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

(21) BR 112020011223-2 A2

(22) Data do Depósito: 07/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) Título: MARCADORES FENOTÍPICOS PARA TERAPIA CELULAR E MÉ-TODOS RELACIONADOS

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

(30) Prioridade Unionista: 08/12/2017 US 62/596,775; 09/08/2018 US 62/716,967; 13/04/2018 US 62/657,716; 14/03/2018 US 62/643,165.

(71) Depositante(es): JUNO THERAPEUTICS INC.

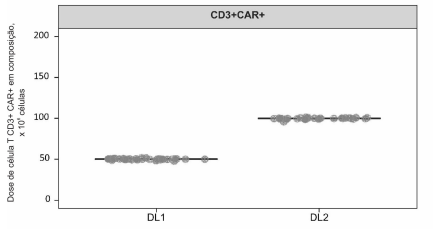
(72) Inventor(es): RYAN P. LARSON; CHRISTOPHER GLEN RAMSBORG; CLAIRE L. SUTHERLAND; KEDAR HIMANSHU DAVE; NATHAN K. YEE; RACHEL K. YOST; RONALD JAMES HAUSE JR.; TODD DEVRIES.

(86) Pedido PCT: PCT US2018064630 de 07/12/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/113559 de 13/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 04/06/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos, composições e artigos de fabricação para uso em terapia celular envolvendo a administração de uma ou mais doses de uma composição terapêutica de células T, e métodos, composições e artigos de fabricação para uso na mesma. As células da composição de célula T expressam receptores recombinantes, tais como receptores quiméricos, por exemplo, receptores antigênicos quiméricos (CARs) ou outros receptores transgênicos, tal como receptores de células T (TCRs). As características das modalidades da presente divulgação, incluindo a dose de células ou unidades de células administradas e/ou o fenótipo de células administradas, fornecem várias vantagens, tais como dosagem consistente, menor risco de toxicidade e/ou maior resposta em objetos administrados com as composições de célula T.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MARCADORES FENOTÍPICOS PARA TERAPIA CELULAR E MÉTODOS RELACIONADOS".**

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[0001] [1] Este pedido reivindica prioridade do pedido provisório 62/596.775 U.S., depositado em "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS," Pedido Provisório U.S. No. 62/643,165, depositado em 14 de março de 2018, intitulado "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS," Pedido Provisório U.S. No. 62/657,716, depositado em 13 de abril de 2018, intitulado "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS," e Pedido Provisório U.S. No. 62/716,967, depositado em 9 de agosto de 2018, intitulado "PHENOTYPIC MARKERS FOR CELL THERAPY AND RELATED METHODS," cujo conteúdo é incorporado por referência em sua totalidade.

Incorporação para Referência de Listagem de Sequências

[0002] O presente pedido está sendo apresentado juntamente com uma Listagem de Sequências em formato eletrônico. A Listagem de sequência é fornecida como um arquivo intitulado 735042014540Seq List.txt, criado em 7 de dezembro de 2018, com 35.461 bytes de tamanho. As informações no formato eletrônico da Listagem de Sequências são incorporadas por referência em sua totalidade.

Campo

[0003] A presente descrição refere-se à terapia celular que envolve a administração de uma ou mais doses de uma composição terapêutica de células T, e métodos, composições e artigos de fabricação para uso na mesma. As células da composição de célula T expressam receptores recombinantes, tais como receptores quiméricos, por exemplo, receptores antigênicos quiméricos (CARs) ou outros receptores transgênicos, tais como receptores de células T (TCRs). As carac-

terísticas das modalidades da presente descrição, incluindo a dose de células ou unidades de células administradas e/ou o fenótipo de células administradas, fornecem várias vantagens, como dosagem consistente, menor risco de toxicidade e/ou maior resposta em objetos administrados pelas composições de célula T.

Antecedentes

[0004] Vários métodos de imunoterapia e/ou terapia celular estão disponíveis para o tratamento de doenças e condições. Por exemplo, terapias celulares adotivas (incluindo aquelas que envolvem a administração de células que expressam receptores quiméricos específicos para uma doença ou distúrbio de interesse, como receptores de antígenos quiméricos (CARs) e/ou outros receptores de antígenos recombinantes, bem como outras células imunes adotivas e terapias adotivas de células T) podem ser benéficas no tratamento de câncer ou outras doenças ou distúrbios. Abordagens aperfeiçoadas são necessárias. São fornecidos métodos e artigos de fabricação que atendem a essas necessidades.

Sumário

[0005] São fornecidas aqui composições terapêuticas contendo células T que expressam um receptor recombinante, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 50% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 60% do núme-

ro total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 80% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

[0006] Em algumas modalidades, as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD4^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$ e $CD4^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD8^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD4^+$; e/ou as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em aproximadamente 1:1 ou aproximadamente entre 1:3 e 3:1 ou aproximadamente entre 1:2 e 2:1, células T $CD4^+$:$CD8^+$.

[0007] São aqui fornecidos métodos, composições e artigos de fabricação que envolvem ou compreendem uma dose unitária de células com base em um número definido, tal como um subtipo de células

T CD8$^+$ ou um subtipo de células T CD4$^+$ ou suas células que expressam um receptor recombinante, ou uma razão de tal subtipo de células T CD8$^+$ e CD4$^+$. Em algumas modalidades, o número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição expressando o receptor recombinante, é positivo para superfície para CCR7. Em algumas modalidades, o número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição expressando o receptor recombinante é positivo para superfície para CD27. Em algumas modalidades, o número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição expressando o receptor recombinante, é positivo para superfície para CCR7 e CD27. Em algumas modalidades, a composição compreende uma ou mais doses unitárias de células.

[0008] Em algumas modalidades, o subtipo de células é positivo para um marcador de superfície celular, como um marcador de um fenótipo de memória central e/ou no qual o marcador de superfície celular é CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, os métodos, composições e artigos de fabricação fornecidos são para uso em conexão com a terapia celular, como terapia de células T manipuladas geneticamente para o tratamento de doenças e condições, incluindo vários tumores.

[0009] São aqui fornecidos artigos de fabricação. Em algumas modalidades, os artigos de fabricação fornecidos incluem um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitárias de células, presentes em uma ou mais composição terapêutica, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ expressando (opcionalmente manipuladas geneticamente para expressar) um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam (opcionalmente expressam superfície) receptor de

quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[0010] São aqui fornecidos artigos de fabricação. Em algumas modalidades, os artigos de fabricação fornecidos incluem um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitárias de células, presentes em uma ou mais composição terapêutica, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ expressando (opcionalmente manipuladas geneticamente para expressar) um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam (opcionalmente expressam superfície) um cluster de diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um conjunto definido número de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células +/CD4$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^{+/}$CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[0011] Também são fornecidas aqui composições terapêuticas.

Em algumas modalidades, a composição terapêutica compreende células T que expressam um receptor recombinante, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição (ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante) são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente em que: as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD4^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$ e $CD4^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD8^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD4^+$; as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em aproximadamente 1:1 ou aproximadamente entre 1:3 e 3:1 ou aproximadamente entre 1:2 e 2:1, células T $CD4^+$:$CD8^+$.

[0012] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende qualquer uma das composições terapêuticas aqui descritas.

[0013] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+$/$CCR7^+$; e/ou em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+$/$CCR7^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+$/$CD27^+$; e/ou em que a dose unitária de células compreende um número definido de células

$CD4^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$; e/ou em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$.

[0014] Em algumas modalidades, a dose unitária ou composição compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD4^+$), células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais, receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais, receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais ou receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais, cada uma inclusive, e/ou a dose unitária ou composição compreende não mais do que 1×10^8, não mais do que 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6 ou não mais do que cerca de 5×10^5 células receptor$^+$/$CD8^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais.

[0015] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais ou receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times 10^7$, entre em ou cerca de 4×10^6 e em ou cerca de 2×10^7, ou entre em ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times$

10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[0016] Em algumas modalidades, a dose unitária de células ou composição compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[0017] Em algumas modalidades, a dose unitária de células ou composição compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1. Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CCR7 e/ou CD45RA nas células. Em algumas modalidades, o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CCR7 e/ou CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente são células CCR7$^+$ ou CD45RA$^-$.

[0018] Em algumas modalidades, o número ou razão definido é

adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD27 e/ou CD45RA nas células. Em algumas modalidades, o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CD27 e/ou CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente são células $CD27^+$ ou $CD45RA^-$. Em algumas modalidades, o número definido compreende adicionalmente células que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45RA, opcionalmente em que o número definido compreende adicionalmente células $CD27^+$ ou $CD45RA^-$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células ou composição compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células ou composição compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

[0019] Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células $receptor^+$ totais na dose unitária são $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

[0020] Também são aqui fornecidos artigos de fabricação, que incluem: um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitárias de células, presentes em uma ou mais composições terapêuticas, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ expressando, opcionalmente manipuladas geneticamente para expressar, um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 ($receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ células) e/ou um número definido de células T $CD4^+$

expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma definida razão de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD8$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD8$^+$) ou células CD4$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD4$^+$), células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6, ou não mais de cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[0021] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x

10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[0022] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[0023] Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD45RA nas células. Em algumas modalidades, o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente são células CD45RA$^-$. Em algumas modalidades, o número definido compreende adicionalmente células que expressam ou não expressam CD45RA, opcionalmente em que o número definido compreende adicionalmente células CD45RA$^-$.

[0024] Em algumas modalidades, entre uma pluralidade de artigos ou doses ou composições unitárias, opcionalmente produzidas de

acordo com o mesmo método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária varia em não mais de 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[0025] Em algumas modalidades, a dose unitária ou o número de células que expressam o receptor recombinante compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 5×10^8, entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD3^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD3^+$) ou células $CD3^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária ou o número de células que expressam o receptor recombinante compreende não mais do que cerca de 5×10^8, não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6 ou não mais do que cerca de 5×10^5 células $receptor^+/CD3^+$ totais ou células $CD3^+$ totais.

[0026] Em algumas modalidades, o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ é o número total de células vivas ou viáveis. Em algumas modalidades, o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, número total de células recep-

tor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, total número de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células que não expressam um marcador apoptótico e/ou o número total de células que são negativas (-) para marcador apoptótico, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[0027] Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas. Em algumas modalidades, a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição compreende as células T CD8$^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição compreende as células T CD4$^+$.

[0028] Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar a composição contendo células T CD8$^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T CD4$^+$ ou uma ou mais doses unitárias e/ou volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

[0029] Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar a composição contendo células T CD8$^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo

células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias. Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[0030] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é um antígeno tumoral.

[0031] Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina Motivo C-C (CCL-1)), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD138, CD171, proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo do re-

ceptor Fc 5 ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), receptor de proteína G acoplada à proteína 5D (GPCR5 D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-AI), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor do domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), tirosina quinase de receptor tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), tumor 1 de Wilms (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou biotinilado moléculas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[0032] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um frag-

mento de ligação a antígeno do mesmo ou TCR. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[0033] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única. Em algumas modalidades, o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível. Em algumas modalidades, o fragmento compreende um scFv.

