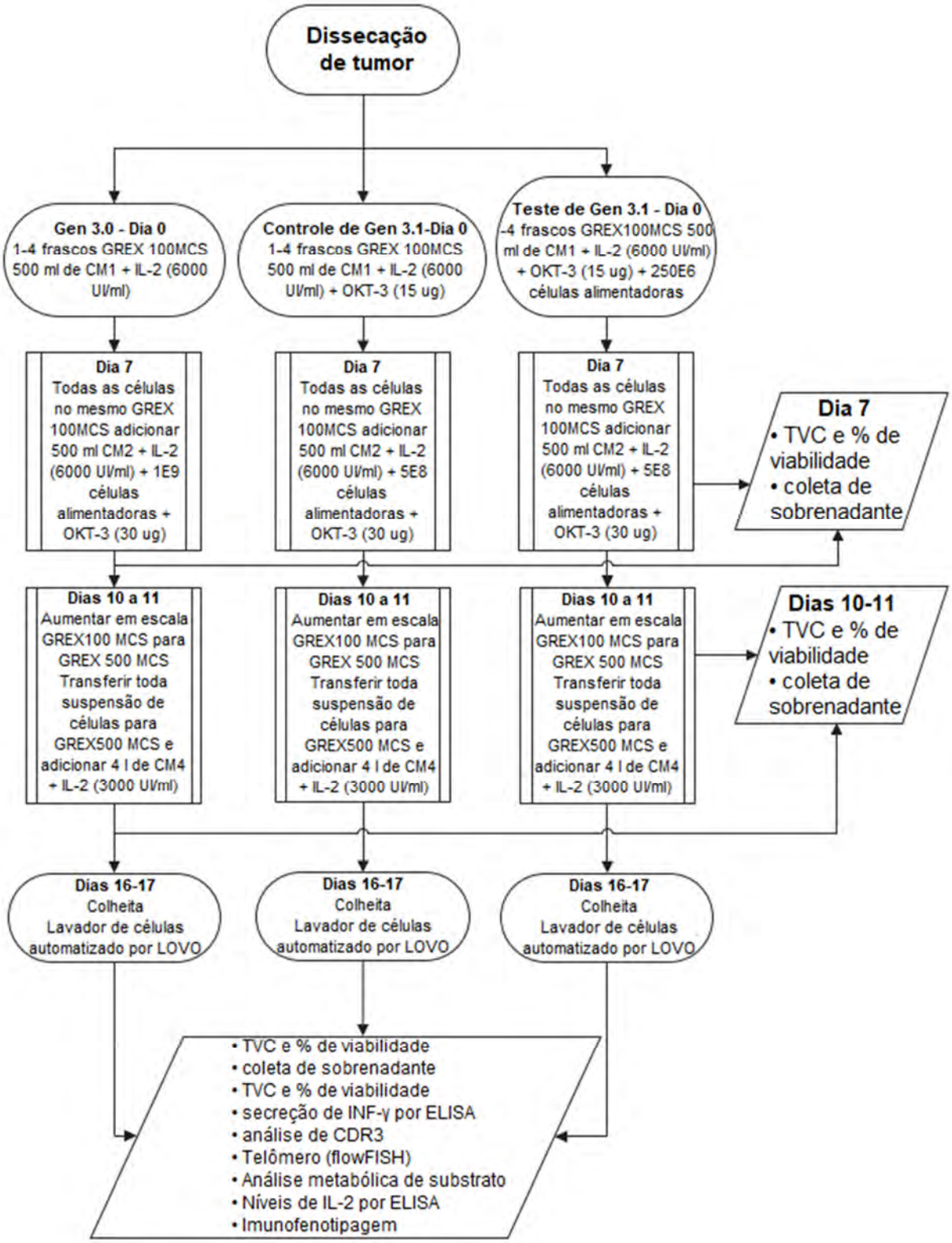

Dissecação de tumor
Gen 3.0 - Dia 0
1-4 frascos GREX 100MCS 500 ml de CM1 + IL-2 (6000 UI/ml)
Controle de Gen 3.1-Dia 0
1-4 frascos GREX 100MCS 500 ml de CM1 + IL-2 (6000 UI/ml) + OKT-3 (15 ug)
Teste de Gen 3.1 - Dia 0
-4 frascos GREX100MCS 500 ml de CM1 + IL-2 (6000 UI/ml) + OKT-3 (15 ug) + 250E6 células alimentadoras
Dia 7
Todas as células no mesmo GREX 100MCS adicionar 500 ml CM2 + IL-2 (6000 UI/ml) + 1E9 células alimentadoras + OKT-3 (30 ug)
Dia 7
Todas as células no mesmo GREX 100MCS adicionar 500 ml CM2 + IL-2 (6000 UI/ml) + 5E8 células alimentadoras + OKT-3 (30 ug)
Dia 7
Todas as células no mesmo GREX 100MCS adicionar 500 ml CM2 + IL-2 (6000 UI/ml) + 5E8 células alimentadoras + OKT-3 (30 ug)
Dia 7
• TVC e % de viabilidade
• coleta de sobrenadante
Dias 10 a 11
Aumentar em escala GREX100 MCS para GREX 500 MCS Transferir toda suspensão de células para GREX500 MCS e adicionar 4 l de CM4 + IL-2 (3000 UI/ml)
Dias 10 a 11
Aumentar em escala GREX100 MCS para GREX 500 MCS Transferir toda suspensão de células para GREX500 MCS e adicionar 4 l de CM4 + IL-2 (3000 UI/ml)
Dias 10 a 11
Aumentar em escala GREX100 MCS para GREX 500 MCS Transferir toda suspensão de células para GREX500 MCS e adicionar 4 l de CM4 + IL-2 (3000 UI/ml)
Dias 10-11
• TVC e % de viabilidade
• coleta de sobrenadante
Dias 16-17
Colheita
Lavador de células automatizado por LOVO
Dias 16-17
Colheita
Lavador de células automatizado por LOVO
Dias 16-17
Colheita
Lavador de células automatizado por LOVO
• TVC e % de viabilidade
• coleta de sobrenadante
• TVC e % de viabilidade
• secreção de INF-γ por ELISA
• análise de CDR3
• Telômero (flowFISH)
• Análise metabólica de substrato
• Níveis de IL-2 por ELISA
• Imunofenotipagem

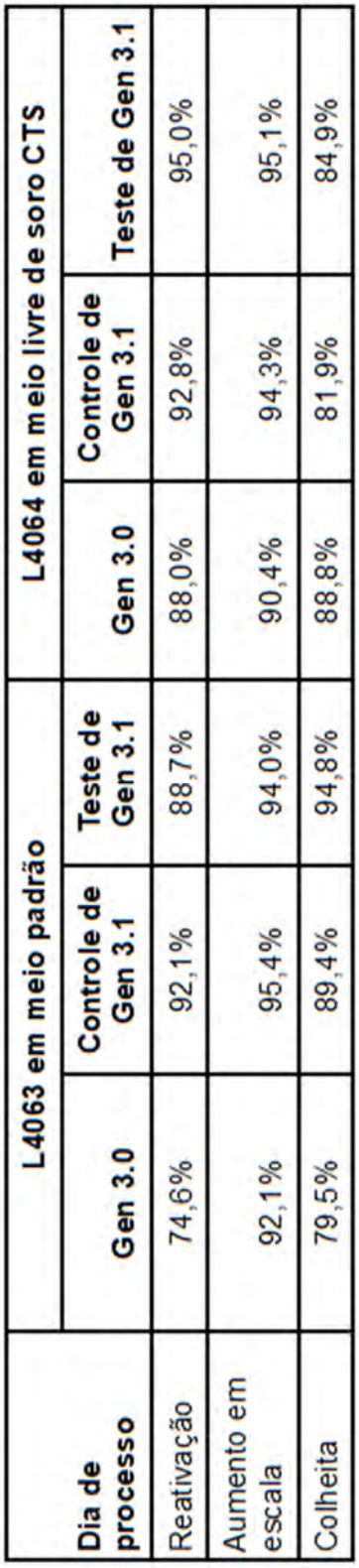
FIG. 72

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 701/745

Dia de processo	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Número de fragmentos	**53**	**53**	**53**	**21**	**21**	**21**
TVC media na cultura por fragmento	1,37E+08	3,19E+08	3,53E+08	5,90E+08	7,57E+08	9,29E+08
TVC Dia 7 (*)	2,59E+07	643E+07	1,45E+08	7,35E+06	9,28E+07	1,39E+08
TVC Dias 10/11 (*)	6,07E+08	1,66E+09	1,83E+09	7,48E+08	1,28E+09	1,72E+09
TVC colheita dias 16/17	7,26E+09	1,69E+10	1,87E+10	1,24E+10	1,59E+10	1,95E+10
Expansão de dobra dia 10 ou 11 dia 7)	**23,4**	**25,8**	**12,6**	**101,8**	**13,8**	**12,4**
Expansão de dobra (colheita dia 16 /dia 7)	**280,3**	**262,8**	**129,0**	**1687,1**	**171,3**	**140,3**

(*) Contagens de células para o Dia 7 e o Dia 10/11 foram feitas FIO. Com base no modelo do processo, amostras foram tiradas diretamente de cada frasco após agitar seu conteúdo sem redução de volume. Como tal, análise e conclusões de dados de contagem de células dessas amostras são limitadas pela natureza da metodologia de amostragem.

FIG. 73



Dia de processo	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Reativação	74,6%	92,1%	88,7%	88,0%	92,8%	95,0%
Aumento em escala	92,1%	95,4%	94,0%	90,4%	94,3%	95,1%
Colheita	79,5%	89,4%	94,8%	88,8%	81,9%	84,9%

FIG. 74

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 703/745

ID de Tumor	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Marcadores	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
L/D aqua	82,2	89,4	91,0	76,6	83,1	89,5
NK	1,3	0,4	1,0	2,5	0,2	0,5
TCRa/b+	88,6	97,5	95,5	93,0	97,3	96,7
CD4	56,4	85,8	77,5	33,8	64,8	57,4
CD4/CD27	3,8	2,1	3,4	6,7	0,7	2,2
CD4/CD28	82,7	71,8	80,2	97,5	73,5	66,8
CD4/CD56	0,4	0,5	0,7	0,5	0,5	0,3
CD4/CD57	6,7	17,0	20,5	16,0	7,6	8,0
CD8	29,6	11,2	16,8	51,9	28,9	36,1
CD8/CD27	15,0	25,6	30,5	14,1	3,3	6,7
CD8/CD28	47,5	23,0	24,5	88,0	45,1	37,3
CD8/CD56	3,3	2,3	4,2	6,6	10,3	10,0
CD8/CD57	0,3	1,2	1,1	1,3	0,2	2,5

FIG. 75

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 704/745

ID de Tumor	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Marcadores	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
CD/CD4	56,4	85,8	77,5	33,8	64,8	57,4
TEMRA de CD4	0,4	0,7	0,4	1,1	0,7	0,2
Virgem de CD4	0,3	0,2	0,2	0,5	0,1	0,0
CM de CD4	45,6	16,8	29,3	46,3	30,6	29,9
EM de CD4	537	82,3	70,2	52,1	68,6	69,9
CD3/CD8	29,6	11,2	16,8	51,9	28,9	36,1
TEMRA de CD8	3,1	0,5	0,9	6,1	8,0	5,4
Virgem de CD8	0,7	0,1	0,4	2,2	0,7	1,0
CM de CD8	22,0	15,8	29,7	61,9	18,9	18,2
EM de CD8	74,3	83,5	69,0	29,8	72,4	75,5

FIG. 76

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 705/745

ID de Tumor	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Marcadores	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
2B4+	2,1	0,6	1,0	2,0	1,2	1,3
BTLA4	99,7	95,4	96,9	99,5	98,8	98,1
CD25+	48,6	10,5	3,9	58,2	41,7	32,1
CD69+	27,1	37,7	21,5	39,4	35,6	30,5
CD95+	99,9	99,9	99,5	99,6	99,0	97,3
CD103+	0,7	1,2	0,4	1,4	1,3	1,2
KLRG1+	1,6	3,7	3,3	11,4	8,3	10,7
LAG3+	5,6	8,2	3,3	1,5	1,6	1,4
PD1+	77,4	58,4	41,6	34,1	28,4	26,7
TIGIT+	68,5	40,3	30,3	45,8	52,1	52,2
TIM3+	58,0	42,4	59,4	61,0	58,4	56,8

FIG. 77

ID de Tumor	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Marcadores	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
2B4+	65,8	56,6	70,5	13,6	21,5	20,7
BTLA4	99,5	96,6	98,2	99,3	97,4	96,1
CD25+	41,4	10,5	5,9	60,6	32,0	17,1
CD69+	44,9	28,0	20,0	33,2	30,6	22,7
CD95+	99,6	99,6	98,9	98,9	96,1	93,5
CD103+	29,4	27,9	24,5	10,9	6,0	7,3
CXCR3+	99,9	99,9	99,8	99,3	99,2	99,2
KLRG1+	7,1	4,6	6,7	13,2	14,5	14,1
LAG3+	28,6	22,5	11,9	2,8	1,6	1,4
PD1+	56,9	54,5	51,7	25,4	20,0	23,6
TIGIT+	90,8	93,7	93,3	92,1	90,4	90,5
TIM3+	66,7	49,1	58,6	65,6	46,8	43,6

FIG. 78

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 707/745

Caracterização de TILs	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
IFNy (pg/mL)	907	428	2863	1485	3130	3863

Resultados são relatados como média de amostras triplicadas a partir de um experimento representativo

FIG. 79

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 708/745

	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Dia de processo	**Gen 3.0**	**Controle de Gen 3.1**	**Teste de Gen 3.1**	**Gen 3.0**	**Controle de Gen 3.1**	**Teste de Gen 3.1**
Reativação	12319,6	11928,7	11786,7	5891,6	5671,8	389,4(1)
Aumento de escala	32095,1	30368,6	26145,0	*	*	*
Colheita	17309,3	13828,4	16019,2	656,0	826,2	768,9

Resultados são relatados como média de amostras triplicadas a partir de um experimento representativo
(*) Meio gasto a partir dos dias 10/11 em L4064 não foi coletado durante a execução das rodadas.
(1) Os dados para o Teste de Gen 3.1 L4064 no dia de reativação foram significativamente abaixo dos valores correspondentes para Controle de Gen 3.1 e Condições de Gen 3.0. Devido à quantidade baixa de amostras feitas, não foi possível repetir o ensaio para verificar a precisão desse número.