[0034] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende uma região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

[0035] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório compre-

ende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[0036] Em algumas modalidades, as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto.

[0037] Também são fornecidos neste documento métodos de tratamento. Em algumas modalidades, os métodos de tratamento envolvem administrar a um objeto tendo uma doença ou condição uma ou mais doses unitárias de qualquer composição terapêutica aqui descrita ou uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células recombinantes que expressam receptores Células T $CD4^+$ que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição; e/ou entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária não variam mais que 40%, não mais do

que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[0038] Também são fornecidos neste documento métodos de tratamento. Em algumas modalidades, os métodos de tratamento envolvem administrar a um objeto tendo uma doença ou condição uma ou mais doses unitárias de uma composição terapêutica aqui descrita ou uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, opcionalmente em que: o a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam um cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; e/ou entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CD27 (células $CD27^+$) na dose unitária varia não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[0039] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CD27^+$.

[0040] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número defi-

nido de células $CD4^+/CCR7^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD4^+$), células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais de cerca de 5×10^5 células receptor$^+$/$CD8^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor +/$CD4^+$/$CD27^+$ totais.

[0041] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 células receptor$^+$/$CD8^{+/}$$CCR7^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais ou receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times 10^7$, entre em ou cerca de 4×10^6 e em ou cerca de 2×10^7, ou entre em ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times 10^7$, entre em ou cerca de 4×10^6 e em ou cerca de 2×10^7, ou entre em ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células recep-

tor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[0042] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[0043] Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD27 e/ou CD45RA nas células. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1. Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de

expressão de CCR7 e/ou CD45RA nas células. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[0044] Em algumas modalidades, também são fornecidos métodos de tratamento, em que os métodos envolvem a administração a um objeto tendo uma doença ou condição de uma ou mais doses unitárias de qualquer composição aqui descrita.

[0045] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptores recombinantes que expressam CCR7 e CD27 (receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células CCR7$^+$) na dose unitária variam em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[0046] Também são aqui fornecidos métodos de tratamento, em que os métodos envolvem administrar a um objeto tendo uma doença ou condição uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente

a tais doses unitárias. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para $receptor^+$/ células $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; e entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária não variam mais que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[0047] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais de cerca de 5×10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+$/

$CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais.

[0048] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 receptor total +/$CD8^+$ Células/$CCR7^+/CD27^+$; e/ou pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times 10^7$, entre em ou cerca de 4×10^6 e em ou cerca de 2×10^7, ou entre em ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais; e/ou entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times 10^7$, entre em ou cerca de 4×10^6 e em ou cerca de 2×10^7, ou entre em ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células $receptor^+$ totais na dose unitária são $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$.

[0049] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[0050] Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD45RA nas células. Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado no número de células $CD45RA^-$. Em algumas modalidades, o número definido de células adicionalmen-

te expressa ou não expressa CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente são células $CD45RA^-$.

[0051] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 5×10^8, entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD3^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD3^+$) ou células $CD3^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 5×10^8, não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais do que cerca de 5×10^5 células $receptor^+/CD3^+$ totais ou células $CD3^+$ totais.

[0052] Em algumas modalidades, o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ é o número total de células vivas ou viáveis. Em algumas modalidades, o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/$

CCR7$^+$/CD27$^+$, total número de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células que não expressam um marcador apoptótico e/ou o número total de células negativas (-) para marcador apoptótico, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[0053] Em algumas modalidades, o método envolve administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

[0054] Em algumas modalidades, a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição compreende as células T CD8$^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição compreende as células T CD4$^+$.

[0055] Em algumas modalidades, o método envolve administrar a composição contendo células T CD8$^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T CD4$^+$ ou uma ou mais doses unitárias e/ou volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

[0056] Em algumas modalidades, o método envolve administrar a composição contendo células T CD8$^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes de administrar a composição contendo células CD4$^+$ ou uma ou mais doses unitárias e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias. Em algumas modalidades, o método en-

volve administrar a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes de administrar a composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[0057] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é um antígeno tumoral.

[0058] Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), antígeno de câncer de testículo, antígeno câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina Motivo C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor da efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo 5 do receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100

(gp100), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção da quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão celular L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor de tirosina quinase tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína associada a tumor 72 (TAG72), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), tumor 1 de Wilms (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[0059] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno funcional não-TCR ou um TCR ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[0060] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única. Em algumas modalidades, o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível. Em algumas modalidades, em que o fragmento compreende um scFv.

[0061] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende uma região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

[0062] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório com-

preende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[0063] Em algumas modalidades, as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto.

[0064] Também são fornecidos neste documento métodos para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente para tratar um objeto. Em algumas modalidades, o método compreende avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 ($receptor^+/CCR7^+$). Em algumas modalidades, o método compreende, com base no número, porcentagem ou razão de células $receptor^+/CCR7^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células para administração em um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ que expressam receptores recombinantes que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0065] Também são fornecidos neste documento métodos para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente

para o tratamento de um objeto. Em algumas modalidades, o método envolve (a) avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CD27 ($receptor^+/CD27^+$); e (b) com base no número, porcentagem ou razão de células $receptor^+/CD27^+$, determinando uma ou mais doses unitárias de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de expressão de receptor recombinante Células T $CD8^+$ que expressam cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0066] Também são aqui fornecidos métodos de produção de uma composição compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T. Em algumas modalidades, o método compreende avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e CD27 ($receptor^+/CCR7^+/CD27^+$). Em algumas modalidades, o método compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção da composição e, opcionalmente, outra solução para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante

que expressam receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição. Em algumas modalidades, o método compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção da composição e, opcionalmente, outra solução para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressa cluster de diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0067] Também são aqui fornecidos métodos de produção de uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T. Em algumas modalidades, o método compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que se liga especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária de a composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número

definido de células recombinantes que expressam receptores Células T $CD4^+$ que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0068] Também são fornecidos neste documento métodos de produção de uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T. Em algumas modalidades, o método compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que se liga especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam um cluster de diferenciação 27 (CD27) ($receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0069] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+$.

[0070] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o re-

ceptor recombinante (células receptor$^+$/CD8$^+$) ou células CD4$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD4$^+$), células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6, ou não mais de cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

[0071] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma

inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[0072] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[0073] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células CD27$^+$ ou CD45RA$^-$.

[0074] Em algumas modalidades, os métodos compreendem adicionalmente avaliar na composição terapêutica o número, porcentagem ou razão de células T que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45RA, opcionalmente o número, porcentagem ou razão de células T que são CD27$^+$ ou CD45RA$^-$.

[0075] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[0076] Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na do-

se unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[0077] Também são fornecidos neste documento métodos para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente para o tratamento de um objeto. Em algumas modalidades, o método compreende avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e CD27 (receptor$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$). Em alguma modalidade, o método compreende, com base no número, porcentagem ou razão de células receptor$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células +/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam células CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0078] Também são aqui fornecidos métodos de produção de uma composição compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T. Em algumas modalidades, o método compreende avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ manipuladas geneticamente para expressar

um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e CD27 (receptor$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$). Em algumas modalidades, o método compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção da composição e, opcionalmente, outra solução para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0079] Também são fornecidos neste documento métodos de produção de uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T. Em algumas modalidades, o método compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que se liga especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária de a composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ células) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células recep-

tor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0080] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[0081] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD8$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD8$^+$) ou células CD4$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD4$^+$), células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6, ou não mais de cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[0082] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x

10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[0083] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[0084] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células CD45RA$^-$. Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente avaliar na composição terapêutica o número, porcentagem ou razão de células T que expressam ou não expressam CD45RA, opcionalmente o número, porcentagem ou razão de células T que são CD45RA$^-$.

[0085] Também são fornecidos métodos para gerar uma composição de célula que compreende células geneticamente modificadas. Em algumas modalidades, o método envolve fornecer, a partir de uma amostra biológica de um objeto, uma composição de entrada compreendendo uma porcentagem alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em algumas modalidades, o método envolve in-

troduzir, na composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante. Em algumas modalidades, o método envolve estimular as células na composição de entrada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, em que a estimulação compreende incubar as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, os referidos resultados estimulantes na ativação e/ou proliferação das células. Em algumas modalidades, o método produz uma composição de saída que compreende uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante ($receptor^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T $receptor^+/CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, e/ou uma razão definida de células T $receptor^+/CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T $receptor^+/CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[0086] Também são fornecidos métodos para gerar uma composição de célula que compreende células geneticamente modificadas. Em algumas modalidades, o método envolve introduzir, em uma composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, em que a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA fornecidas a partir de uma amostra biológica de um objeto, e a composição de entrada é estimulada, antes, durante e/ou subsequente à introdução por incubação das células na presença de um ou mais agentes estimulantes, a referida estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células; e em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante ($receptor^+$) que expressam ou não expressam CCR7,

CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[0087] Também são fornecidos métodos para gerar uma composição de célula que compreende células geneticamente modificadas. Em algumas modalidades, o método envolve isolar, a partir de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um número alvo de células T CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, gerando assim uma composição de entrada. Em algumas modalidades, o método envolve introduzir, na composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante. Em algumas modalidades, o método envolve estimular as células na composição de entrada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, em que a estimulação compreende incubar as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, os referidos resultados estimulantes na ativação e/ou proliferação das células. Em algumas modalidades, o método produz uma composição de saída que compreende uma razão definida de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[0088] Também são fornecidos métodos para gerar uma composi-

ção de célula que compreende células geneticamente modificadas. Em algumas modalidades, o método envolve introduzir em uma composição de entrada um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, em que a composição de entrada é gerada isolando, a partir de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um número alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, e a composição de entrada é estimulada antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, incubando as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, o referido estímulo resulta na ativação e/ou proliferação das células; e em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/$CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[0089] Em algumas modalidades, a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

[0090] Em algumas modalidades, a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de $CD4^+$/$CCR7^+$, $CD4^+$/$CD27^+$, $CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$, $CD4^+$/$CCR7^+$/$CD45RA^-$, $CD4^+$/$CCR7^+$/CD45RA+, $CD8^+$/$CCR7^+$, $CD8^+$/$CD27^+$, células $CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$, $CD8^+$/$CCR7^+$/$CD45RA^-$ e/ou $CD8^+$/$CCR7^+$/CD45RA+.

[0091] Em algumas modalidades, a composição de saída compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/ CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+, para receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+; ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/ CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+ e/ou receptor$^+$/ CD4$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+ para outro subconjunto de células na composição.