FIG. 80

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 709/745

Glicose (g/l)						
	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Dia de processo	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Reativação	1,8	1,7	1,4	4,3	4,1	3,8
Aumento em escala	1,4	0,9	0,8	*	*	*
Colheita	1,5	0,9	1,0	2,8	2,1	2,2

(*) Meio gasto proveniente dos dias 10/11 em L4064 não foi coletado durante a execução das rodadas.

FIG. 81

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 710/745

Lactato (g/l)						
	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Dia de processo	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Reativação	0,2	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
Aumento de escala	0,7	1,1	1,2	*	*	*
Colheita	1,1	1,7	1,6	1,5	2,0	1,9

(*) Meio gasto proveniente dos dias 10/11 em L4064 não foi coletado durante a execução das rodadas.

FIG. 82

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 711/745

Glutamina (mmol/l)						
	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Dia de processo	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Reativação	2,0	2,0	2,0	1,3	1,2	1,1
Aumento de escala	1,7	1,1	1,1	*	*	*
Colheita	1,9	1,3	1,3	0,7	0,6	0,6

(*) Meio gasto proveniente dos dias 10/11 em L4064 não foi coletado durante a execução das rodadas.

FIG. 83

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 712/745

Glutamax (mmol/l)						
	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
Dia de processo	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Reativação	2,2	2,2	2,2	1,4	1,3	1,2
Aumento de escala	1,9	1,2	1,2	*	*	*
Colheita	2,1	1,5	1,5	0,8	0,7	0,7

(*) Meio gasto proveniente dos dias 10/11 em L4064 não foi coletado durante a execução das rodadas.

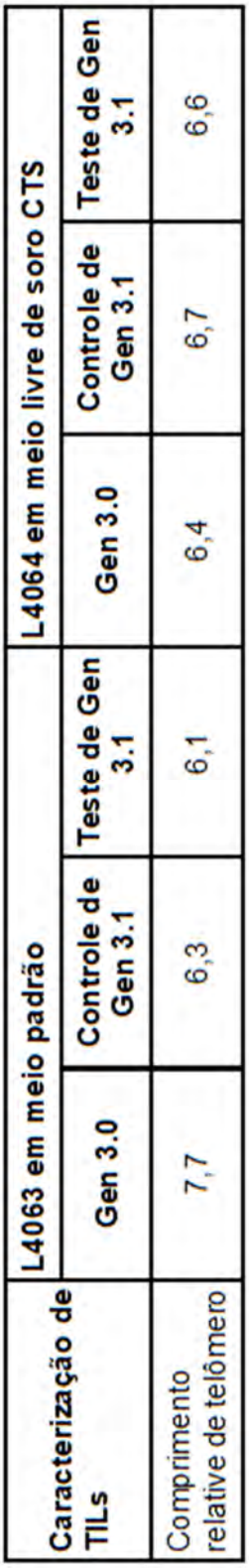
FIG. 84

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 713/745

Amônia (mmol/l)						
Dia de processo	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Reativação	1,9	1,9	2,0	0,7	0,8	0,9
Aumento de escala	1,8	2,2	2,3	*	*	*
Colheita	2,1	2,5	2,5	1,0	1,0	0,9

(*) Meio gasto proveniente dos dias 10/11 em L4064 não foi coletado durante a execução das rodadas.

FIG. 85



Caracterização de TILs	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Comprimento relative de telômero	7,7	6,3	6,1	6,4	6,7	6,6

FIG. 86

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 715/745

Caracterizações de TILs	L4063 em meio padrão			L4064 em meio livre de soro CTS		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
uCD3	14005,0	18149,0	17181,0	15107,0	21460,0	21503,0
Índice de entropia de Shannon	5,9	10,8	10,5	8,5	10,7	10,4

FIG. 87

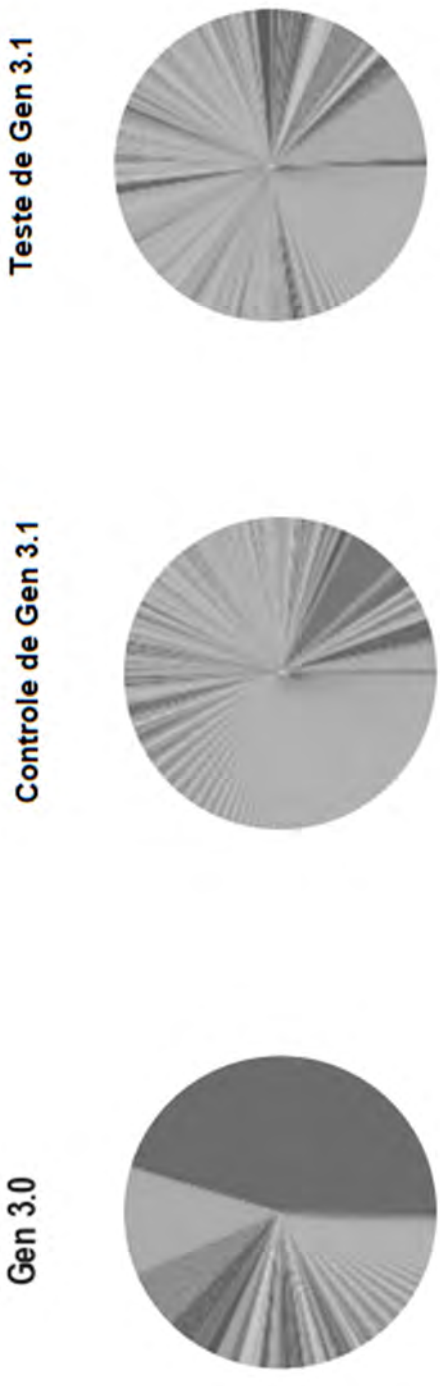


FIG. 88

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 717/745

Número de CDR3 (% sobreposição) L4063	tudo uCDR3's - todos os uCDR3			Primeiros 80% das uCDR3		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23%)	2959 (21%)	1105	1000 (90%)	975 (88%)
Controle de Gen 3.1	-	18149	-	-	2437	-
Teste de Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2331

FIG. 89

Número de CDR3 (% de sobreposição) L4064	tudo uCDR3's - todos os uCDR3			Primeiros 80% das uCDR3		
	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1	Gen 3.0	Controle de Gen 3.1	Teste de Gen 3.1
Gen 3.0	15107	5486 (36%)	5541 (36%)	2478	2186 (88%)	2163 (87%)
Controle de Gen 3.1	-	21460	-	-	3246	-
Teste de Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3263

FIG. 90

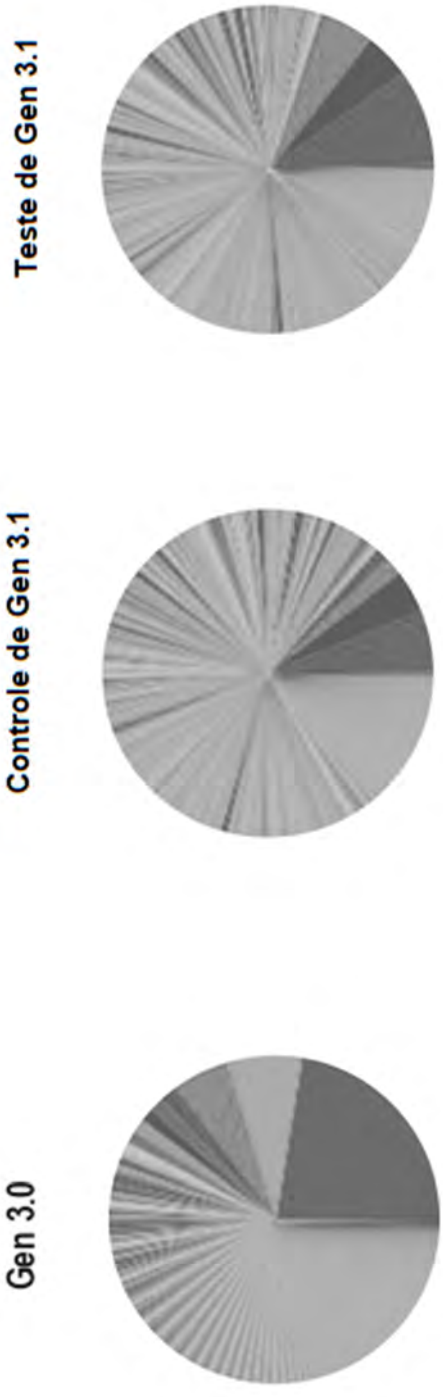


FIG. 91

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 720/745

Etapa	Processo otimizado por Gen 3
Dia 0 Isolamento e ativação de tumor	≤240 fragmentos ≤60 fragmentos/frasco ≤4 frascos ≤2 l de meio (500 ml/frasco) IL-2 (6000 UI/ml) 2,5 x 10^8 de células alimentadoras/frasco 15 ug de OKT3/frasco
Dias 7-8 Reativação	TIL frescos direto para REP Ativar toda a cultura 5 x 10^8 células alimentadoras 30 ug de OKT3/frasco G-Rex 100MCS Adicionar 500 ml de meio + IL-2 (6000 UI/ml)
Dias 10-11 Aumento em escala ou subcultura de TILs	≤4 G-REX 500MCS Aumentar em escala toda a cultura transferindo 1 l de GREX100MCS para GREX 500MCS e adicionar 4 l de meio + IL-2 (3000 UI/ml) /frasco
Dias 16-17 Colheita	Colher Lavador de células automatizado por LOVO Criopreservação em Plasmalyte HSA a 1%: CS10

FIG. 92

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 721/745

Teste	**Critérios de aceitação**	**Teste de Gen 3.1 vs Processo de Gen 3.0**
Contagem de células (TVC)	Gen 3.1 > 30% para processar Gen 3.0	Satisfeito
% de viabilidade	≥70% de viabilidade	Satisfeito
Imunofenotipagem (%C D3+/ %CD45+)	≤5% de diferença entre Gen 3.1 e processo de Gen 3.0	Satisfeito
Secreção de IFNγ	Gen 3.1 ≥ para processar Gen 3.0	Satisfeito

FIG. 93

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 722/745

Contagens de células no Dia de reativação

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células/ml)	Volume médio de células totais
Gen 3.0 (A) L4063	500	Total	7,10E+04	6,81 E+04		6,96E+04	3,48E+07
		Viva	5,27E+04	5,09E+04		5,18E+04	2,59E+07
		Morta	1,83E+04	1,72E+04		1,78E+04	8,88E+06
		% de viabilidade	74,30%	74,80%		74,55%	
Gen 3.1 (A) L4063	500	Total	1,41E+05	1,38E+05		1,40E+05	6,98E+07
		Viva	1,31E+05	1,26E+05		1,29E+05	6,43E+07
		Morta	9,84E+03	1,21 E+04		1,10E+04	5,49E+06
		% de viabilidade	93,00%	91,20%		92,10%	
Teste de Gen 3.1 L4063	500	Total	3,26E+05	3,28E+05		3,27E+05	1,64E+08
		Viva	2,83E+05	2,96E+05		2,90E+05	1,45E+08
		Morta	4,25E+04	3,16E+04		3,71 E+04	1,85E+07
		% de viabilidade	87,00%	90,30%		88,65%	
Gen 3.0 (A) L4064	500	Total	1,59E+04	1,75E+04		1,67E+04	8,35E+06
		Viva	1,39E+04	1,44E+04		1,47E+04	7,35E+06
		Morta	1,98E+03	2,02E+03		2,00E+03	1,00E+06
		% de viabilidade	87,50%	88,50%		88,00%	
Controle de Gen 3.1 L4064	500	Total	2,02E+05	1,98E+05		2,00E+05	1,00E+08
		Viva	1,88E+05	1,83E+05		1,86E+05	9,28E+07
		Morta	1,38E+04	1,51 E+04		1,45E+04	7,23E+06
		% de viabilidade	93,20%	92,40%		92,80%	
Teste de Gen 3.1 L4064	500	Total	2,70E+05	3,15E+05		2,93E+05	1,46E+08
		Viva	2,55E+05	3,01 E+05		2,78E+05	1,39E+08
		Morta	1,51 E+04	1,38E+04		1,45E+04	7,23E+06
		% de viabilidade	94,40%	95,60%		95,00%	