[0092] Em algumas modalidades, os métodos também envolvem determinar uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula T para administração a um objeto tendo uma doença ou condição, em que a dose unitária compreende toda ou uma porção da composição de saída que compreende: a número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/ CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição; um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam um cluster de diferenciação 27 (CD27) (células +/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (receptor$^+$/CD4$^+$/Células CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células recep-

tor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; ou um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[0093] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CCR7$^+$, células CD4$^+$/CCR7$^+$, células CD8$^+$/CD27$^+$, células CD4$^+$/CD27$^+$, células CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[0094] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7, cada uma inclusive, células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais, receptor total +/CD4$^+$/Células CD27$^+$, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[0095] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células recep-

tor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[0096] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e entre em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[0097] Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; e/ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são

receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$; e/ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[0098] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1; e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1; e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[0099] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células CD45RA$^-$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00100] Em algumas modalidades, pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são recep-

tor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00101] Em algumas modalidades, os métodos adicionalmente compreendem, antes do fornecimento ou isolamento, determinar o número, número por volume, número por peso e/ou porcentagem das células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou células T CD45RA e/ou CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

[00102] Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes são capazes de ativar células T, células T CD4$^+$ e/ou células T CD8$^+$; é capaz de induzir um sinal através de um complexo TCR; e/ou é capaz de induzir a proliferação de células T, células T CD4$^+$ e/ou células T CD8$^+$.

[00103] Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes compreende um agente primário que se liga a um membro de um complexo de TCR, opcionalmente que se liga especificamente a CD3. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes compreendem adicionalmente um agente secundário que se liga especificamente a uma molécula coestimulatória de célula T. Em algumas modalidades, a molécula coestimulatória é selecionada a partir do grupo que consiste em CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 ou ICOS. Em algumas modalidades, os agentes primário e secundário compreendem anticorpos, opcionalmente onde os um ou mais agentes estimulantes compreendem a incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes estão presentes na superfície de um suporte sólido, opcionalmente uma conta. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes são selecionados a partir do grupo que consiste em moléculas de ligação a CD3; moléculas de ligação a CD28; IL-2 recombinante; IL-15 recombinante; e IL-7 recombinante, uma vacina compreendendo um antígeno especificamente reconhecido pelo recep-

tor de antígeno e um anticorpo anti-idiotipo que se liga especificamente ao receptor de antígeno ou suas combinações.

[00104] Em algumas modalidades, a composição terapêutica é qualquer uma das composições descritas neste documento.

[00105] Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente a administração a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00106] Em algumas modalidades, entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária varia em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[00107] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 5×10^8, entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD3^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD3^+$) ou células $CD3^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 5×10^8, não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais do que cerca de 5×10^5 células $receptor^+/CD3^+$ totais ou células $CD3^+$ totais.

[00108] Em algumas modalidades, o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/$

CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/ CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$/ CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis. Em algumas modalidades, o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$/CD27$^+$, total número de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células que não expressam um marcador apoptótico e/ou o número total de células negativas (-) para marcador apoptótico, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[00109] Em algumas modalidades, o método envolve administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

[00110] Em algumas modalidades, a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição compreende as células T CD8$^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição compreende as células T CD4$^+$.

[00111] Em algumas modalidades, o método envolve administrar a composição contendo células T CD8$^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses

unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias e/ou volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

[00112] Em algumas modalidades, o método envolve administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes de administrar a composição contendo células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias. Em algumas modalidades, o método envolve administrar a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes de administrar a composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a esse ou mais doses unitárias.

[00113] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é um antígeno tumoral.

[00114] Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo,

antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina Motivo C-C (CCL-1)), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo do receptor Fc 5 ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), receptor de proteína G acoplada 5 D (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície de hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão celular L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos do membro D de grupo 2 de assassinas naturais(NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor de tirosina quinase tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glico-

proteína de trofoblasto (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína associada a tumor 72 (TAG72), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[00115] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou TCR. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única. Em algumas modalidades, o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível. Em algumas modalidades, o fragmento compreende um scFv.

[00116] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende uma região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intra-

celular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

[00117] Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

[00118] Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[00119] Em algumas modalidades, as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto.

[00120] Em alguns aspectos de qualquer uma das modalidades fornecidas neste documento, as células em uma composição terapêutica fornecida ou em uma dose unitária estão associadas a certos atributos funcionais, incluindo certas atividades dependentes do receptor recombinante (por exemplo, CAR) que dependem de uma atividade ou presença do receptor recombinante, por exemplo atividade induzida ou mediada na presença de antígeno reconhecido pelo receptor recombinante. Em algumas modalidades, um atributo funcional inclui a produção de níveis mais altos de uma citocina, por exemplo, IL-2. Em alguns aspectos de qualquer uma das modalidades fornecidas neste docu-

mento, o atributo funcional inclui a produção de níveis mais baixos de uma citocina, por exemplo, IFNγ ou IL-13. Em algumas modalidades, os níveis mais altos ou mais baixos de tais citocinas referem-se a uma composição de referência na qual está contido um número não definido de células de um fenótipo particular e/ou na qual as células de um fenótipo particular não estão em uma razão definida particular de acordo com as modalidades aqui fornecidas. Em algumas modalidades, uma composição de referência é aquela em que está contida uma maior frequência ou número de células T com um fenótipo efetor ou diferenciado.

[00121] Em alguns aspectos, após a administração de uma composição terapêutica ou de uma dose unitária a um de um grupo de objetos de acordo com qualquer uma das modalidades fornecidas neste documento, uma pluralidade de objetos no grupo de objetos exibe um ou mais recursos associados a um aumento de eficácia, persistência e/ou toxicidade reduzida após a administração. Em algumas modalidades, é provável que uma pluralidade de objetos entre o grupo de objetos apresente e/ou esteja associada a parâmetros farmacocinéticos, probabilidade reduzida de desenvolvimento de uma toxicidade ou evento adverso e/ou resposta específica, eficácia ou resultado de sobrevivência. Em algumas modalidades, o objeto é um objeto suspeito de ter uma doença ou condição. Em algumas modalidades, as uma ou mais características são aperfeiçoadas em comparação com um grupo semelhante de objetos tratados com a composição de referência na qual está contido um número não definido de células de um fenótipo particular e/ou na qual as células de um fenótipo particular não estão em uma razão definida particular de acordo com modalidades fornecidas neste documento. Em algumas modalidades, uma composição de referência é aquela em que está contida uma maior frequência ou número de células T com um fenótipo efetor ou diferenciado.

[00122] Em alguns aspectos, após a administração de uma composição terapêutica ou de uma dose unitária a um de um grupo de objetos de acordo com qualquer uma das modalidades fornecidas neste documento, é provável que uma pluralidade de objetos no grupo de objetos exiba e/ou seja associada a parâmetros farmacocinéticos específicos, como concentração plasmática máxima (pico) (C_{max}), tempo de pico (ou seja, quando ocorre concentração plasmática máxima (C_{max}); T_{max}), concentração plasmática mínima (ou seja, concentração plasmática mínima entre doses de um medicamento) agente, por exemplo, células T CAR+; C_{min}), a meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) e a área sob a curva (ou seja, a área sob a curva gerada pelo esquema do tempo versus a concentração plasmática das células T CAR+ do agente terapêutico; AUC). Em alguns aspectos, após a administração de uma composição terapêutica ou de uma dose unitária, é provável que uma pluralidade de objetos entre o grupo exiba ou esteja associada à concentração plasmática máxima (C_{max}) aumentada (pico) das células administradas. Em algumas modalidades, a persistência de longo prazo das células da composição terapêutica ou dose unitária é observada em uma pluralidade de objetos entre o grupo.

[00123] Em alguns aspectos, após a administração de uma composição terapêutica ou de uma dose unitária a um de um grupo de objetos de acordo com qualquer uma das modalidades fornecidas neste documento, é provável que uma pluralidade de objetos no grupo de objetos exiba e/ou seja associada a uma probabilidade reduzida de desenvolvimento de uma toxicidade ou de um evento adverso, como síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou CRS grave (sCRS) ou neurotoxicidade (NT) ou NT grave (sNT).

[00124] Em alguns aspectos, após a administração de uma composição terapêutica ou de uma dose unitária a um de um grupo de objetos de acordo com qualquer uma das modalidades fornecidas neste

documento, é provável que uma pluralidade de objetos no grupo de objetos exiba e/ou seja associada a uma resposta específica, eficácia ou resultado de sobrevivência, como resposta parcial (PR) ou remissão parcial, resposta completa (CR) ou remissão completa, sobrevivência livre de progressão (PFS), resposta objetiva (OR), resposta objetiva (OR), sobrevida global (OS), sobrevida livre de eventos (EFS), aumento da duração da resposta (DOR) ou aumento da taxa de sobrevivência. Em alguns aspectos, mediante a administração de uma terapia composição óptica ou dose unitária, é provável que uma pluralidade de objetos entre o grupo apresente ou esteja associada ao aumento da sobrevida livre de progressão (PFS).

[00125] Em algumas modalidades de qualquer uma das modalidades fornecidas, os métodos e/ou usos e/ou administração de uma dose unitária de células de acordo com os artigos de fabricação, alcançam certos resultados e/ou estão associados a certos riscos reduzidos de toxicidade, por exemplo, na população de objetos tratados de acordo com os métodos ou com as informações fornecidas no artigo de fabricação. Em alguns aspectos, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50% ou pelo menos 60% dos objetos tratados de acordo com o método alcançam uma resposta completa (CR) ou remissão completa, sobrevida livre de progressão (PFS), resposta objetiva (OR), sobrevida global (OS), sobrevida livre de eventos (EFS) ou resposta durável por mais de 3 meses, maior que 6 meses ou maior que 12 meses. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, maior ou igual a cerca de 50% dos objetos tratados de acordo com o método não exibem uma síndrome de liberação de citocinas (CRS) grau 3 ou superior ou uma neurotoxicidade de grau 3 ou superior. Em algumas modalidades, esses objetos não exibem CRS de início precoce e/ou neurotoxicidade, como não exibem início de CRS antes de 3 dias após o começo da administração e/ou não exibem início de neu-

rotoxicidade antes de 5 dias após o começo da administração. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, maior ou igual a cerca de 30%, 35%, 40% ou 50% dos objetos tratados de acordo com o método não exibem qualquer grau de síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou neurotoxicidade.

[00126] Também são fornecidas composições de saída produzidas por qualquer um dos métodos descritos neste documento.

[00127] Também são fornecidas doses unitárias determinadas ou produzidas por qualquer um dos métodos aqui descritos.

[00128] Também são fornecidas composições farmacêuticas compreendendo qualquer uma das doses unitárias aqui descritas. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas também incluem um veículo farmacêutico.

[00129] Também são fornecidos métodos de tratamento, compreendendo a administração a um mamífero de todas ou uma porção de qualquer uma das composições de saída, doses unitárias ou composições farmacêuticas aqui descritas.

[00130] Também são fornecidos usos de todas ou uma porção de qualquer uma das composições de saída, doses unitárias ou composições farmacêuticas aqui descritas para o tratamento de câncer.

[00131] Também são fornecidos usos de todas ou uma porção de qualquer uma das composições de saída, doses unitárias ou composições farmacêuticas descritas neste documento na fabricação de um medicamento para tratamento de câncer.

[00132] Também são fornecidas todas ou uma porção de qualquer uma das composições de saída, doses unitárias ou composições farmacêuticas aqui descritas para uso no tratamento de câncer.

[00133] São fornecidas aqui composições de célula terapêuticas contendo células T que expressam um receptor recombinante que se liga a um antígeno, em que, após a estimulação com um agente esti-

mulatório: pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir de interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa; e/ou pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa. Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressa o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa. Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição expressando o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de citocinas interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

[00134] Em algumas modalidades, o agente estimulatório é um agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno. Em algumas modalidades, o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno é um agente estimulatório policlonal. Em algumas modalidades, o agente estimulatório não

específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina, anti-CD3/anti-CD28, fito-hemaglutinina (PHA) ou concanavalina A (ConA). Em algumas modalidades, o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina. Em algumas modalidades, o agente estimulatório liga-se especificamente ao receptor recombinante, opcionalmente em que o agente estimulatório é um reagente estimulatório específico de antígeno e/ou contém o antígeno ou uma porção do mesmo especificamente reconhecida pelo receptor recombinante. Em algumas modalidades, a produção das citocinas é medida em um ensaio de citocinas intracelular.

[00135] Em algumas modalidades, a composição contém pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente adicionalmente negativos para a expressão de superfície de CD45RA.

[00136] Em algumas modalidades, as células T são células primárias obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, o objeto tem um câncer, opcionalmente em que o câncer é uma leucemia ou um linfoma. Em algumas modalidades, o objeto é um objeto que, no momento da obtenção das células, é identificado ou conhecido por ter uma alta carga tumoral. Em algumas modalidades, o objeto tem alta carga tumoral se uma soma das dimensões do produto (SPD) de um tumor no objeto estiver acima de em ou cerca de 30 cm^2, 40 cm^2, 50 cm^2, 60 cm^2 ou 70 cm^2; e/ou o objeto tem alta carga tumoral se a proteína C reativa (PCR) em uma amostra biológica, opcionalmente uma amostra de soro, estiver acima de 5 miligramas por litro, 10 miligramas por litro, 15 miligramas por litro, 20 miligramas por litro, 25 miligramas

por litro, 30 miligramas por litro, 40 miligramas por litro ou 50 miligramas por litro. Em algumas modalidades, o objeto tem uma alta carga tumoral se a SPD de um tumor no objeto estiver acima ou igual a 50 cm^2. Em algumas modalidades, o objeto tem uma alta carga tumoral se a PCR estiver acima de ou em cerca de 20 miligramas por litro na amostra biológica.

[00137] Em algumas modalidades, a composição de célula terapêutica é enriquecida em células T $CD4^+$ e/ou pelo menos em ou cerca de 60%, pelo menos em ou cerca de 70%, pelo menos em ou cerca de 80%, pelo menos em ou cerca de 90 %, pelo menos em ou cerca de 95%, pelo menos em ou cerca de 97% das células $receptor^+$ totais recombinantes na composição manipulada geneticamente, ou entre cerca de 60% e 99%, entre cerca de 75% e 99%, entre cerca de 85% e 99%, ou entre cerca de 90% e 99%, cada uma inclusive, das células totais na composição são $CD4^+$. Em algumas modalidades, a composição de célula terapêutica é enriquecida em células T $CD3^+$, é enriquecida em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e/ou pelo menos em ou cerca de 60%, pelo menos em ou cerca de 70%, pelo menos em ou cerca de 80%, pelo menos em ou cerca de 90%, pelo menos em ou cerca de 95%, pelo menos em ou cerca de 97% das células $receptor^+$ totais recombinantes na composição manipulada geneticamente, ou entre cerca de 60% e 99%, entre cerca de 75% e 99%, entre cerca de 85% e 99%, ou entre cerca de 90% e 99%, cada uma inclusive, das células totais na composição são $CD3^+$ ou $CD4^+$ e $CD8^+$. Em algumas modalidades, a composição de célula terapêutica contém células T $CD4^+$ e $CD8^+$ na razão de células T $CD4^+$ para $CD8^+$ que está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1, opcionalmente entre aproximadamente 1:2 e 2:1.

[00138] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou contém um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombi-

nante. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é um antígeno tumoral. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina Motivo C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação de receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor da efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como Homólogo do receptor Fc tipo 5 ou FCRH5), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, um antígeno associado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa-2 da IL-13 (IL-13Rα2), receptor do domínio de inserção de qui-

nase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), tirosina quinase de receptor tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína associada a tumor 72 (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como tautomerase dopacromada, delta-isomerase dopacromada ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR)), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno, ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressa por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[00139] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou contém um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em algumas modalidades, o receptor recombinante contém um domínio extracelular contendo um domínio de ligação a antígeno e uma região de sinalização intracelular contendo um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a

antígeno é ou contém um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única. Em algumas modalidades, o fragmento contém regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível. Em algumas modalidades, o fragmento compreende um scFv. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou contém um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização contendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou contém um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma. Em algumas modalidades, o receptor recombinante contém adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular contém adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório contém um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório contém um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[00140] Em algumas modalidades, as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto.

[00141] São aqui fornecidos artigos de fabricação, incluindo um re-

cipiente contendo uma composição de célula terapêutica aqui descrita e instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição de célula terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias. Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas. Em algumas modalidades, a pluralidade de composições separadas contém uma primeira composição contendo a composição de célula terapêutica contendo uma das células T $CD8^+$ e células T $CD4^+$ e uma segunda composição contendo a outra das células T $CD8^+$ e as células T $CD4^+$, a referida segunda composição contendo células que expressam o receptor recombinante ou um receptor recombinante específico para o antígeno ou para uma célula expressa pela doença ou condição opcionalmente em que a segunda composição é qualquer composição aqui descrita. Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume corresponde as uma ou mais doses unitárias dentro de não mais do que 48 horas de intervalo, dentro de não mais do que 36 horas de intervalo, dentro de não mais do que 24 horas de intervalo, dentro de não mais do que 12 horas de intervalo, dentro de não mais do que 12 horas de intervalo, intervalo de não mais do que 6 horas, intervalo não mais de 2 horas de intervalo, dentro de não mais de 1 hora de intervalo ou simultaneamente. Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD4^+$

ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00142] São aqui fornecidos métodos de tratamento, o método incluindo a administração a um objeto tendo uma doença ou condição de uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula terapêutica aqui descrita. Em algumas modalidades, a composição terapêutica é uma primeira composição de célula terapêutica contendo uma das células T $CD8^+$ e células T $CD4^+$ e as uma ou mais doses unitárias contém adicionalmente uma segunda composição de célula terapêutica contendo a outra das células T $CD8^+$ e células $CD4^+$, a referida segunda composição contendo células que expressam o receptor recombinante ou um receptor recombinante específico para o antígeno ou para uma célula expressa pela doença ou condição, opcionalmente em que a segunda composição é qualquer composição aqui descrita.

[00143] Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na segunda composição de célula terapêutica ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente adicionalmente negativos para a expressão de superfície de CD45RA. Em algumas modalidades, a segunda composição de célula terapêutica é enriquecida em células T $CD8^+$ e/ou pelo menos em cerca de 60%, pelo menos em ou cerca de 70%, pelo menos em ou cerca de 80%, pelo menos em cerca de 90%, pelo menos em ou cerca de 95%, pelo menos em ou cerca de 97% do total de células $receptor^+$ recombinantes na composição manipulada geneticamente, ou entre cerca de 60% e 99%, entre cerca de 75% e 99%, entre cerca de 85% e 99%, ou entre cerca de 90% e 99%, cada uma inclusive, das células totais na composição são $CD8^+$.

[00144] Em algumas modalidades, a primeira composição terapêutica e a segunda composição terapêutica são administradas dentro de ou em cerca de 48 horas, dentro de ou em cerca de 36 horas, dentro de ou em cerca de 24 horas, dentro de ou em cerca de 12 horas, dentro de ou em cerca de 12 horas, dentro de ou em cerca de 6 horas, dentro de ou em cerca de 2 horas ou dentro de ou em cerca de 1 hora um da outra. Em algumas modalidades, a segunda composição de célula terapêutica contendo as células T $CD8^+$ é administrada antes da primeira composição contendo células T $CD4^+$. Em algumas modalidades, as uma ou mais doses unitárias de células contém uma razão definida de células T $CD4^+$ para $CD8^+$, cuja razão é ou é aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1, opcionalmente que é ou é aproximadamente 1:2 e 2:1, opcionalmente, é ou é aproximadamente 1:1.

[00145] São aqui fornecidos métodos para tratamento de um objeto, o método incluindo (A) o ensaio de uma composição de célula manipuladas geneticamente contendo células T que expressam um receptor recombinante para um fator indicativo da função ou fenótipo de células manipuladas geneticamente na composição, o fator selecionado a partir de (i) a porcentagem de células T que expressam o receptor recombinante que são positivas para superfície para CCR7 e/ou CD27 e opcionalmente negativas para superfície para CD45RA; e/ou (ii) a porcentagem de células T $CD4^+$ que expressam o receptor recombinante que são capazes de produzir IL-2, TNF-alfa e/ou IFN-gama após estimulação com um agente estimulatório; e (B) administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, uma terapia, a administração selecionada a partir de: (1) se um fator indicativo da função ou fenótipo de células da composição de célula T manipulada geneticamente estiver em ou acima de um valor limite, administrar ao objeto uma ou mais doses unitárias de células de uma composição de célula manipulada geneticamente contendo células T que expressam um receptor recom-

binante; ou (2) se o fator indicativo da função ou fenótipo de células da composição de célula T manipulada geneticamente estiver abaixo de um valor limite do fator, administrar uma terapia selecionada entre (a) uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula manipulada geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia das células T da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, (b) uma dose aumentada de células da composição de célula manipulada geneticamente, opcionalmente aumentada em comparação com as uma ou mais doses unitárias administradas a um objeto situado similarmente, tendo a mesma doença ou condição, mas exibindo o valor limite do fator ou superior; ou (c) um tratamento terapêutico alternativo para o tratamento da doença ou condição diferente de uma ou mais doses unitárias da composição de célula manipulada geneticamente, em que o valor limite do fator é selecionado de (i) em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou (ii) em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir interleucina 2 (IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou (iii) em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório.

[00146] São aqui fornecidos métodos para o tratamento de um obje-

to, os métodos incluindo a administração a um objeto tendo uma doença ou condição terapêutica, a administração selecionada dentre: (1) se um fator indicativo de uma função ou fenótipo de células de uma composição de célula manipulada geneticamente contendo células T que expressam um receptor recombinante for igual ou superior a um valor limite, administrar ao objeto uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula T manipulada geneticamente; ou (2) se o fator indicativo da função ou fenótipo de células da composição de célula T manipulada geneticamente estiver abaixo de um valor limite do fator, administrar uma terapia selecionada entre (a) uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula manipulada geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia das células T da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, (b) uma dose aumentada de células da composição de célula manipulada geneticamente, opcionalmente aumentada em comparação com as uma ou mais doses unitárias administradas a um objeto situado similarmente, tendo a mesma doença ou condição, mas exibindo o valor limite do fator ou superior; ou (c) um tratamento terapêutico alternativo para o tratamento da doença ou condição diferente de uma dose da composição de célula manipulada geneticamente, em que o valor limite do fator é selecionado a partir de (i) em ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70 %, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante, são positivas para a superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou (ii) em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir interleucina 2 (IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou (iii) em ou

cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório.