FIG. 94

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 723/745

Contagens de células no Dia de aumento de escala

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Média (células/ml)	Volume médio de células totais
Gen 3.0 (A) L4063	1000	Total	6,57E+05	6,61 E+05		6,59E+05	6,59E+08
		Viva	6,00E+05	6,14E+05		6,07E+05	6,07E+08
		Morta	5,71E+04	4,68E+04		5,20E+04	5,20E+07
		% de viabilidade	91,30%	92,90%		92,10%	
Controle de Gen 3.1 L4063	1000	Total	1,66E+06	1,82E+06		1,74E+06	1,74E+09
		Viva	1,59E+06	1,72E+06		1,66E+06	1,66E+09
		Morta	7,17E+04	9,07E+04		8,12E+04	8,12E+07
		% de viabilidade	95,70%	95,00%		95,35%	
Teste de Gen 3.1 L4063	1000	Total	1,88E+06	2,00E+06		1,94E+06	1,94E+09
		Viva	1,76E+06	1,89E+06		1,83E+06	1,83E+09
		Morta	1,20E+05	1,15E+05		1,18E+05	1,18E+08
		% de viabilidade	93,60%	94,30%		93,95%	
Gen 3.0 (A) L4064	1000	Total	7,95E+05	8,58E+05		8,27E+05	8,27E+08
		Viva	7,17E+05	7,78E+05		7,48E+05	7,48E+08
		Morta	7,85E+04	8,05E+04		7,95E+04	7,95E+07
		% de viabilidade	90,10%	90,60%		90,35%	
Controle de Gen 3.1 L4064	1000	Total	1,38E+06	1,32E+06		1,35E+06	1,35E+09
		Viva	1,31E+06	1,24E+06		1,28E+06	1,28E+09
		Morta	7,20E+04	8,13E+04		7,67E+04	7,67E+07
		% de viabilidade	94,80%	93,80%		94,30%	
Teste de Gen 3.1 L4064	1000	Total	1,85E+06	1,76E+06		1,81E+06	1,81E+09
		Viva	1,76E+06	1,67E+06		1,72E+06	1,72E+09
		Morta	8,62E+04	8,95E+04		8,79E+04	8,79E+07
		% de viabilidade	95,30%	94,90%		95,10%	

FIG. 95

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 724/745

Contagens de células na colheita de L4063

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células/ml)	Volume médio de células totais
Gen 3.0 (A) L4063 pré-LOVO	602.4	Total	1,68E+07	1,70E+07		1,69E+07	1,02E+10
		Viva	1,52E+07	1,54E+07		1,53E+07	9,22E+09
		Morta	1,60E+06	1,64E+06		1,63E+06	9,79E+08
		% de viabilidade	90,50%	90,30%		90,40%	
Controle de Gen 3.1 L4063 pré-LOVO	497.1	Total	3,39E+07	3,90E+07		3,65E+07	1,81E+10
		Viva	3,25E+07	3,73E+07		3,49E+07	1,73E+10
		Morta	1,41E+06	1,63E+06		1,52E+06	7,56E+08
		% de viabilidade	95,80%	95,80%		95,80%	
Teste de Gen 3.1 L4063 pré-LOVO	552.3	Total	3,71E+07	3,62E+07		3,67E+07	2,02E+10
		Viva	3,56E+07	3,51 E+07		3,54E+07	1,95E+10
		Morta	1,50E+06	1,09E+06		1,30E+06	7,15E+08
		% de viabilidade	96,00%	97,00%		96,50%	
Gen 3.0 (A) L4063 pós-LOVO	165	Total	5,37E+07	5,73E+07	5,50E+07	5,53E+07	9,13E+09
		Viva	4,32E+07	4,52E+07	4,36E+07	4,40E+07	7,26E+09
		Morta	1,04E+07	1,21 E+07	1,14E+07	1,13E+07	1,86E+09
		% de viabilidade	80,50%	78,80%	79,30%	79,53%	
Controle de Gen 3.1 L4063 pós-LOVO	165	Total	1,21E+08	1,01E+08	1,22E+08	1,15E+08	1,89E+10
		Viva	1,10E+08	8,85E+07	1,09E+08	1,03E+08	1,69E+10
		Morta	1,11E+07	1,23E+07	1,27E+07	1,20E+07	1,99E+09
		% de viabilidade	90,90%	87,80%	89,60%	89,43%	
Teste de Gen 3.1 L4063 pós-LOVO	175	Total	1,05E+08	1,20E+08		1,13E+08	1,97E+10
		Viva	9,93E+07	1,14E+08		1,07E+08	1,87E+10
		Morta	5,51 E+06	6,14E+06		5,83E+06	1,02E+09
		% de viabilidade	94,70%	94,90%		94,80%	

FIG. 96

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 725/745

Contagens de células na Colheita de L4064

ID	Volume (ml)		Contagem 1 (células/ml)	Contagem 2 (células/ml)	Contagem 3 (células/ml)	Média (células/ml)	Volume médio de células totais
Gen 3.0 (A) L4064 pré-LOVO	641.3	Total	1,99E+07	1,94E+07		1,97E+07	1,26E+10
		Viva	1,83E+07	1,94E+07		1,89E+07	1,21E+10
		Morta	1,60E+06	1,68E+06		1,64E+06	1,05E+09
		% de viabilidade	92,00%	92,00%		92,00%	
Controle de Gen 3.1 L4064 pré-LOVO	493.4	Total	3,98E+07	3,87E+07		3,93E+07	1,94E+10
		Viva	3,65E+07	3,55E+07		3,60E+07	1,78E+10
		Morta	3,31 E+06	3,22E+06		3,27E+06	1,61E+09
		% de viabilidade	91,70%	91,70%		91,70%	
Teste de Gen 3.1 L4064 pré-LOVO	593.4	Total	3,92E+07	3,79E+07		3,86E+07	2,29E+10
		Viva	3,67E+07	3,54E+07		3,61E+07	2,14E+10
		Morta	2,55E+06	2,50E+06		2,53E+06	1,50E+09
		% de viabilidade	93,50%	93,40%		93,45%	
Gen 3.0 (A) L4064 pós-LOVO	165	Total	8,58E+07	8,34E+07		8,46E+07	1,40E+10
		Viva	7,56E+07	7,46E+07		7,51 E+07	1,24E+10
		Morta	1,02E+07	8,79E+06		9,50E+06	1,57E+09
		% de viabilidade	88,10%	89,50%		88,80%	
Controle de Gen 3.1 L4064 pós-LOVO	165	Total	1,13E+08	1,22E+08	1,15E+08	1,18E+08	1,94E+10
		Viva	9,21 E+07	1,01E+08	9,45E+07	9,66E+07	1,59E+10
		Morta	2,14E+07	2,13E+07	2,07E+07	2,14E+07	3,52E+09
		% de viabilidade	81,20%	82,60%	82,10%	81,90%	
Teste de Gen 3.1 L4064 pós-LOVO	165	Total	1,33E+08	1,45E+08		1,39E+08	2,29E+10
		Viva	1,14E+08	1,22E+08		1,18E+08	1,95E+10
		Morta	1,94E+07	2,26E+07		2,10E+07	3,47E+09
		% de viabilidade	85,40%	84,40%		84,90%	

FIG. 97

	S1/S2/Tudo/Viva/ CD14-/TCRab/CD4 /CD27 | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/ CD14-/TCRab/CD4 /CD28 | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/ CD14-/TCRab/CD4 /CD56 | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/ CD14-/TCRab/CD4 /CD57 | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/ CD14-/TCRab/CD8 /CD27 | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/ CD14-/TCRab/CD8 /CD28 | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/ CD14-/TCRab/CD8 /CD56 | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD1 4-/TCRab/CD8/CD57 | Freq. of Parent (%)
	CD4+/CD27-	CD4+/CD28-	CD4+/CD56+	CD4+/CD57+	CD8+/CD27-	CD8+/CD28-	CD8+/CD56+	CD8+/CD57+
L4063-Gen3.0	3,8	82,7	0,42	6,7	15	47,3	3,29	0,28
L4063-Gen3.1 CT	2,08	71,8	0,53	17	25,6	23	2,33	1,18
L4063-Gen 3.1+ Alimentadoras	3,36	80,2	0,69	20,5	30,5	24,5	4,19	1,07
L4064-Gen3.0	6,66	97,3	0,54	16	14,1	88	6,62	1,29
L4064-Gen3.1 CT	0,72	73,5	0,24	7,58	3,3	45,1	10,3	1,95
L4063-Gen 3.1+ Alimentadoras	2,24	66,8	0,34	7,98	6,69	37,3	9,98	2,24

FIG. 98

		S1/S2/Tudo/Viva |Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14- | Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/CD8-/NK |Freq. de nulo (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/CD19 |Freq. de nulo (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab |Freq. de nulo (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4 | Freq. de nulo (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/CD27 |Freq. de nulo (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/CD28 |Freq. de nulo (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/CD56 |Freq. de nulo (%)	S1/S2/All/Live/CD14-/TCRab/CD4/CD57 |Freq. de nulo (%)
		L/D	CD34+	NK	CD19	TCRa/b+	TCRa/b+ /CD4+	TCRab+/CD4+/CD27-	TCRab+/CD4+/CD28-	TCRab+/CD4+/CD56-	TCRab+/CD4+/CD57-
L4063-Gen 3 0	C10 10 tcx	82,2	0,13	1,3	0,083	88,6	56,4	2,34	46,6	0,24	3,78
L4063-Gen 3 1 CT	C11 11 tcx	83,4	0,035	0,15	0,033	97,5	85,8	1,78	61,6	0,46	14,6
L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	C12 12 tcx	91	0,032	1,04	0,007%	95,5	77,5	2,6	62,1	0,54	15,9
L4064-Gen 3 0	D1 13 tcx	76,6	0,18	2,45	0,11	93	33,8	2,25	32,9	0,18	5,4
L4064-Gen 3 1 CT	D2 14 tcx	83,1	0,068	0,23	0,011	97,3	64,8	0,46	47,6	0,35	4,91
L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	D3 15 tcx	89,5	0,043	0,52	0,023	96,7	57,4	1,28	38,4	0,2	4,58

	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q1: CCR7-PE-A-,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q2: CCR7-PE-A+,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q3: CCR7-PE-A-,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q4: CCR7-PE-A-,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q5: CD62L-DV421-A+,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q6: CD62L-DV421-A+,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q7: CD62L-DV421-A+,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD4/Q8: CD62L-DV421-A-,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)
	TEMRA	NAIVE	CM	EM	TEMRA	NAIVE	CM	EM
L4063-Gen 3 0	0,58	0,77	11,2	87,4	0,36	0,26	45,6	53,7
L4063-Gen 3 1 CT	1,22	0,8	1,56	94,4	0,66	0,22	16,8	82,3
L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	0,88	0,35	1,39	97,4	0,36	0,17	29,3	70,2
L4064-Gen 3 0	1,47	1,3	14,2	83	1,09	0,53	46,3	52,1
L4064-Gen 3 1 CT	0,41	0,096	5,28	94,2	0,73	0,11	30,6	68,6
L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	0,44	0,07	2,78	95,7	0,37	0,035	29,9	69,9

	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A-,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A+,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q3: CCR7-PE-A-,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A-,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q5: CD62L-DV421-A+,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q6: CD62L-DV421-A+,CD45RA-AF700-A+| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q7: CD62L-DV421-A+,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRab/CD8/Q8: CD62L-DV421-A-,CD45RA-AF700-A-| Freq. de parental (%)	S1/S2/Tudo/Viva/CD14-/TCRgd | Freq. de parental (%)
	TEMRA	NAIVE	CM	EM	TEMRA	NAIVE	CM	EM	
L4063-Gen 3 0	1,72	1,54	18,1	79,1	3,06	0,67	32	74,3	6,47
L4063-Gen 3 1 CT	1,65	0,62	3,39	94,3	0,52	0,097	15,8	83,5	1,11
L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	2,65	0,73	1,66	95	0,89	0,41	29,7	789	2
L4064-Gen 3 0	6,49	4,31	10,9	70,3	6,05	3,31	61,9	39,8	2,36
L4064-Gen 3 1 CT	6,3	0,59	7,15	86	8	0,72	18,9	72,4	1,68
L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	5,83	0,22	3,17	90,8	5,38	0,96	18,2	75,5	1,86

FIG. 99

		S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/284] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ BTLA] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/CD25] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/CD69] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/CD95] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/CD103] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/KLRG1+] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/LAG3] Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/PD1] Freq. de parental (%)
		284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD95+	CD103+	KLRG1+	LAG3+	PD1+
L4063-Gen 3.0	G10 10 tcs	2.1	99.7	48.6	27.1	99.9	0.69	1.61	5.57	7.74
L4063-Gen 3.1 CT	G11 11 tcs	0.62	95.4	10.5	3.77	99.9	1.15	3.7	8.24	5.84
L4063-Gen 3.1+Feeders - L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	G12 12 tcs	0.95	95.9	3.89	2.15	99.5	0.43	3.32	3.28	4.16
L4064-Gen 3.0	H13 tcs	2	99.3	58.2	39.4	99.6	1.44	11.4	1.49	3.41
L4064-Gen 3.1 CT	H14 tcs	1.18	98.8	41.7	35.6	99	1.25	8.3	1.6	2.84
L4063-Gen 3.1+Feeders - L4063-Gen 3.1+ alimentadoras	H15 tcs	1.26	98.1	32.1	30.5	97.3	1.19	10.7	1.42	2.67

S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/tigit Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD4/tigit Freq. de parental (%)
CD4+ TIGIT+	CD4+ TIM3+
68.5	38
40.3	47.4
30.3	59.4
45.8	61
52.1	38.4
52.2	36.8

FIG. 100

S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/284| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/BTLA| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/CD25| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/CD69| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/CD95| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/CD103| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/CXCR3| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/KLRG1| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/LAG3| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/PD1 | Freq. de parental (%)
CD8+										
284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD95+	CD103+	CXCR3	KLRG1	LAG3	PD1
2,1	2,1	99,7	48,6	27,1	99,9	0,69	1,61	3,57	77,4
0,62	0,62	95,4	10,2	3,7	99,9	1,15	3,7	8,24	58,4
0,95	0,95	96,9	3,89	2,5	99,5	0,43	3,32	3,28	41,6
2	2	99,5	58,2	39,4	99,6	1,44	11,4	1,49	34,1
1,18	1,18	98,8	41,7	35,6	99	1,25	8,3	1,6	28,4
1,26	1,26	98,1	32,1	30,5	97,3	1,19	10,7	1,42	26,7

S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/tigit| Freq. de parental (%)	S/S/Tudo/Viva/CD3/ CD8/tim3| Freq. de parental (%)
CD8	CD8
TIGIT	TIM3
90,8	66,7
83,7	49,1
83,3	58,6
92,1	65,9
90,4	46,8
90,5	43,9

FIG. 101

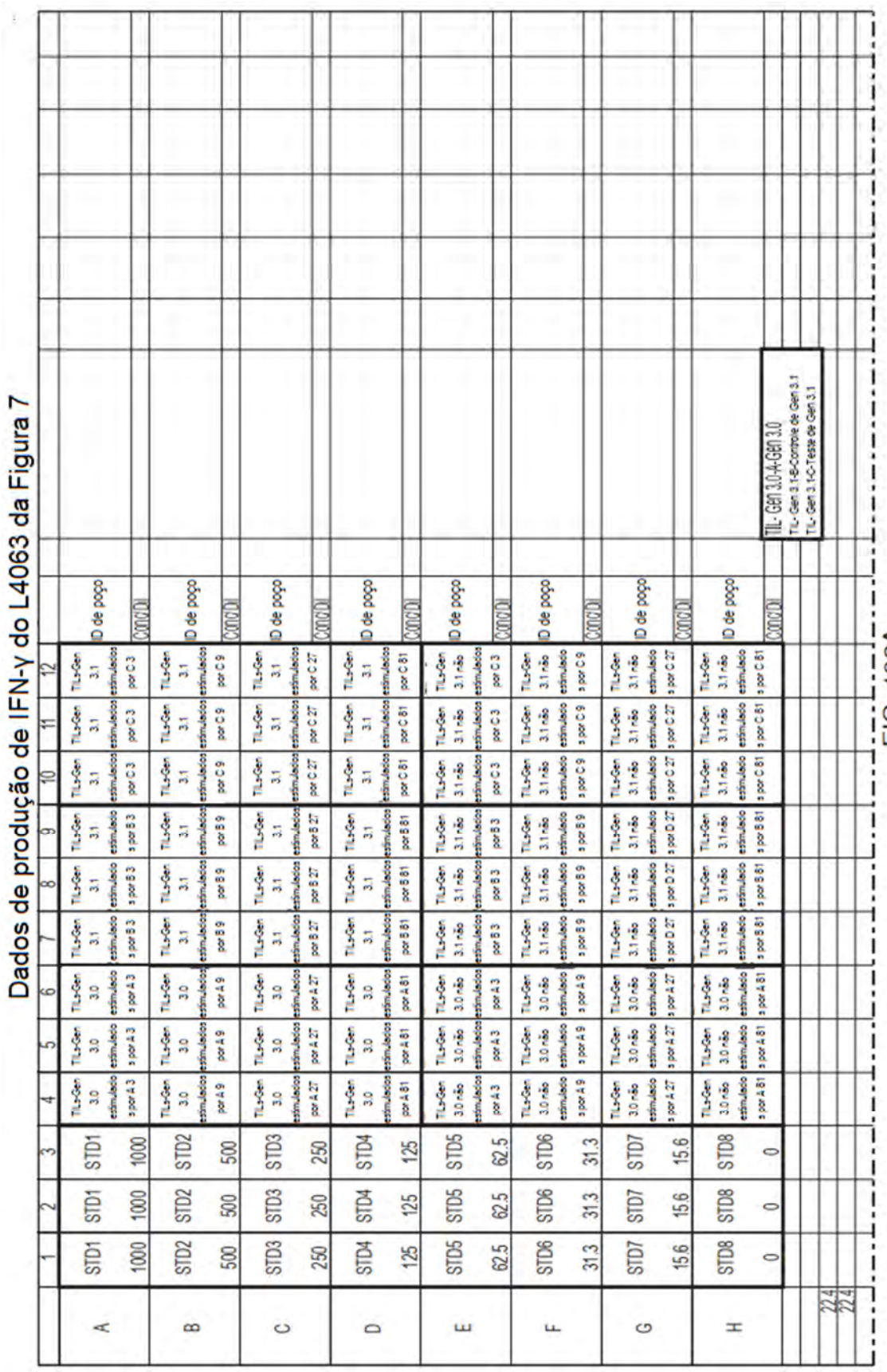
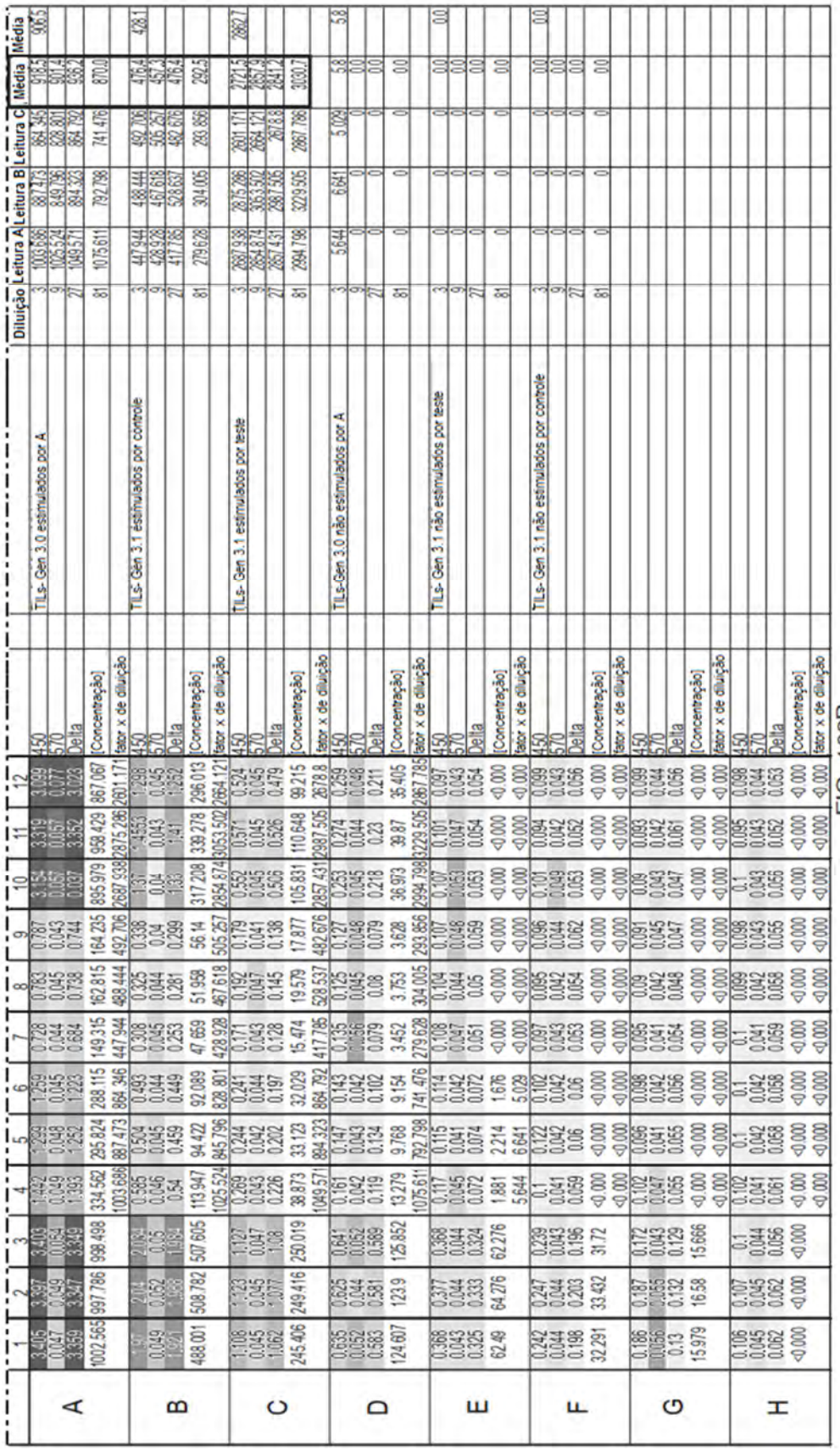

Dados de produção de IFN-γ do L4063 da Figura 7
TIL: Gen 3.0-A-Gen 3.0
TIL- Gen 3.1-B-Controle de Gen 3.1
TIL- Gen 3.1-C-Teste de Gen 3.1

FIG. 102A



		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		Diluição	Leitura A	Leitura B	Leitura C	Média	Média
A		8.405	3.997	3.403	1.142	1.299	1.259	0.728	0.783	0.787	3.154	3.819	3.999	450	TiLs- Gen 3.0 estimulados por A	3	1003.686	887.473	894.345	928.5	906.5
		0.047	0.049	0.054	0.049	0.048	0.045	0.044	0.045	0.043	0.057	0.057	0.077	570		9	1025.524	849.796	838.801	904.4		
		8.959	3.947	3.839	1.393	1.252	1.223	0.684	0.738	0.744	0.037	3.852	3.923	Delta		27	1049.571	894.323	864.792	936.2		
		1002.565	997.786	998.498	334.562	295.824	288.115	149.315	162.815	164.235	895.979	958.429	867.067	[Concentração]		81	1075.611	792.788	741.476	870.0		
					1003.686	887.473	864.346	447.944	488.444	492.706	2687.938	2875.286	2601.171	fator x de diluição						
B		1.107	2.014	2.082	0.585	0.504	0.493	0.308	0.325	0.338	1.161	1.4553	1.298	450	TiLs- Gen 3.1 estimulados por controle	3	447.944	488.444	492.706	476.4	426.1
		0.049	0.052	0.05	0.046	0.045	0.044	0.045	0.044	0.04	0.04	0.043	0.045	570		9	428.928	467.618	505.267	467.3		
		1.058	1.962	1.994	0.54	0.459	0.449	0.253	0.281	0.299	1.121	1.41	1.252	Delta		27	417.785	528.697	482.676	476.2		
		488.001	508.782	507.605	113.947	94.422	92.089	47.659	56.14	51.958	317.208	339.278	296.013	[Concentração]		81	279.628	304.005	293.855	292.5		
					1025.524	845.796	828.801	428.928	467.618	505.257	2854.674	3053.502	2664.121	fator x de diluição						
C		1.108	1.323	1.127	0.269	0.244	0.241	0.171	0.192	0.179	0.552	0.571	0.524	450	TiLs- Gen 3.1 estimulados por teste	3	2687.936	2875.286	2601.171	2721.5	2662.7
		0.045	0.045	0.047	0.043	0.042	0.044	0.043	0.047	0.041	0.045	0.045	0.045	570		9	2854.874	3053.502	2664.121	2857.5		
		1.062	1.077	1.08	0.226	0.202	0.197	0.128	0.145	0.138	0.506	0.526	0.479	Delta		27	2857.431	2987.505	2678.8	2789.2		
		245.406	249.416	250.019	38.873	33.123	32.029	15.474	19.579	17.877	105.831	110.648	99.215	[Concentração]		81	2994.798	3229.505	2867.785	3030.7		
					1049.571	894.323	864.792	417.785	528.537	482.676	2857.431	2987.505	2678.8	fator x de diluição						
D		0.635	0.625	0.641	0.161	0.147	0.143	0.135	0.125	0.127	0.253	0.274	0.259	450	TiLs-Gen 3.0 não estimulados por A	3	5.644	6.641	5.009	5.8	5.8
		0.052	0.044	0.052	0.042	0.043	0.042	0.036	0.045	0.046	0.045	0.044	0.048	570		9	0	0	0	0.0		
		0.583	0.581	0.589	0.119	0.134	0.102	0.079	0.08	0.079	0.218	0.23	0.211	Delta		27	0	0	0	0.0		
		124.607	123.9	125.852	13.279	9.768	9.154	3.452	3.753	3.628	36.973	39.87	35.405	[Concentração]		81	0	0	0	0.0		
					1075.611	792.798	741.476	279.628	304.005	293.856	2994.798	3229.505	2867.785	fator x de diluição						
E		0.368	0.317	0.368	0.117	0.115	0.114	0.108	0.104	0.107	0.107	0.101	0.097	450	TiLs- Gen 3.1 não estimulados por teste	3	0	0	0	0.0	0.0
		0.043	0.044	0.044	0.045	0.041	0.042	0.047	0.044	0.048	0.053	0.047	0.043	570		9	0	0	0	0.0		
		0.325	0.333	0.324	0.072	0.074	0.072	0.051	0.05	0.059	0.053	0.054	0.054	Delta		27	0	0	0	0.0		
		62.49	64.276	62.276	1.881	2.214	1.676	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[Concentração]		81	0	0	0	0.0		
					5.644	6.641	5.029	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	fator x de diluição						
F		0.242	0.247	0.239	0.1	0.122	0.102	0.097	0.095	0.096	0.101	0.094	0.099	450	TiLs- Gen 3.1 não estimulados por controle	3	0	0	0	0.0	0.0
		0.044	0.044	0.043	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.044	0.049	0.042	0.043	570		9	0	0	0	0.0		
		0.198	0.203	0.196	0.059	0.06	0.06	0.053	0.054	0.062	0.053	0.052	0.056	Delta		27	0	0	0	0.0		
		32.291	33.432	31.72	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[Concentração]		81	0	0	0	0.0		
					<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	fator x de diluição						
G		0.186	0.187	0.172	0.102	0.096	0.098	0.085	0.09	0.091	0.09	0.093	0.099	450						
		0.056	0.055	0.043	0.047	0.041	0.042	0.041	0.042	0.045	0.043	0.042	0.044	570						
		0.13	0.132	0.129	0.055	0.055	0.056	0.054	0.048	0.047	0.047	0.061	0.056	Delta						
		15.979	16.58	15.666	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[Concentração]						
					<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	fator x de diluição						
H		0.106	0.107	0.1	0.102	0.1	0.1	0.1	0.1	0.099	0.1	0.095	0.098	450						
		0.045	0.045	0.044	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	0.043	0.043	0.043	0.044	570						
		0.062	0.062	0.056	0.061	0.058	0.058	0.059	0.058	0.055	0.056	0.052	0.053	Delta						
		<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[Concentração]						
					<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	fator x de diluição						