[00147] Em algumas modalidades, as células da composição de célula são alogênicas para o objeto. Em algumas modalidades, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60% ou pelo menos 70% ou pelo menos 75% dos objetos tratados de acordo com o método alcançam sobrevida livre de progressão por pelo menos 3 meses, pelo menos 4 meses, pelo menos 5 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses ou pelo menos 12 meses após a administração de uma ou mais doses unitárias. Em algumas modalidades, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60% ou pelo menos 70% ou pelo menos 75% dos objetos tratados de acordo com o método não alcançam a progressão da doença por pelo menos em ou cerca de 3 meses, pelo menos em ou cerca de 4 meses, pelo menos em ou cerca de 5 meses, pelo menos em ou cerca de 6 meses, pelo menos em ou cerca de 9 meses ou pelo menos em ou cerca de 9 meses, ou pelo menos em ou cerca de 12 meses após a administração de uma ou mais doses unitárias. Em algumas modalidades, os objetos tratados de acordo com o método alcançam uma propriedade farmacocinética das células da composição de célula em uma amostra biológica, opcionalmente uma amostra de sangue ou soro, que é melhorada, em média, em comparação com um grupo de objetos situados similarmente com a mesma doença ou condição e administrados com uma dose semelhante de uma composição de célula autóloga compreendendo células T que expressam o receptor recombinante, mas em que o fator indicativo da função ou fenótipo das células está abaixo do valor limite. Em algumas modalidades, a proprieda-

de farmacocinética é a exposição total ao longo do tempo (AUC) ou número máximo de células na amostra biológica.

[00148] São aqui fornecidos métodos para prever a probabilidade de resposta a uma composição terapêutica de células T, o método incluindo: (a) analisar uma composição de célula manipuladas geneticamente contendo células T que expressam um receptor recombinante para um fator indicativo da função ou fenótipo de células manipuladas geneticamente na composição, o fator selecionado a partir de (i) a porcentagem de células T que expressam o receptor recombinante que são positivas para superfície para CCR7 e/ou CD27, e opcionalmente negativas para superfície de CD45RA; e/ou (ii) a porcentagem de células T $CD4^+$ que expressam o receptor recombinante que são capazes de produzir IL-2, TNF-alfa e/ou IFN-gama após estimulação com um agente estimulatório; e (b) determinar a probabilidade de resposta após a administração de uma terapia celular contendo uma dose das células manipuladas geneticamente, em que se o fator for igual ou superior a um valor limite, identificar o objeto como provável de alcançar uma resposta durável ou sobrevivência livre de progressão, opcionalmente por pelo menos 3 meses, após a administração da terapia; ou se o fator estiver abaixo de um valor limite, identificar o objeto como improvável de exibir uma resposta durável ou sobrevida livre de progressão para a terapia, em que o valor limite do fator é selecionado a partir de: (i) em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivas para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou (ii) em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir interleucina 2

(IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou (iii) em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório.

[00149] Em algumas modalidades, as células da composição de célula são alogênicas para o objeto. Em algumas modalidades, se o objeto é identificado como provável de alcançar uma resposta durável ou sobrevida livre de progressão para terapia, administrar ao objeto uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula T manipulada geneticamente. Em algumas modalidades, as uma ou mais doses unitárias contêm entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 5×10^8, entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células T totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+$/T) ou células T totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, as uma ou mais doses unitárias não contém mais que 5×10^8, não mais do que 1×10^8, não mais do que 5×10^7, não mais do que 1×10^7, não mais do que 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6 ou não mais do que cerca de 5×10^5 células $receptor^+$/T totais ou células T totais. Em algumas modalidades, o valor limite do fator está em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, o valor limite do fator está em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, o valor limite do fator está em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição expressando o receptor recombinante são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, o valor limite do fator está em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição expressando o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa. Em algumas modalidades, o valor limite do fator está em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição expressando o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de citocinas interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

[00150] Em algumas modalidades, se o objeto for identificado como não provável de alcançar uma resposta durável ou sobrevivência livre de progressão, administrar ao objeto uma terapia selecionada dentre (a) uma dose de células da composição de célula manipulada geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia das células T da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, (b) um aumento da dose de células da composição de célula manipulada geneticamente, opcionalmente aumentada em comparação com uma dose administrada a um objeto situado similarmente tendo a mesma doença ou condição, mas exibindo uma probabilidade de alcançar sobrevida livre de progressão ou uma resposta durável à terapia celular; ou (c) um tratamento terapêutico alternativo

para o tratamento da doença ou condição diferente de uma dose da composição de célula manipulada geneticamente.

[00151] Em algumas modalidades, o método inclui a administração de uma terapia contendo uma dose de células da composição de célula manipulada geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia de células T da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, em que o agente é um anticorpo anti-idiotipo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo específico para o CAR, um inibidor do ponto de verificação imune, um modulador de uma via metabólica, um antagonista do receptor de adenosina, um inibidor de quinase, um anticorpo anti-TGFβ ou um anticorpo anti-TGFβR ou uma citocina. Em algumas modalidades, o agente é administrado antes, simultaneamente ou após a administração da composição terapêutica das células T.

[00152] Em algumas modalidades, o objeto é um objeto que, no momento da análise e/ou antes da administração, é identificado ou conhecido por ter uma alta carga tumoral. Em algumas modalidades, o objeto tem alta carga tumoral se uma soma das dimensões do produto (SPD) de um tumor no objeto estiver acima de em ou cerca de 30 cm^2, 40 cm^2, 50 cm^2, 60 cm^2 ou 70 cm^2; e/ou o objeto tem alta carga tumoral se a proteína C reativa (PCR) em uma amostra biológica, opcionalmente uma amostra de soro, estiver acima de 5 miligramas por litro, 10 miligramas por litro, 15 miligramas por litro, 20 miligramas por litro, 25 miligramas por litro, 30 miligramas por litro, 40 miligramas por litro ou 50 miligramas por litro. Em algumas modalidades, o objeto tem uma alta carga tumoral se a SPD de um tumor no objeto estiver acima ou igual a 50 cm^2. Em algumas modalidades, o objeto tem uma alta carga tumoral se a PCR estiver acima de ou em cerca de 20 miligramas por litro na amostra biológica.

[00153] Em algumas modalidades, o agente estimulatório é um

agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno. Em algumas modalidades, o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno é um agente estimulatório policlonal. Em algumas modalidades, o agente estimulatório não específico ou não dependente de antígeno contém PMA/ionomicina, anti-CD3/anti-CD28, fito-hemaglutinina (PHA) ou concanavalina A (ConA). Em algumas modalidades, o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno contém PMA/ionomicina. Em algumas modalidades, o agente estimulatório liga-se especificamente ao receptor recombinante, opcionalmente em que o agente estimulatório é um reagente estimulatório específico de antígeno e/ou compreende o antígeno ou uma porção do mesmo especificamente reconhecida pelo receptor recombinante. Em algumas modalidades, a produção das citocinas é medida em um ensaio de citocinas intracelular.

[00154] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou contém um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é um antígeno tumoral. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina Motivo C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33,

CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação de receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor da efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como Homólogo do receptor Fc tipo 5 ou FCRH5), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Rα2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, Repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno do melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), tirosina quinase de receptor tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1,

também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como tautomerase dopacromada, delta-isomerase dopacromada ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), tumor 1 de Wilms (WT-1), um antígeno expresso patógeno ou específico de patógeno, ou um antígeno associado a uma etiqueta universal, e/ou moléculas biotiniladas, e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[00155] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno funcional não-TCR ou um TCR ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em algumas modalidades, o receptor recombinante contém um domínio extracelular contendo um domínio de ligação a antígeno e uma região de sinalização intracelular contendo um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a antígeno é ou contém um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única. Em algumas modalidades, o fragmento contém regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível. Em algumas modalidades, o fragmento compreende um scFv. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou contém um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização contendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou contém um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma. Em algumas modalidades, o receptor recombinante

contém adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular. Em alguma modalidade, a região de sinalização intracelular contém adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório contém um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório contém um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[00156] Em algumas modalidades, as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, as células T são alogênicas para o objeto.

[00157] São aqui fornecidos métodos de produção de uma composição terapêutica de células T, incluindo (a) incubar uma composição de entrada sob condições estimulantes, gerando uma composição estimulada, em que a composição de entrada contendo um número definido de células T que não expressam um marcador apoptótico (negativas (-) para marcador apoptótico); e (b) introduzir um receptor recombinante nas células a partir da composição estimulada, gerando assim uma composição de célula manipulada geneticamente, em que a introdução inclui contatar as células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante. Em algumas modalidades, as células T negativas para marcador apoptótico são ou contêm células $CD3^+$ negativas para marcador apoptótico, células $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico, células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico ou células $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico e células $CD4^+$ negativas para mar-

cador apoptótico. Em algumas modalidades, o marcador apoptótico é a Anexina V. Em algumas modalidades, o marcador apoptótico é Caspase ativada 3. Em algumas modalidades, o número definido de células T contém pelo menos 50 x 10^6 das células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico. Em algumas modalidades, o número definido de células T contém pelo menos 100 x 10^6 das células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente células $CD4^+$ negativas para apoptótico e/ou T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico. Em algumas modalidades, o número definido de células T inclui entre cerca de 100 x 10^6 e cerca de 500 x 10^6 células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico. Em algumas modalidades, o número definido de células T inclui em ou cerca de 300 x 10^6 células T negativas para marcador apoptótico, ou opcionalmente células T $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico.

[00158] Em algumas modalidades, a porcentagem de células T negativas para marcador apoptótico como uma porcentagem do total de células T na composição de entrada é maior ou maior que cerca de 70%, maior ou maior que cerca de 80%, maior ou maior que cerca de 90% ou maior ou maior que cerca de 95%. Em algumas modalidades, antes de incubar, isolar, selecionar ou enriquecer células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente, células T $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico de uma amostra biológica.

[00159] São aqui fornecidos métodos para produzir uma composição terapêutica de células T, o método incluindo (a) isolar, selecionar ou enriquecer, a partir de uma amostra biológica, uma população de

células T que não expressam um marcador apoptótico (negativas (-) para marcador apoptótico), opcionalmente, células T $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico, obtendo assim uma composição de entrada; (b) incubar a composição de entrada sob condições estimulantes, gerando assim uma composição estimulada; e (c) introduzir um receptor recombinante nas células a partir da composição estimulada, gerando assim uma composição de célula manipulada geneticamente, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante.