FIG. 102B

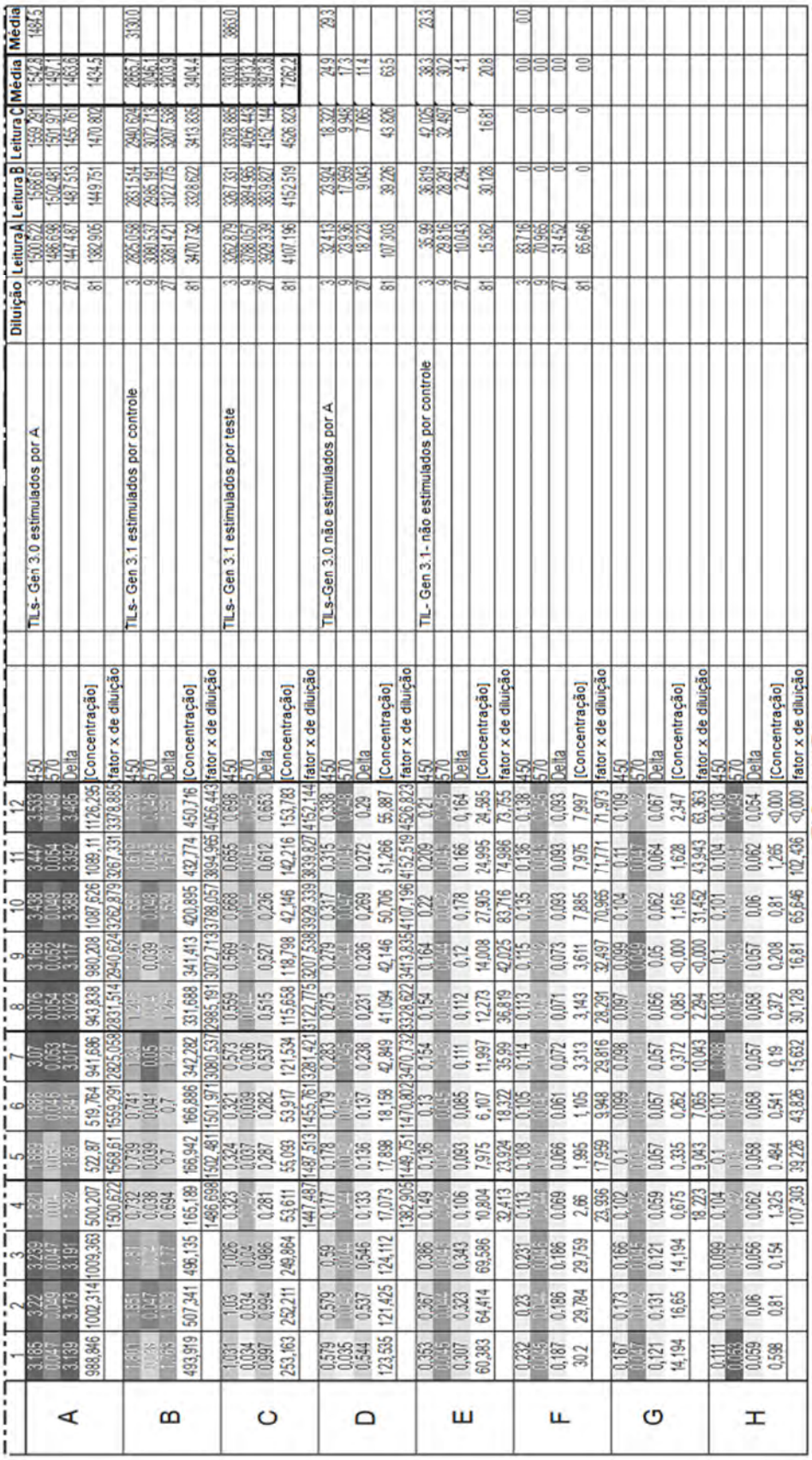
Dados de produção de IFN-γ do L4063 da Figura 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1 1000	STD1 1000	STD1 1000	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 3	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 3	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 3	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 3	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 3	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 3	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 3	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 3	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 3	ID de poço Conc/DI
B	STD2 500	STD2 500	STD2 500	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 9	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 9	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 9	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 9	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 9	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 9	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 9	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 9	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 9	ID de poço Conc/DI
C	STD3 250	STD3 250	STD3 250	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 27	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 27	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 27	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 27	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 27	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 27	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 27	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 27	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 27	ID de poço Conc/DI
D	STD4 125	STD4 125	STD4 125	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 81	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 81	TILs-Gen 3.0 estimulados por A 81	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 81	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 81	TILs-Gen 3.1 estimulados por B 81	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 81	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 81	TILs-Gen 3.1 estimulados por C 81	ID de poço Conc/DI
E	STD5 62.5	STD5 62.5	STD5 62.5	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 3	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 3	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 3	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 3	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 3	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 3	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 3	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 3	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 3	Conc/DI
F	STD6 31.3	STD6 31.3	STD6 31.3	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 9	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 9	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 9	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 9	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 9	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 9	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 9	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 9	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 9	ID de poço Conc/DI
G	STD7 15.6	STD7 15.6	STD7 15.6	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 27	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 27	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 27	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 27	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 27	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 27	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 27	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 27	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 27	ID de poço Conc/DI
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 81	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 81	TILs-Gen 3.0 não estimulados por A 81	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 81	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 81	TILs-Gen 3.1 não estimulados por B 81	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 81	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 81	TILs-Gen 3.1 não estimulados por C 81	ID de poço Conc/DI

TIL- Gen 3.0-A-Gen 3.0
TIL- Gen 3.1-B-Controle de Gen 3.1
TIL- Gen 3.1-C-Teste de Gen 3.1

22.6
22.6

FIG. 103A



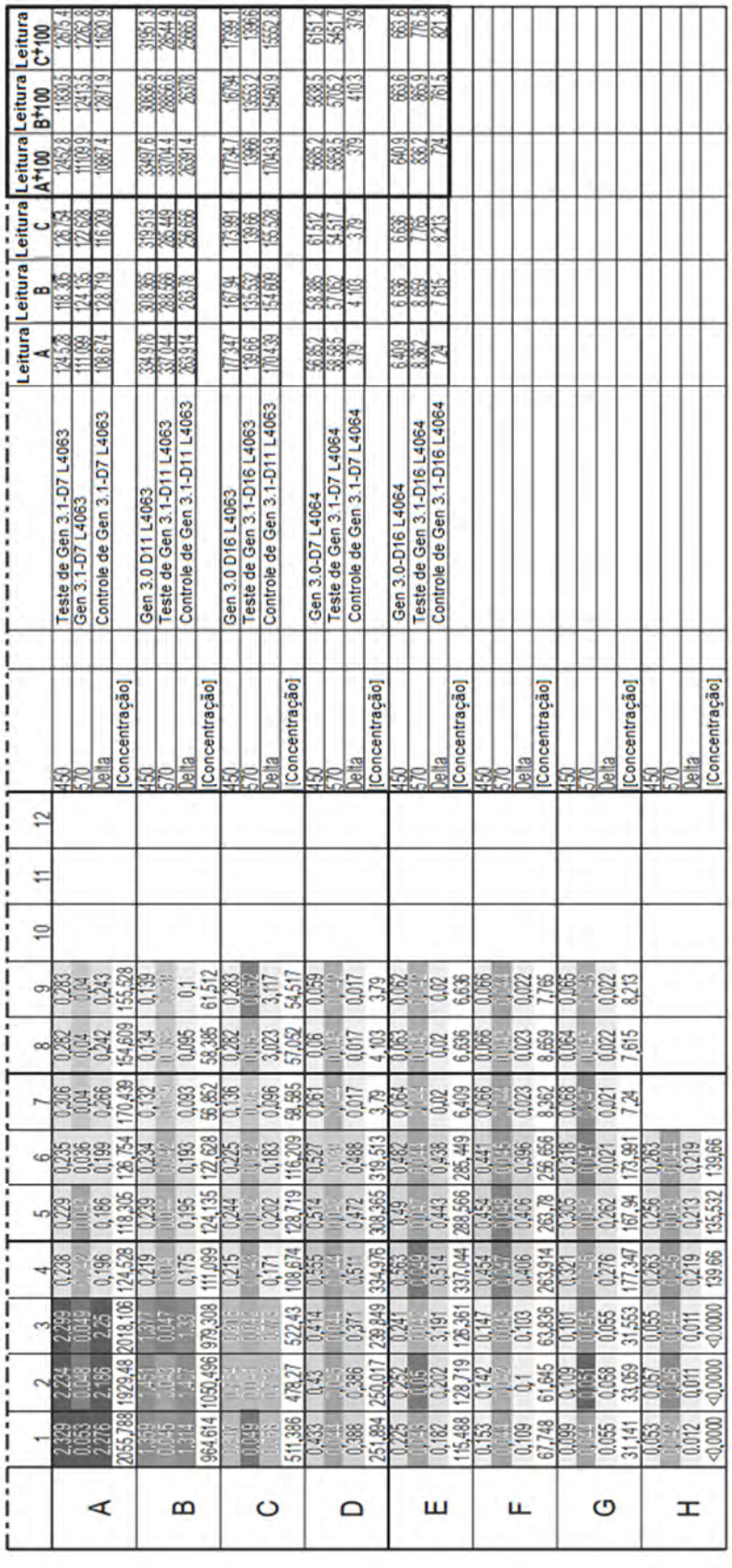
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		Diluição	Leitura A	Leitura B	Leitura C	Média	Média
A	3.165	3.22	3.259	3.321	3.889	3.886	3.07	3.076	3.168	3.438	3.447	3.533	TILs- Gen 3.0 estimulados por A	3	1.500.522	1.568.61	1.559.791	1.542.8	1.684.5
	0.047	0.049	0.047	0.044	0.046	0.046	0.053	0.054	0.052	0.049	0.054	0.048	570	9	1.466.636	1.502.451	1.501.911	1.490.333	
	3.169	3.173	3.191	3.192	3.185	3.241	3.017	3.023	3.117	3.389	3.392	3.486	Delta	27	1.447.487	1.487.513	1.455.761	1.463.6	1.463.6
	988.846	1.002.314	1.009.363	1.500.672	1.568.61	1.559.291	2.925.058	2.831.514	2.940.624	3.262.879	3.267.331	3.378.885	[Concentração]	81	1.382.905	1.449.751	1.470.802	1.434.5	
				1.500.207	522.87	519.764	941.686	943.838	980.208	1.087.626	1.089.11	1.126.295	fator x de diluição						
B	1.601	1.851	1.81	0.732	0.739	0.741	1.24	1.206	1.496	1.568	1.610	1.678	450	3	2.625.058	2.631.514	2.640.624	2.635.7	3.130.0
	0.047	0.047	0.047	0.038	0.039	0.041	0.05	0.041	0.039	0.048	0.045	0.046	570	9	3.061.547	2.495.191	3.072.713	3.043.1	
	1.648	1.898	1.86	0.694	0.7	0.7	1.29	1.247	1.535	1.616	1.655	1.724	Delta	27	3.081.421	3.122.775	3.207.538	3.137.2	
	493.919	507.341	496.135	165.189	166.942	166.886	342.282	331.688	341.413	420.895	432.774	450.716	[Concentração]	81	3.470.732	3.328.622	3.413.885	3.404.4	
				1.496.698	1.502.461	1.501.971	3.080.537	2.985.191	3.072.713	3.788.057	3.894.965	4.066.443	fator x de diluição						
C	1.031	1.103	1.026	0.323	0.324	0.321	0.573	0.559	0.569	0.668	0.655	0.698	450	3	3.862.879	3.967.231	3.978.888	3.936.3	3663.0
	0.034	0.034	0.04	0.037	0.037	0.039	0.036	0.041	0.04	0.044	0.045	0.045	570	9	3.766.057	3.924.965	4.066.443	3.919.2	
	0.997	0.994	0.966	0.281	0.287	0.282	0.537	0.515	0.527	0.236	0.612	0.653	Delta	27	3.909.330	3.939.827	4.152.144	3.993.8	
	253.163	252.211	249.864	53.611	55.093	53.917	121.534	115.658	118.798	42.146	140.216	153.783	[Concentração]	81	4.107.196	4.152.519	4.526.823	4.262.2	
				1.447.487	1.487.513	1.455.761	3.281.421	3.122.775	3.207.538	3.929.339	3.839.827	4.152.144	fator x de diluição						
D	0.579	0.579	0.59	0.177	0.178	0.179	0.283	0.275	0.279	0.317	0.315	0.338	450	3	32.413	23.924	18.322	24.9	29.3
	0.035	0.035	0.044	0.044	0.05	0.044	0.045	0.044	0.047	0.048	0.048	0.048	570	9	23.936	17.559	9.945	17.1	
	0.544	0.537	0.546	0.133	0.136	0.137	0.238	0.231	0.236	0.269	0.272	0.29	Delta	27	18.223	9.043	7.665	11.4	
	123.535	121.425	124.112	17.073	17.898	18.158	42.849	41.094	42.146	50.706	51.266	55.887	[Concentração]	81	107.393	39.226	43.806	63.5	
				1.382.905	1.449.751	1.470.802	3.470.732	3.328.622	3.413.835	4.107.196	4.152.519	4.526.823	fator x de diluição						
E	0.353	0.367	0.386	0.149	0.136	0.13	0.154	0.154	0.164	0.22	0.209	0.21	450	3	35.99	36.819	42.025	38.3	23.3
	0.045	0.045	0.045	0.044	0.045	0.045	0.044	0.044	0.044	0.045	0.045	0.045	570	9	29.816	28.291	32.497	30.2	
	0.307	0.323	0.343	0.106	0.093	0.085	0.111	0.112	0.12	0.178	0.166	0.164	Delta	27	10.043	2.294	0	4.1	
	60.383	64.414	69.586	10.804	7.975	6.107	11.997	12.273	14.008	27.905	24.995	24.585	[Concentração]	81	15.392	30.128	16.81	20.8	
				32.413	23.924	18.322	35.99	36.819	42.025	83.716	74.986	73.755	fator x de diluição						
F	0.232	0.23	0.231	0.113	0.103	0.105	0.114	0.113	0.115	0.135	0.136	0.138	450	3	83.716	0	0	0.0	0.0
	0.045	0.045	0.046	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.045	0.045	0.045	570	9	70.966	0	0	0.0	
	0.187	0.186	0.186	0.069	0.066	0.061	0.072	0.071	0.073	0.093	0.093	0.093	Delta	27	31.452	0	0	0.0	
	30.2	29.784	29.759	2.66	1.985	1.105	3.313	3.143	3.611	7.885	7.975	7.997	[Concentração]	81	65.646	0	0	0.0	
				23.936	17.959	9.948	29.816	28.291	32.497	70.966	71.771	71.973	fator x de diluição						
G	0.167	0.173	0.166	0.102	0.1	0.099	0.098	0.097	0.099	0.104	0.11	0.109	450						
	0.047	0.047	0.045	0.045	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	570						
	0.121	0.131	0.121	0.059	0.057	0.057	0.057	0.056	0.05	0.062	0.064	0.067	Delta						
	14.194	16.65	14.194	0.675	0.335	0.262	0.372	0.085	<0.000	1.165	1.628	2.347	[Concentração]						
				18.223	9.043	7.065	10.043	2.294	<0.000	31.452	43.943	63.363	fator x de diluição						
H	0.111	0.103	0.099	0.104	0.1	0.101	0.093	0.103	0.1	0.101	0.104	0.103	450						
	0.053	0.05	0.048	0.045	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	570						
	0.059	0.06	0.056	0.062	0.058	0.058	0.057	0.058	0.057	0.06	0.062	0.064	Delta						
	0.598	0.81	0.154	1.325	0.494	0.541	0.19	0.372	0.208	0.81	1.265	<0.000	[Concentração]						
				107.303	39.226	43.826	15.632	30.128	16.81	65.646	102.436	<0.000	fator x de diluição						

FIG. 103B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	STD1 2000	STD1 2000	STD1 2000	Teste de Gen 3.1-D7 L4063	Teste de Gen 3.1-D7 L4063	Teste de Gen 3.1-D7 L4063	Teste de Gen 3.1-D16 L4063	Teste de Gen 3.1-D16 L4063	Teste de Gen 3.1-D16 L4063	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	
B	STD2 1000	STD2 1000	STD2 1000	Controle de Gen 3.1 D7 L4063 L4063	Controle de Gen 3.1 D7 L4063 L4063	Controle de Gen 3.1 D7 L4063 L4063	Gen 3.0-D7 L4064	Gen 3.0-D7 L4064	Gen 3.0-D7 L4064	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	
C	STD3 500	STD3 500	STD3 500	Gen 3.0-D7 L4063	Gen 3.0-D7 L4063	Gen 3.0-D7 L4063	Controle de Gen 3.1-D7 L4064	Controle de Gen 3.1-D7 L4064	Controle de Gen 3.1-D7 L4064	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	
D	STD4 250	STD4 250	STD4 250	Controle de Gen 3.0 D11 L4063	Controle de Gen 3.0 D11 L4063	Controle de Gen 3.0 D11 L4063	Teste de Gen 3.1-D7 L4064	Teste de Gen 3.1-D7 L4064	Teste de Gen 3.1-D7 L4064	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	
E	STD5 125	STD5 125	STD5 125	Controle de Gen 3.1 D11 L4063	Controle de Gen 3.1 D11 L4063	Controle de Gen 3.1 D11 L4063	Gen 3.0-D16 L4064	Gen 3.0-D16 L4064	Gen 3.0-D16 L4064	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	
F	STD6 62.5	STD6 62.5	STD6 62.5	Teste de Gen 3.1-D11 L4063	Teste de Gen 3.1-D11 L4063	Teste de Gen 3.1-D11 L4063	Controle de Gen 3.1-D16 L4064	Controle de Gen 3.1-D16 L4064	Controle de Gen 3.1-D16 L4064	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	
G	STD7 31.3	STD7 31.3	STD7 31.3	Gen 3.0-D16 L4063	Gen 3.0-D16 L4063	Gen 3.0-D16 L4063	Teste de Gen 3.1-D16 L4063	Teste de Gen 3.1-D16 L4063	Teste de Gen 3.1-D16 L4063	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	Controle de Gen 3.1 D16 L4063	Controle de Gen 3.1 D16 L4063	Controle de Gen 3.1 D16 L4063	Vazio	Vazio	Vazio	Vazio	Vazio	Vazio	ID de poço Conc/Dil	D7=Dia 7= iniciação de REP D11= Dia 11= aumento de escala D16= Dia 16= colheita

23
23

FIG. 104A



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			Leitura A	Leitura B	Leitura C	Leitura A*100	Leitura B*100	Leitura C*100
A	2,329	2,224	2,299	0,238	0,229	0,235	0,306	0,282	0,283				450	Teste de Gen 3.1-D7 L4063	124,526	118,305	126,754	12452,8	11830,5	12675,4
	0,053	0,048	0,049			0,036	0,04	0,04	0,04				570	Gen 3.1-D7 L4063	111,089	124,155	122,628	11108,9	12415,5	12262,8
	2,276	2,186	2,25	0,196	0,186	0,199	0,266	0,242	0,243				Delta	Controle de Gen 3.1-D7 L4063	108,674	128,719	116,209	10867,4	12871,9	11620,9
	2055,788	1929,48	2018,106	124,528	118,305	126,754	170,439	154,609	155,528				[Concentração]							
B	0,359	0,351	0,377	0,219	0,239	0,234	0,132	0,134	0,139				450	Gen 3.0 D11 L4063	334,976	308,365	319,513	33497,6	30836,5	31951,3
	0,045	0,043	0,047										570	Teste de Gen 3.1-D11 L4063	337,044	288,449	288,449	33704,4	28844,9	28844,9
	0,314	0,308	0,33	0,175	0,195	0,193	0,093	0,095	0,1				Delta	Controle de Gen 3.1-D11 L4063	263,914	263,178	256,656	26391,4	26318	25665,6
	964,614	1050,496	979,308	111,099	124,135	122,628	56,852	58,386	61,512				[Concentração]							
C	0,516	0,504	0,515	0,215	0,244	0,225	0,136	0,262	0,283				450	Gen 3.0 D16 L4063	177,347	167,94	173,991	17734,7	16794	17399,1
	0,049	0,047	0,049						0,062				570	Teste de Gen 3.1-D16 L4063	139,66	135,532	139,66	13966	13553,2	13966
	0,467	0,457	0,466	0,171	0,202	0,183	0,096	3,023	3,117				Delta	Controle de Gen 3.1-D11 L4063	170,439	154,609	165,528	17043,9	15460,9	16552,8
	511,386	478,27	522,43	108,674	128,719	116,209	58,585	57,052	54,517				[Concentração]							
D	0,433	0,43	0,414	0,535	0,514	0,527	0,261	0,06	0,059				450	Gen 3.0-D7 L4064	56,862	58,385	61,512	5686,2	5838,5	6151,2
	0,044	0,043	0,044										570	Teste de Gen 3.1-D7 L4064	58,635	57,052	54,517	5863,5	5705,2	5451,7
	0,388	0,386	0,371	0,51*	0,472	0,488	0,017	0,017	0,017				Delta	Controle de Gen 3.1-D7 L4064	3,79	4,103	3,79	379	4103	379
	251,894	250,017	239,849	334,976	308,365	319,513	3,79	4,103	3,79				[Concentração]							
E	0,225	0,232	0,241	0,363	0,49	0,482	0,064	0,063	0,062				450	Gen 3.0-D16 L4064	6,409	6,636	6,636	640,9	663,6	663,6
	0,016	0,016	0,005	0,049									570	Teste de Gen 3.1-D16 L4064	8,367	8,659	7,765	836,7	865,9	776,5
	0,182	0,202	3,191	0,514	0,443	0,438	0,02	0,02	0,02				Delta	Controle de Gen 3.1-D16 L4064	724	7,615	8,213	724	761,5	821,3
	115,488	128,719	126,361	337,044	288,566	285,449	6,409	6,636	6,636				[Concentração]							
F	0,153	0,142	0,147	0,454	0,454	0,441	0,066	0,066	0,066				450							
	0,011			0,047	0,048	0,045							570							
	0,109	0,1	0,103	0,406	0,406	0,396	0,023	0,023	0,022				Delta							
	67,748	61,645	63,836	263,914	263,78	256,656	8,362	8,659	7,765				[Concentração]							
G	0,099	0,109	0,101	0,321	0,305	0,318	0,068	0,064	0,065				450							
	0,044	0,061	0,045										570							
	0,055	0,068	0,055	0,276	0,262	0,021	0,021	0,022	0,022				Delta							
	31,141	33,059	31,553	177,347	167,94	173,991	7,24	7,615	8,213				[Concentração]							
H	0,053	0,057	0,055	0,263	0,256	0,263							450							
	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,044							570							
	0,012	0,011	0,011	0,219	0,213	0,219							Delta							
	<0,0000	<0,0000	<0,0000	139,66	135,532	139,66							[Concentração]							