[00160] Em algumas modalidades, as células T primárias da amostra biológica obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, o objeto é um objeto humano. Em algumas modalidades, a amostra biológica é ou contém uma amostra de sangue total, uma amostra de buffy coat, uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), uma amostra de células T não fracionada, uma amostra de linfócitos, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aférese, ou um produto de leucaférese. Em algumas modalidades, a amostra biológica contém um produto de aférese ou um produto de leucaferese. Em algumas modalidades, as células T são isoladas, selecionadas ou enriquecidas a partir da amostra biológica não mais de 36 horas após serem obtidas a partir de um objeto. Em algumas modalidades, a amostra biológica é criocongelada na presença de um crioprotetor não mais de 36 horas após ser obtida do objeto e descongelada antes de isolar, selecionar ou enriquecer as células, opcionalmente em que a amostra criocongelada é descongelada imediatamente antes ou dentro de não mais do que 6 horas, não mais do que 4 horas, não mais do que 2 horas ou não mais do que 1 hora antes do isolamento, seleção ou enriquecimento das células.

[00161] Em algumas modalidades, a incubação é realizada na presença de uma ou mais citocinas, opcionalmente em um meio livre de soro. Em algumas modalidades, as uma ou mais citocinas são selecionadas a partir de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante e/ou IL-15 recombinante. Em algumas modalidades, as uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 UI/mL de IL-2 recombinante; entre 100 UI/mL e 1.000 UI/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 UI/mL de IL-15 recombinante. Em algumas modalidades, o reagente estimulatório contém um agente primário que se liga especificamente a um membro de um complexo TCR, opcionalmente que se liga especificamente a CD3, opcionalmente em que o agente primário é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o reagente estimulatório contém adicionalmente um agente secundário que se liga especificamente a uma molécula coestimulatória de célula T, opcionalmente em que a molécula coestimulatória é selecionada a partir de CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 ou ICOS, opcionalmente em que o agente secundário é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o reagente estimulatório inclui a incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o agente primário e/ou agente secundário estão presentes na superfície de um suporte sólido. Em algumas modalidades, o suporte sólido é ou compreende uma conta. Em algumas modalidades, o agente primário e o agente secundário são imobilizados ou ligados reversivelmente na superfície de um reagente de partículas oligoméricas compreendendo uma pluralidade de moléculas de estreptavidina ou estreptavidina-muteína.

[00162] Em algumas modalidades, a composição de entrada é incubada sob condições estimulantes por entre 12 horas e 36 horas, cada uma inclusive, opcionalmente em ou cerca de 24 horas. Em algu-

mas modalidades, o contato é realizado por transdução viral, opcionalmente com um vetor retroviral, opcionalmente um vetor lentiviral.

[00163] Em algumas modalidades, o método inclui adicionalmente o cultivo da composição manipulada geneticamente sob condições para promover a proliferação e/ou expansão das células manipuladas geneticamente, produzindo assim uma composição de saída compreendendo as células T manipuladas geneticamente. Em algumas modalidades, o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas, opcionalmente em um meio livre de soro. Em algumas modalidades, as uma ou mais citocinas são selecionadas a partir de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante e/ou IL-15 recombinante. Em algumas modalidades, as uma ou mais citocinas contêm: entre 50 e 400 UI/mL de IL-2 recombinante; entre 100 UI/mL e 2.000 UI/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 50 e 400 UI/mL de IL-15 recombinante.

[00164] Em algumas modalidades, a composição de entrada contém células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$ a uma razão entre 2:1 e 1:2 de células T $CD4^+$ para $CD8^+$; ou a composição de entrada contém células T $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico em uma razão entre 2:1 e 1:2 de células T $CD4^+$ para $CD8^+$. Em algumas modalidades, as células T $CD4^+$ e as células T $CD8^+$ são selecionadas separadamente, isoladas ou enriquecidas a partir da mesma amostra biológica ou de uma amostra e combinadas antes da incubação. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[00165] Em algumas modalidades, a composição de saída contém pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou pelo

menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de o número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante é capaz de produzir interleucina 2 (IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para produzir duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório. Em algumas modalidades, o agente estimulatório é um agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno. Em algumas modalidades, o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno é um agente estimulatório policlonal. Em algumas modalidades, o agente estimulatório não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina, anti-CD3/anti-CD28, fito-hemaglutinina (PHA) ou concanavalina A (ConA). Em algumas modalidades, o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno contém PMA/ionomicina. Em algumas modalidades, o agente estimulatório liga-se especificamente ao receptor recombinante, opcionalmente em que o agente estimulatório é um reagente estimulatório específico de antígeno e/ou contém o antígeno ou uma porção do mesmo especificamente reconhecida pelo receptor recombinante. Em algumas modalidades, a produção das citocinas é medida em um ensaio de citocinas intracelular.

Breve Descrição dos Desenhos

[00166] A **FIG. 1A** mostra o número de células T $CD3^+$ CAR^+ presentes nas composições de célula T CAR para administração em DL1 e DL2. **FIG. 1B** mostra o número de células $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+,

células $CD4^+$ CAR^+ TNF-α^+ e células $CD8^+$ CAR^+ TNF-α^+, $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ e células $CD8^+$ CAR^+ $CCR7^+$ presentes em composições de células T CAR para administração em DL1 e DL2. **FIG. 1C** mostra o número de células $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+, células $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ e células $CD8^+$ CAR^+ $CCR7^+$ presentes nas composições de célula T CAR para administração em DL1 e DL2.

[00167] A **FIG. 2** representa o número mediano (± quartis) de células $CD3^+$ que expressam CAR /µL de sangue, avaliado por citometria de fluxo usando um anticorpo específico para um receptor truncado (CD3, círculo; N = 87); ou número médio (± quartis) de cópias de transgene CAR integrado/ µg de DNA genômico, avaliado por reação quantitativa em cadeia da polimerase (qPCR) usando iniciadores específicos para um elemento regulador pós-transcricional (WPRE) do vírus da hepatite por marmota presente no vetor que codifica o CAR (qPCR, quadrado; N = 85) em amostras de sangue de 87 objetos aos quais foram administradas células que expressam CAR anti-CD19. O ponto de corte para detecção de células CAR^+ na citometria de fluxo foi estabelecido em ≥ 25 eventos na porta CAR^+, e o limite de detecção para qPCR foi ≥ 12,5 cópias de transgene CAR por µg de DNA genômico.

[00168] A **FIG. 3A** mostra um gráfico de células $CCR7^+$ percentuais (entre as populações de células $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+) contra parâmetros farmacocinéticos das células $CD4^+$ CAR^+ e células $CD8^+$ CAR^+, respectivamente (conforme indicado por $AUC_{0\text{-}28}$ de $CD4^+$ CAR^+ ou $AUC_{0\text{-}28}$ de células $CD8^+$ CAR^+ em sangue para os objetos administrados com terapia celular). Cada ponto representa um paciente individual, com sombreamento de pontos individuais indicando se o paciente recebeu o nível de dose 1 (DL1) ou o nível de dose 2 (DL2). **FIG. 3B** mostra gráficos semelhantes, indicados separadamente para objetos observados com alta (nesta avaliação, indicados por uma soma dos

produtos de valor de diâmetros (SPD) maior ou igual a 50 cm^2) ou baixa (valor de SPD menor que 50 cm^2) carga tumoral pré-tratamento (avaliada no momento da quimioterapia pré-tratamento para linfonodos). **FIG. 3C** representa um gráfico do número de células $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ e células $CD8^+$ CAR^+ $CCR7^+$ contra AUC_{0-28} de células $CD4^+$ CAR^+ ou AUC_{0-28} de células $CD8^+$ CAR^+ no sangue para objetos administrados com terapia celular, com os coeficientes de correlação e valores de p associados. **FIGURAS 3D-3J**, representam gráficos das células T $CCR7^+$ ou $CCR7^+$ $CD27^+$ $CD4^+$ ou $CD8^+$ CAR^+ percentuais contra parâmetros farmacocinéticos (AUC_{0-28} e C_{max}) das células T $CD4^+$ CAR^+ (FIGURAS 3A, 3D-3F) e células T $CD8^+$ CAR (FIGURAS 3G-3J), com os coeficientes de correlação e valores de p associados.

[00169] As **FIGURAS 4A-4B** representam um gráfico da porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ entre células $CD4^+$ CAR^+ contra IFNγ (FIG. 4A) e secreção de IL-2 (FIG. 4B) pela composição $CD4^+$ CAR^+ por estimulação com o antígeno reconhecido pelo CAR (CD19).

[00170] As **FIGURAS 5A-5B** representam um gráfico da porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ entre células $CD8^+$ CAR^+ contra a secreção de IL-5 (FIG. 5A) e IL-13 (FIG. 5B) pela composição de $CD4^+$ CAR^+ por estimulação com o antígeno reconhecido pelo CAR (CD19).

[00171] As **FIGURAS 6A-6D** mostram as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para objetos que receberam composições de célula T CAR^+, divididas em grupos aos quais foram administradas composições contendo uma porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ CAR^+ T entre células T $CD4^+$ CAR^+ (FIG. 6A para sobrevivência livre de progressão, FIG. 6C para duração da resposta) e entre células T $CD8^+$ CAR^+ (FIG. 6B para sobrevivência livre de progressão, FIG. 6D para duração de resposta) que está acima ou abaixo de um certo nível limite.

[00172] As **FIGURAS 7A-7B** mostram gráficos de caixas que repre-

sentam a porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ entre células $CD4^+$ CAR^+ (FIG. 7A) ou secreção de IFNγ por células $CD4^+$ CAR^+ (FIG. 7B) em composições de células administradas a objetos em função de se o objeto foi para desenvolver a síndrome de liberação de citocinas (CRS; nota 0 vs. nota 1 ou superior). As FIGURAS 7C-7D mostram gráficos de caixas que representam a porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ entre células $CD4^+$ CAR^+ (FIG. 7C) ou secreção de IFNγ por células $CD4^+$ CAR^+ (FIG. 7D) em composições de células administradas a objetos em função de se o objeto foi para desenvolver neurotoxicidade (NT; nota 0-2 vs. nota 3 ou superior).

[00173] A **FIG. 8A** mostra uma análise de fenótipo multiparamétrico exemplar com base em uma incorporação estocástica de vizinhos distribuídos em t (tSNE). FIG. 8B mostra um gráfico de citometria de fluxo exemplar para um subtipo de célula identificado a partir da análise (dentro do limite da forma desenhada na FIG. 8A) para a expressão de CCR7 e CD27.

[00174] As **FIGURAS 9A-9C** mostram uma análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) de atributos fenotípicos e funcionais (FIG. 9A) e análises transcriptômicas (FIG. 9B) e epigenômicas (FIG. 9C) para identificar variáveis que discriminam entre objetos que exibiram resposta completa (CR) e objetos que exibiram doença progressiva (PD) ou resposta parcial (PR), 6 meses após a administração da composição das células T CAR^+.