FIG. 104B

Petição 870210059669, de 01/07/2021, pág. 736/745

Número de amostra#	Descrição de otimização de Gen 3.1	Glicose (g/l)	Lactato (g/l)	Amônia (mmol/l)	Glutamina (mmol/l)	Glutamax (mmol/l)	Glutamax-Glutamina (mmol/l)
13	Gen 3.0-Dia 16 Primeira rodada #14063	1,52	1,07	2,06	1,91	2,11	0,20
14	Controle de Gen 3.1-Dia 16 Primeira rodada #L4063	0,90	1,74	2,50	1,34	1,49	0,15
15	Teste de Gen 3.1-Dia 16 Primeira rodada # 14063	0,96	1,64	2,49	1,33	1,47	0,14
16	Gen 3.0-Dia 11 Primeira rodada #14063	1,42	0,70	1,83	1,70	1,86	0,16
17	Controle de Gen 3.1-Dia 11 Primeira rodada #L4063	0,90	1,08	2,24	1,07	1,19	0,11
18	Teste de Gen 3.1-Dia 11 Primeira rodada # 14063	0,84	1,21	2,25	1,11	1,23	0,12
19	Gen 3.0-Dia 7 Primeira rodada #L4063	1,76	0,20	1,88	2,04	2,23	0,19
20	Controle de Gen 3.1-Dia 7 Primeira rodada #14063	1,73	0,22	1,86	2,00	2,19	0,19
21	Teste de Gen 3.1-Dia 7 Primeira rodada #L4063	1,41	0,50	1,96	1,98	2,15	0,17
22	Gen 3.0 Dia 16 Segunda rodada #14064	2,76	1,52	1,00	0,68	0,77	0,09
23	Controle de Gen 3.1-Dia 16 Segunda rodada #14064	2,14	1,95	0,99	0,64	0,73	0,08
24	Teste de Gen 3.1-Dia 16 Segunda rodada #L4064	2,20	1,89	0,94	0,64	0,71	0,07
25	Gen 3.0-Dia 7 Segunda rodada #14064	4,26	0,08	0,71	1,29	1,43	0,14
26	Controle de Gen 3.1-Dia 7 Segunda rodada #L4064	4,14	0,22	0,78	1,17	1,29	0,12
27	Teste de Gen 3.1-Dia 7 Segunda rodada # 14064	3,82	0,49	0,89	1,09	1,20	0,11

FIG. 105

Ordem	Nome		Média geométrica Sonda-fitc- A	Média geométrica Sonda-fitc- A	Média 1301	Média T	Comprimento relative a 1301	
A1	Gen 3.0-L4063	A1 10.1.fcs	86	42,5				
A2		A2 10.2.fcs	85,4	42,3	85,7	42,4		
A3		A3 10.3.fcs	4585	207				
A4		A4 10.4.fcs	4389	216	4487	211,5	7,684093	
A5	Controle de Gen 3.1-L4063	A5 11.1.fcs	82,7	33,3				
A6		A6 11.2.fcs	86	32,9	84,35	33,1		
A7		A7 11.3.fcs	4696	180				
A8		A8 11.4.fcs	4641	175	4668,5	177,5	6,299968	
B1	Teste de Gen 3.1- L4063	B1 12.1.fcs	95,1	28,8				
B2		B2 12.2.fcs	84,7	26,7	89,9	27,75		
B3		B3 12.3.fcs	4764	169				
B4		B4 12.4.fcs	4800	174	4782	171,5	6,12732	
B5	Gen 3.0 - L4064	B5 13.1.fcs	101	40,3				
B6		B6 13.2.fcs	89,6	34,1	95,3	37,2		
B7		B7 13.3.fcs	4300	174				
B8		B8 13.4.fcs	4367	172	4333,5	173	6,408381	
C1	Controle de Gen 3.1-L4064	C1 14.1.fcs	92,1	31,1				
C2		C2 14.2.fcs	88,6	29,6	90,35	30,35		
03		C314.3.fcs	4111	169				
04		C414.4 fcs	4443	172	4277	170,5	6,69509	
05	Teste de Gen 3.1- L4064	C515.1.fcs	89,7	25,7				
C6		C615.2.fcs	85,7	24,7	87,7	25,2		
07		C715.3.fcs	4342	172				
C8		C815.4 fcs	4560	166	4451	169	6,591341	

FIG. 106

Frequências compartilhadas

Sujeito	Amostra original	Contagem de uCDR3	Amostra comparada	Contagem de uCDR3	Contagem de uCDR3 compartilhada	Contagem de uCDR3
L4063	L63GA	14005	L63GB	18149	3240	23,13459479
L4063	L63GA	14005	L63GC	17181	2959	21,12816851
L4063	L63GA	15107	L63GB	21460	5486	36,31429139
L4063	L63GA	15107	L63GC	21503	5541	36,67836102
Código:	L63GA = L4063 Gen3.0					
	L63GB = L4063 Controle de Gen 3.1					
	L63GC = L4063 Teste de Gen 3.1					
	L64GA = Gen 3.0 L4064					
	L64GB = Controle de Gen 3.1 L4064					
	L64GC = Teste de Gen 3.1 L4064					

Primeiros 80%

Sujeito	Amostra 1	Contagem de uCDR3	Amostra 2	Contagem de uCDR3	Contagem de uCDR3 compartilhada	% compartilhada de col B
L4063	L63GA	1104	L63GB	2437	1000	90,57971
L4063	L63GA	1104	L63GC	2331	975	88,31522
L4063	L63GA	2478	L63GB	3246	2186	88,2163
L4063	L63GA	2478	L63GC	3263	2163	87,28814
Código:	L63GA = Gen 3.0 L4063					
	L63GB = Controle de Gen 3.1 L4063					
	L63GC = Teste de Gen 3.1 L4O63					
	L64GA = Gen 3.0 L4064					
	L64GB = Controle de Gen 3.1 L4064					
	L64GC = Teste de Gen 3.1 L4064					

FIG. 107

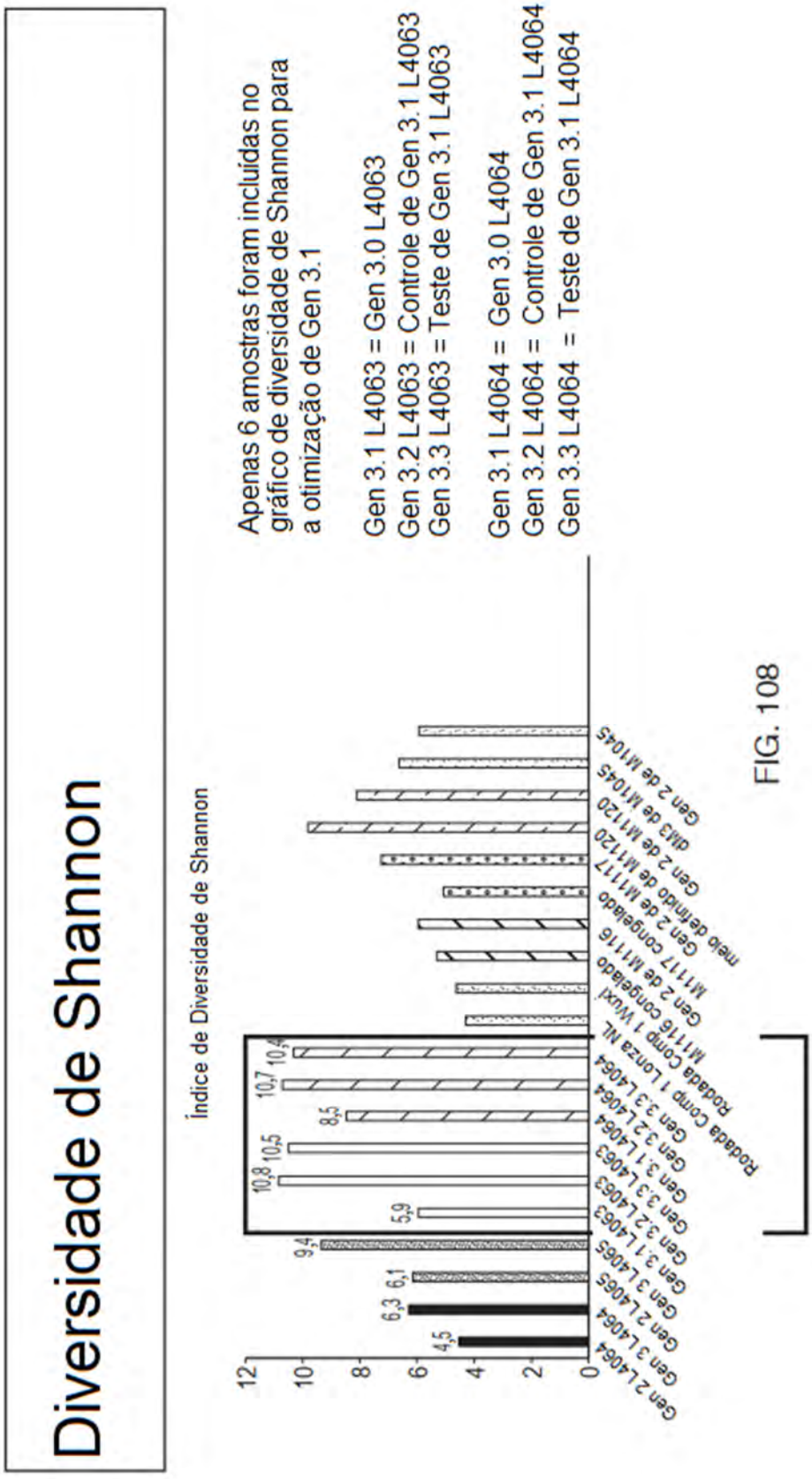

Diversidade de Shannon
Índice de Diversidade de Shannon
Apenas 6 amostras foram incluídas no gráfico de diversidade de Shannon para a otimização de Gen 3.1
Gen 3.1 L4063 = Gen 3.0 L4063
Gen 3.2 L4063 = Controle de Gen 3.1 L4063
Gen 3.3 L4063 = Teste de Gen 3.1 L4063
Gen 3.1 L4064 = Gen 3.0 L4064
Gen 3.2 L4064 = Controle de Gen 3.1 L4064
Gen 3.3 L4064 = Teste de Gen 3.1 L4064
0
2
4
6
8
10
12
4,5
6,3
6,1
9,4
5,9
10,8
10,5
8,5
10,7
10,4
Gen 2 L4064
Gen 3 L4064
Gen 2 L4065
Gen 3 L4065
Gen 3.1 L4063
Gen 3.2 L4063
Gen 3.3 L4063
Gen 3.1 L4064
Gen 3.2 L4064
Gen 3.3 L4064
Rodada Comp 1 Lonza NL
Rodada Comp 1 Wuxi
M1116 congelado
M1117 congelado
Gen 2 de M1116
Gen 2 de M1117
meio de final
Gen 2 de M1120
dia3 de M1120
dia3 de M1045
Gen 2 de M1045

FIG. 108

Processo 2A: cerca de 22 dias a partir das Etapas A - E

1. ETAPA A

Obter amostra de tumor de paciente

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 sistema fechado

4. ETAPA D

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

5. ETAPA E

Colher TILs da ETAPA D
Sistema fechado

6. ETAPA F

Formulação final e/ou transferência para bolsa de infusão
(opcionalmente criopreservar)

FIG. 109

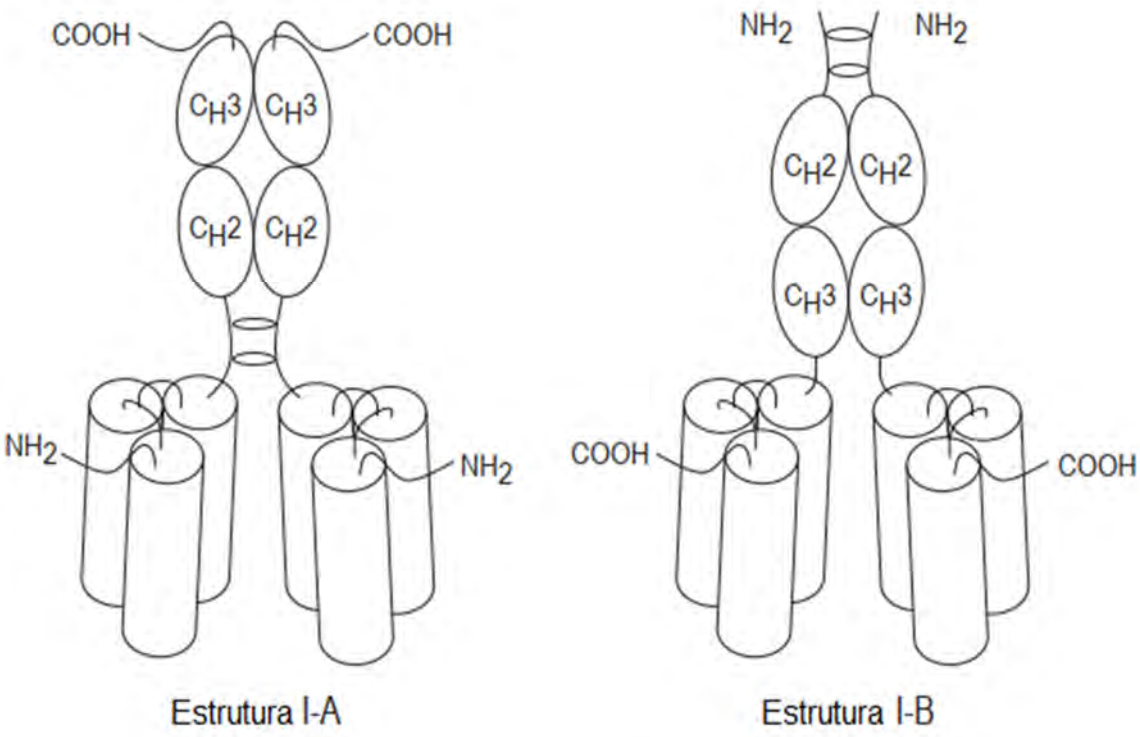

COOH
COOH
C_H3
C_H3
C_H2
C_H2
NH_2
NH_2
Estrutura I-A
NH_2
NH_2
C_H2
C_H2
C_H3
C_H3
COOH
COOH
Estrutura I-B

FIG. 110

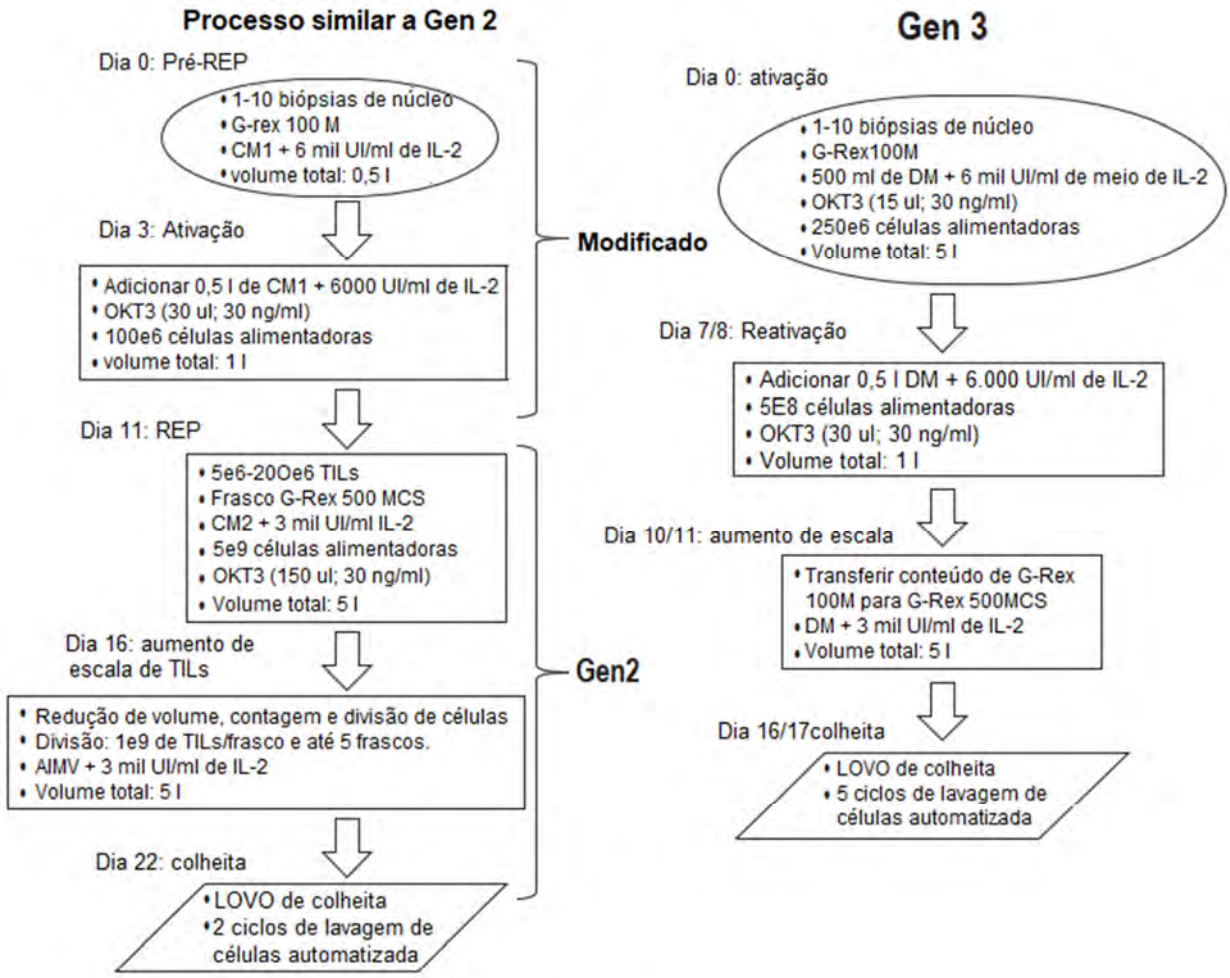

Processo similar a Gen 2
Gen 3
Dia 0: Pré-REP
• 1-10 biópsias de núcleo
• G-rex 100 M
• CM1 + 6 mil UI/ml de IL-2
• volume total: 0,5 l
Dia 3: Ativação
• Adicionar 0,5 l de CM1 + 6000 UI/ml de IL-2
• OKT3 (30 ul; 30 ng/ml)
• 100e6 células alimentadoras
• volume total: 1 l
Modificado
Dia 11: REP
• 5e6-20Oe6 TILs
• Frasco G-Rex 500 MCS
• CM2 + 3 mil UI/ml IL-2
• 5e9 células alimentadoras
• OKT3 (150 ul; 30 ng/ml)
• Volume total: 5 l
Dia 16: aumento de escala de TILs
• Redução de volume, contagem e divisão de células
• Divisão: 1e9 de TILs/frasco e até 5 frascos.
• AIMV + 3 mil UI/ml de IL-2
• Volume total: 5 l
Gen2
Dia 22: colheita
• LOVO de colheita
• 2 ciclos de lavagem de células automatizada
Dia 0: ativação
• 1-10 biópsias de núcleo
• G-Rex100M
• 500 ml de DM + 6 mil UI/ml de meio de IL-2
• OKT3 (15 ul; 30 ng/ml)
• 250e6 células alimentadoras
• Volume total: 5 l
Dia 7/8: Reativação
• Adicionar 0,5 l DM + 6.000 UI/ml de IL-2
• 5E8 células alimentadoras
• OKT3 (30 ul; 30 ng/ml)
• Volume total: 1 l
Dia 10/11: aumento de escala
• Transferir conteúdo de G-Rex 100M para G-Rex 500MCS
• DM + 3 mil UI/ml de IL-2
• Volume total: 5 l
Dia 16/17colheita
• LOVO de colheita
• 5 ciclos de lavagem de células automatizada

FIG. 111

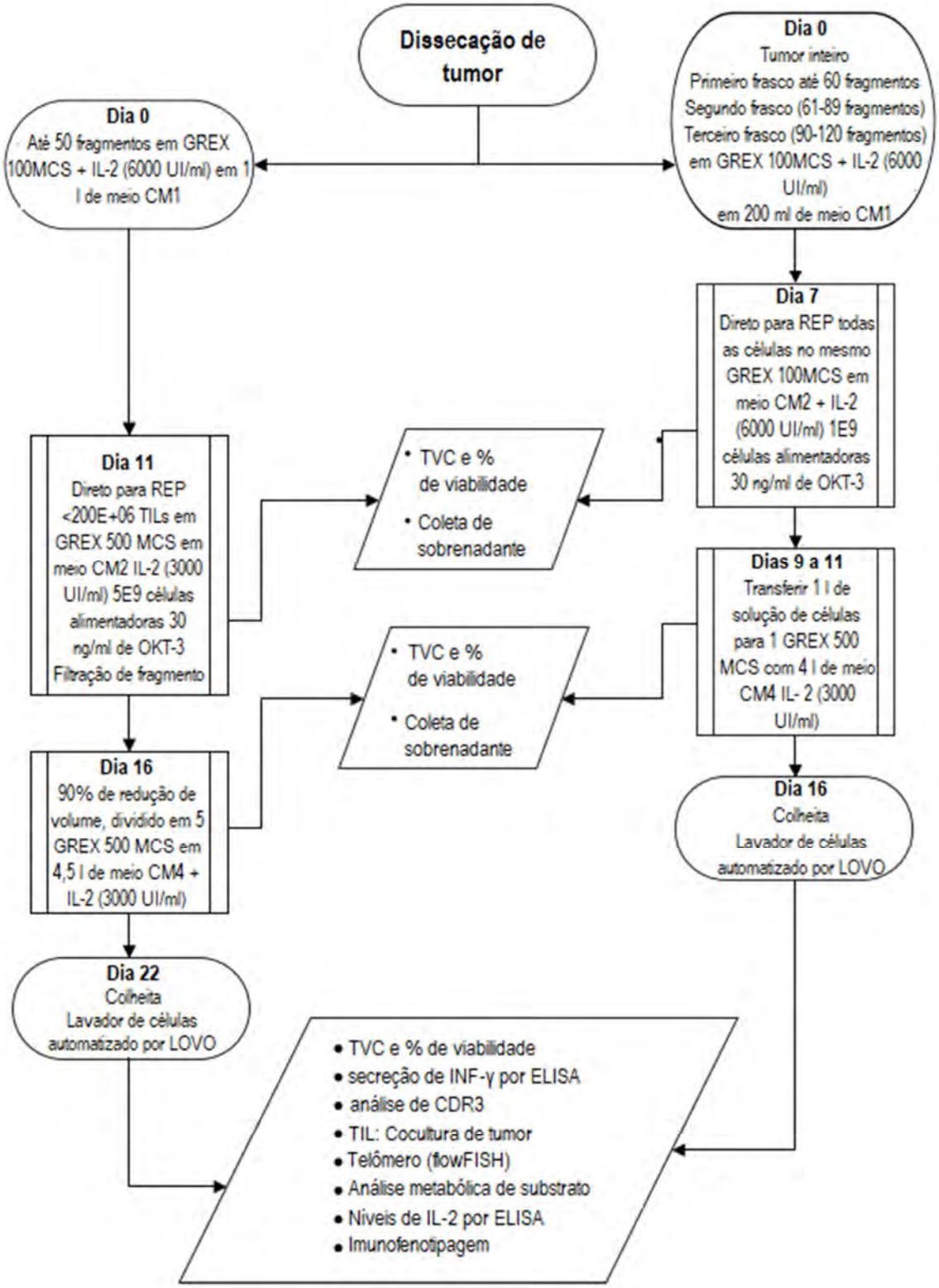

Dissecação de tumor
Dia 0
Até 50 fragmentos em GREX 100MCS + IL-2 (6000 UI/ml) em 1 l de meio CM1
Dia 0
Tumor inteiro
Primeiro frasco até 60 fragmentos
Segundo frasco (61-89 fragmentos)
Terceiro frasco (90-120 fragmentos)
em GREX 100MCS + IL-2 (6000 UI/ml)
em 200 ml de meio CM1
Dia 7
Direto para REP todas as células no mesmo GREX 100MCS em meio CM2 + IL-2 (6000 UI/ml) 1E9 células alimentadoras 30 ng/ml de OKT-3
Dia 11
Direto para REP <200E+06 TILs em GREX 500 MCS em meio CM2 IL-2 (3000 UI/ml) 5E9 células alimentadoras 30 ng/ml de OKT-3 Filtração de fragmento
• TVC e % de viabilidade
• Coleta de sobrenadante
Dias 9 a 11
Transferir 1 l de solução de células para 1 GREX 500 MCS com 4 l de meio CM4 IL- 2 (3000 UI/ml)
• TVC e % de viabilidade
• Coleta de sobrenadante
Dia 16
90% de redução de volume, dividido em 5 GREX 500 MCS em 4,5 l de meio CM4 + IL-2 (3000 UI/ml)
Dia 16
Colheita
Lavador de células automatizado por LOVO
Dia 22
Colheita
Lavador de células automatizado por LOVO
• TVC e % de viabilidade
• secreção de INF-γ por ELISA
• análise de CDR3
• TIL: Cocultura de tumor
• Telômero (flowFISH)
• Análise metabólica de substrato
• Níveis de IL-2 por ELISA
• Imunofenotipagem

FIG. 112

RESUMO

MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR EM UMA POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, PARA TRATAR UM SUJEITO COM CÂNCER E DE EXPANSÃO DE CÉLULAS T, POPULAÇÃO TERAPÊUTICA DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, SACO DE INFUSÃO ESTÉRIL, PREPARAÇÃO CRIOPRESERVADA, E, USO DA COMPOSIÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR

A presente invenção refere-se a métodos melhorados e/ou encurtados para expandir TILs e produzir populações terapêuticas de TILs, incluindo métodos inovadores para expandir populações de TILs em um sistema fechado que leva à eficácia melhorada, fenótipo melhorado e saúde metabólica aumentada dos TILs em um período mais curto de tempo, enquanto permite a contaminação microbiana reduzida, bem como custos reduzidos. Tais TILs encontram uso em regimes de tratamento terapêutico.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 99610408.txt
- Data de Geração do Código: 08/10/2021
- Hora de Geração do Código: 16:25:04
- Código de Controle:
  - Campo 1: 3D9B0D252717D0D5
  - Campo 2: A07CE4B542CC9346