[00175] A **FIG. 10A** mostra um gráfico da frequência de células $CD4^+$ $CCR7^+$ $CD27^+$ em composições pré-manipuladas geneticamente contra a frequência de células $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ $CD27^+$ nas composições de células manipuladas geneticamente (coeficiente de correlação de postos de Spearman: 0,591). FIG. 10B mostra um gráfico da frequência de células $CD8^+$ $CCR7^+$ $CD27^+$ em composições pré-manipuladas geneticamente e a frequência de células $CD8^+$ CAR^+

$CCR7^+$ $CD27^+$ nas composições de células manipuladas geneticamente (coeficiente de correlação de postos de Spearman: 0,357).

[00176] As **FIGURAS 11A-11D** representam resultados de composições de células T CAR+ geradas a partir de processos expandidos e não expandidos exemplares que envolvem um reagente estimulatório baseado em conta (Bead) e incubação em meios basais (Meio Basal de Conta) ou um reagente estimulatório oligomérico (Oligômero). FIG. 11A representa a porcentagem de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ positivas para CCR7 e CD27. FIG. 11B representa a porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ para células T $CD4^+$ CAR^+. FIG. 11C representa a porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ para células T $CD8^+$ CAR^+. FIG. 11D exibe a porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ geradas a partir de um doador representativo de um processo expandido exemplar em vários dias durante o processo de fabricação, incluindo ativação no dia 1 (ativação d1), transdução no dia 2 (transdução d2) e em várias temporizações após o início do cultivo (d4 INOC+2, d6 INOC+4, d7 INOC+5).

[00177] A **FIG. 12** mostra a clonalidade de células T das composições de célula T $CD4^+$ e $CD8^+$ isoladas antes da manipulação e das composições terapêuticas de células T CAR^+ $CD4^+$ e $CD8^+$ terapêuticas após a manipulação genética (índice de Shannon aplicado).

[00178] As **FIGURAS 13A e 13B** mostram curvas de sobrevida livre de progressão (risco proporcional de Cox (superior) e divisão ideal (inferior)) para pacientes com uma porcentagem "alta" ou "baixa" de células produtoras de IL-2 ou TNFα, respectivamente, em $CD4^+$/CAR^+ T células da composição terapêutica, conforme determinado usando estatísticas de classificação maximamente selecionadas.

[00179] A **FIG. 14** mostra a relação do resultado clínico com a soma basal dos produtos dos diâmetros (SPD) e os níveis basais de proteína C reativa (PCR) em objetos que exibem uma resposta completa (CR)

(triângulos) ou perda de resposta/sem resposta (círculos)) aos 6 meses.

[00180] A **FIG. 15** mostra a porcentagem de células IL-2/$CD4^+$/CAR^+ em composições terapêuticas de células T geradas a partir de objetos com alto nível de SPD/CRP exibindo uma resposta completa (CR) (triângulos; 1) ou perda de resposta/sem resposta (círculos; 0)) em 6 meses.

[00181] A **FIG. 16** mostra curvas de sobrevida livre de progressão para valores de corte tercil exemplares para células positivas para a caspase ativada 3 por marcador apoptótico nas composições de entrada.

[00182] A **FIG. 17** mostra a porcentagem de células positivas para caspase ativada 3 por marcador apoptótico, caspase 3 em composições de célula T de entrada enriquecidas em função da idade da amostra inicial de aférese, ou seja, amostras que variam no período de tempo (por exemplo, em horas) entre a aférese e seu processamento adicional antes do enriquecimento das células T. O gráfico esquerdo mostra a porcentagem de células $CD4^+$/caspase 3+ ativadas e o gráfico direito mostra a porcentagem de células $CD8^+$/caspase 3+ ativadas.

Descrição Detalhada

[00183] São aqui fornecidos métodos, composições e artigos de fabricação para uso em conexão com terapia celular, como terapia de células T manipuladas geneticamente para o tratamento de doenças e condições, incluindo vários tumores. As modalidades fornecidas referem-se a composições terapêuticas de células T contendo células T manipuladas geneticamente, tal como aquelas manipuladas geneticamente para expressar proteínas recombinantes, como expressar receptores recombinantes projetados para reconhecer e/ou se ligar especificamente a moléculas associadas à doença ou condição e resultar em uma resposta, tal como uma resposta imune contra tais moléculas

mediante ligação a tais moléculas. Os receptores podem incluir receptores quiméricos, por exemplo, receptores de antígeno quiméricos (CARs) e outros receptores de antígenos transgênicos, incluindo receptores de células T transgênicos (TCRs).

[00184] As modalidades fornecidas em alguns aspectos se referem a aspectos nos quais os fenótipos celulares, por exemplo, a presença e/ou expressão de um marcador de superfície e/ou a ausência ou falta de expressão de um marcador de superfície, estão relacionados à função ou atividade da composição terapêutica das células T, parâmetros farmacocinéticos, por exemplo, exposição ou concentração celular máxima, risco de probabilidade de desenvolver uma toxicidade, tais como síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou neurotoxicidade (NT) e/ou resultado da terapia celular, por exemplo, resposta à terapia celular, em um objeto administrado com a composição de célula T e/ou podem fornecer informações sobre a potência da composição terapêutica de células T. Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas são baseadas na observação de que certos fenótipos celulares, por exemplo, expressão de um ou mais marcadores de superfície, produção de uma ou mais citocinas estão associados a parâmetros farmacocinéticos, probabilidade de resposta e/ou probabilidade de desenvolver uma toxicidade. Em algumas modalidades, a expressão e/ou ausência de expressão de marcadores de superfície celular, tais como receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7), CD27 e CD45RA ou combinações dos mesmos na composição de célula T para administração, por exemplo, composição de droga, são positiva ou negativamente correlacionadas com parâmetros farmacocinéticos e/ou resultados de resposta ou toxicidade. Em alguns aspectos, observa-se aqui que o fenótipo e os atributos funcionais associados a um produto de células T menos diferenciadas ou a um produto enriquecido em subconjuntos de células T do tipo puras ou de memória central se correlacionam ou exibem uma re-

lação com propriedades ou respostas farmacocinéticas aperfeiçoadas, tais como durabilidade da resposta e/ou sobrevida livre de progressão, após administração a um objeto.

[00185] Aspectos das modalidades fornecidas também se referem à administração ou fornecimento de uma dose unitária contendo um número, razão, porcentagem e/ou proporção de células, que é uma função do número de células de um dado fenótipo, tal como um fenótipo indicativo de uma população de células, cada uma inclusive para uso em conexão com a dosagem da composição terapêutica de células T. Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas permitem dosagem e/ou administração consistentes. Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas podem ser usadas para avaliar a probabilidade de um determinado resultado e/ou valor de um determinado parâmetro farmacocinético, risco de toxicidade e/ou resposta, potência ou eficácia da terapia celular. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos podem controlar, melhorar ou reduzir o risco de toxicidade em um objeto administrado com uma dose da composição terapêutica de células T, enquanto assegura a potência da composição de célula T. Também são fornecidos artigos de fabricação contendo as células e projetados para administração de acordo com esses regimes de dosagem.

[00186] Em algumas modalidades, os métodos, doses, doses unitárias, composições e artigos de fabricação fornecidos são baseados em observações de que pode ser vantajoso considerar certos fenótipos, por exemplo, expressão de marcadores de superfície e combinações dos mesmos ao determinar dose apropriada de terapia celular e/ou liberação ou geração de composições celulares para terapia. Em certos métodos disponíveis, as doses são baseadas em números de tipos de células específicos, como aqueles manipulados geneticamente para exibir uma atividade específica, tal como aqueles positivos para um receptor modificado. Por exemplo, em certos métodos e doses dispo-

níveis, a dose é baseada em uma relação observada ou suspeita entre o número (ou número por peso do paciente) de células T manipuladas geneticamente viáveis ou de um subconjunto das mesmas, tal como células T citotóxicas viáveis (por exemplo, $CD8^+$) manipuladas geneticamente. Em vários contextos, esses números podem ter uma relação com resultados de eficácia e/ou segurança, tais como resposta e/ou risco de toxicidade, tais como neurotoxicidade, edema cerebral e CRS. São fornecidas aqui modalidades baseadas na observação de que, no entanto, essas métricas em alguns contextos não se associam adequadamente com parâmetros farmacológicos no objeto, risco de toxicidade, CRS ou NT, particularmente sem considerar outras variáveis. Consequentemente, abordagens para definir a dose e avaliar o produto para liberação que depende apenas dessas métricas podem não ser totalmente satisfatórias. Por exemplo, essas abordagens podem, em alguns contextos, falhar em alcançar uma certa faixa ou janela terapêutica, para terapia celular segura e eficaz. São aqui fornecidos métodos (incluindo métodos de tratamento, dosagem, determinação de dose e ensaio), composições terapêuticas e artigos de fabricação que abordam essas deficiências.

[00187] Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas permitem a administração de uma dose controlada e consistente de células, minimizando assim a variação nos resultados de eficácia e/ou segurança nos objetos. Em alguns aspectos, controlar a dose de células com base em um número, razão, porcentagem e/ou proporções definidas de subconjunto de células específico, por exemplo, com base em fenótipos celulares, permite a compreensão do impacto de um subconjunto de células com fenótipos particulares na saúde, potência e/ou eficácia das células contidas nas composições terapêuticas. Tais abordagens podem ser usadas para determinar e/ou calcular doses efetivas consistentes e precisas das células na terapia celular e/ou controlar os

parâmetros farmacocinéticos da terapia celular. São fornecidos métodos para determinar tais doses, incluindo doses unitárias para administração, com base no número, razão, porcentagem e/ou proporções de células que expressam marcadores de superfície particulares e/ou com fenótipos particulares, artigos de fabricação e kits contendo doses determinadas usando esses métodos e instruções de administração e métodos de tratamento relacionados. Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas permitem a identificação de atributos das células na composição de célula manipulada geneticamente e a potencial associação com farmacocinética (PK) e resultados clínicos, como resposta e toxicidade, com base na consistência e no controle rígido do número de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ CAR^+, e opcionalmente subconjuntos, que são $CCR7^+$, $CD27^+$ e/ou $CD45RA^-$, na composição terapêutica para administração em objetos. Tal consistência e controle rígido do número total de células CAR^+ na composição de célula para administração pode fornecer a base para estratégias para avaliar e controlar outros aspectos das células na composição de célula manipulada geneticamente para administração.

[00188] Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas permitem a administração de composições de célula T CAR^+ que exibem baixa variabilidade, são puras e contêm uma dose precisa, permitindo a identificação de relações entre vários atributos celulares e resultados clínicos, como resposta e toxicidade. Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas são baseadas na observação de que as populações de células que expressam marcadores associados a certos fenótipos, como um fenótipo menos diferenciado, exibem certos perfis funcionais (por exemplo, produção de citocinas). Em alguns aspectos, as células T $CCR7^+$ $CD27^+$ $CD4^+$ CAR produzem IFNγ reduzido e IL-2 aumentada e, em alguns aspectos, as células T $CCR7^+$ $CD27^+$ $CD8^+$ CAR produzem IL-5 e IL-13 reduzidas, tal como na estimulação específica de an-

tígeno do CAR. Em algumas modalidades, as composições de células administradas contendo células T CAR$^+$ nas quais uma certa porcentagem de células na composição exibe um estado menos diferenciado e/ou é CCR7$^+$ CD27$^+$ estão associadas a parâmetros farmacocinéticos desejáveis ou aperfeiçoados, eventos de segurança e resposta durável aumentada, como em comparação com composições contendo uma porcentagem mais baixa de tais populações celulares.

[00189] Todas as publicações, incluindo documentos de patentes, artigos científicos e banco de dados, mencionados neste pedido, são incorporadas por referência na íntegra para todos os fins, na mesma extensão como se cada publicação individual fosse incorporada individualmente por referência. Se uma definição estabelecida neste documento for contrária ou inconsistente com uma definição estabelecida em patentes, pedidos, pedidos publicados e outras publicações que são aqui incorporados por referência, a definição aqui estabelecida prevalece sobre a definição que é incorporada aqui por referência.

[00190] Os cabeçalhos das seções aqui utilizados são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando a matéria descrita.

I. DOSES E DETERMINAÇÃO DE DOSE EM COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICAS DE CÉLULAS T

[00191] São aqui fornecidos métodos, composições e artigos de fabricação para uso em conexão com terapia celular, tal como terapia de células T manipuladas geneticamente para o tratamento de doenças e condições, incluindo vários tumores. As modalidades fornecidas referem-se a métodos para determinar uma dose para administração a um objeto, métodos de tratamento relacionados, composições contendo doses de células e artigos relacionados de fabricação e kits. As modalidades fornecidas em alguns aspectos se relacionam com aspectos nos quais os fenótipos celulares, por exemplo, a presença e/ou

expressão de um marcador de superfície, a ausência ou falta de expressão de um marcador de superfície e/ou a capacidade de produzir uma ou mais citocinas (por exemplo, IL-2), das células na composição para administração, está relacionada a, correlacionada com ou associada a valores ou medições de parâmetros farmacocinéticos, por exemplo, exposição ou concentração celular máxima. Em alguns aspectos, os fenótipos e/ou parâmetros também estão relacionados à correlação ou à atividade e/ou função das células e/ou à probabilidade de desenvolvimento de uma toxicidade, tais como síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou neurotoxicidade (NT) e/ou um resultado da terapia celular, por exemplo, resposta à terapia celular, em um objeto administrado com a composição de célula T, tal como durabilidade da resposta e sobrevida livre de progressão.

[00192] Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas envolvem determinar e/ou administrar uma dose da composição de célula, por exemplo, uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias. Em alguns aspectos, a dose de células é enriquecida por, por exemplo, tem uma porcentagem alta ou relativamente alta de, células T manipuladas geneticamente e biologicamente ativas tendo um fenótipo particular. Em alguns aspectos, a dose é baseada no número de células T manipuladas geneticamente e biologicamente ativas tendo um fenótipo particular. Em alguns aspectos, biologicamente ativas refere-se a uma propriedade de células não programadas para sofrer morte celular, por exemplo, células não apoptóticas ou células que não mostram indicações de entrada em uma via apoptótica. Em alguns aspectos, a dose é baseada no número de células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente e biologicamente ativas tendo um fenótipo particular e/ou, em que a dose é baseada no número total de células T manipuladas geneticamente e biologicamente ativas tendo um fenótipo particular.

[00193] Em algumas modalidades, os métodos asseguram que uma dose unitária abranja um número, proporção, razão e/ou porcentagem relativamente consistente de células manipuladas geneticamente tendo um fenótipo particular em uma ou mais composições particulares. Em alguns aspectos, a consistência está associada ou relacionada a uma atividade, função, parâmetros farmacocinéticos relativamente consistentes, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta. Em algumas modalidades, a porcentagem de células manipuladas geneticamente capazes de atividade consistente, função, parâmetros farmacocinéticos, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta (por exemplo, resposta durável, sobrevida livre de progressão durável) é ou inclui pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) na composição ou do número total de células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) na composição que expressa o receptor recombinante, positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente adicionalmente negativos para a expressão de superfície de CD45RA. Em algumas modalidades, as células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) são adicionalmente negativas para um marcador apoptótico, como a caspase ativada 3 ou a Anexina V. Em algumas modalidades, a porcentagem de células manipuladas geneticamente capazes de atividade consistente, função, parâmetros farmacocinéticos, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta (por exemplo, resposta durável, sobrevida livre de progressão durável) é ou inclui pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% do número total de células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) na composição ou do número total de células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) na composição

que expressa o receptor recombinante, negativos para marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3, Anexina V). Em algumas modalidades, a porcentagem de células manipuladas geneticamente capazes de atividade consistente, função, parâmetros farmacocinéticos, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta (por exemplo, resposta durável, sobrevida livre de progressão durável) é ou inclui pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente na composição ou do número total de células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente que expressam o receptor recombinante capaz de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, a porcentagem de células manipuladas geneticamente capazes de atividade consistente, função, parâmetros farmacocinéticos, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta (por exemplo, resposta durável, sobrevivência livre de progressão durável) é ou inclui pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição ou do número total de células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa. Em algumas modalidades, as células manipuladas geneticamente da composição capazes de atividade consistente, função, parâmetros farmacocinéticos, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta (por exemplo, resposta durável, sobrevivência livre de progressão durável) são ou incluem um ou mais fenótipos aqui descritos. Assim, em algumas modalidades, a porcentagem de células manipuladas geneticamente capazes de atividade consistente, função, parâmetros farmacocinéticos, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta (por exemplo, res-

posta durável, sobrevivência livre de progressão durável) é ou inclui uma combinação de porcentagens de fenótipos. Em algumas modalidades, a composição a ser usada como composição terapêutica é selecionada com base na porcentagem de células, incluindo um ou mais fenótipos na composição (por exemplo, composição de saída).

[00194] Em alguns aspectos, em uma pluralidade de objetos, composições e/ou doses, os números, proporção, razão e/ou porcentagem são relativamente consistentes, por exemplo, o número ou razão de células que têm um fenótipo particular, por exemplo, expressam CCR7 ($CCR7^+$) e/ou têm a capacidade de produzir uma ou mais citocinas, na composição ou dose unitária, varia não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%. Em alguns aspectos, o número ou a razão de células que têm um fenótipo particular, por exemplo, expressam CCR7 ($CCR7^+$) e/ou a capacidade de produzir uma ou mais citocinas, na composição ou na dose unitária, varia não mais do que 20% ou não mais do que 10% ou não mais do que 5% de uma média do referido número ou razão em uma pluralidade de composições de célula T produzidas pelo processo e/ou varia dessa média em não mais do que um desvio padrão ou varia em não mais do que 20% ou não mais do que 10% ou não mais do que 5% entre uma pluralidade de composições de célula T ou doses determinadas.

[00195] Em algumas modalidades, os métodos envolvem a determinação e/ou administração de uma ou mais doses unitárias de células, por exemplo, células T manipuladas geneticamente que expressam um receptor recombinante, como um CAR. Em alguns aspectos, os métodos envolvem a administração de uma ou mais doses unitárias de células nas quais as uma ou mais doses unitárias de células são enriquecidas e/ou contêm uma porcentagem alta ou relativamente alta de células com um fenótipo particular, como fenótipo de marcador de

superfície particular e/ou indicação de atividade funcional, como a capacidade de produzir uma ou mais citocinas. Em alguns aspectos, a dose unitária é determinada com base no número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de um subconjunto particular de células T manipuladas geneticamente, por exemplo, células com um fenótipo particular, como fenótipo de marcador de superfície particular e/ou indicação de atividade funcional, como a capacidade de produzir uma ou mais citocinas. Em algumas modalidades, uma composição de célula terapêutica ou manipulada geneticamente pode ser produzida por um método que resulta em uma composição de saída contendo ou enriquecida para células com esses fenótipos ou atributos funcionais, tal como comparada ao material de partida ou composição de entrada usada para gerar a composição de saída manipulada geneticamente. Exemplos de fenótipo e atributos funcionais de células de uma composição de célula terapêutica ou manipulada geneticamente, tal como uma composição de saída produzida de acordo com métodos para gerar células manipuladas geneticamente, incluindo em uma ou mais doses unitárias de qualquer composição, são aqui descritos.

[00196] Em alguns aspectos, o marcador celular inclui marcadores indicativos de saúde celular, viabilidade e/ou estado apoptótico das células. Em alguns aspectos, marcadores exemplares incluem CD3, CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, Anexina V ou caspase ativada 3. Em alguns aspectos, marcadores exemplares incluem CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em alguns aspectos, marcadores exemplares incluem CCR7 e/ou CD27. Em alguns aspectos, um marcador exemplar é o CCR7. Em alguns aspectos, um marcador exemplar é CD27.

[00197] Em alguns aspectos, os métodos fornecidos também envolvem avaliar a composição terapêutica para fenótipos celulares, por exemplo, expressão dos marcadores, por exemplo CD3, CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, Anexina V ou caspase ativada 3. Em algumas

modalidades, o fenótipo inclui funções específicas de antígeno. Em algumas modalidades, o fenótipo inclui produção ou secreção de uma citocina, por exemplo, mediante estimulação com um antígeno que o receptor recombinante, por exemplo, CAR, especificamente liga e/ou reconhece. Em algumas modalidades, o fenótipo inclui produção de citocinas, por exemplo, citocinas associadas a tipos celulares específicos, como citocinas associadas aos subtipos Th1, Th2, Th17 e/ou Treg.

[00198] Em alguns aspectos, os métodos fornecidos envolvem a determinação de uma dose adequada, por exemplo, uma ou mais doses unitárias de uma composição terapêutica contendo células T manipuladas geneticamente para administração a um objeto tendo uma doença ou condição. Em alguns aspectos, os métodos também envolvem avaliar o número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de um subconjunto particular de células T manipuladas geneticamente, por exemplo, células com um fenótipo particular, como fenótipo de marcador de superfície particular, em uma composição terapêutica que contém células T manipuladas geneticamente. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos envolvem avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 (receptor$^+$/$CCR7^+$).

[00199] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos envolvem avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45RA. Outros marcadores fenotípicos exemplares para avaliação e/ou métodos de avaliação são descritos abaixo, por exemplo, na Se-

ção I.A. Em alguns aspectos, a dose unitária pode ser determinada com base em qualquer uma das avaliações. Em alguns aspectos, os métodos também envolvem avaliar o número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção das células que expressam o receptor recombinante (por exemplo, CAR) ou um marcador substituto do receptor recombinante. As doses, por exemplo, uma ou mais doses unitárias, podem ser determinadas com base na avaliação do número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de qualquer um dos marcadores fenotípicos aqui descritos.

A. Determinação de Fenótipos Celulares

[00200] Em algumas modalidades, os fenótipos celulares, ou o nível ou a porcentagem de tais fenótipos em uma composição de célula, correlacionam-se ou estão associados à atividade e/ou função das células e/ou à probabilidade de desenvolvimento de uma toxicidade, como síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou neurotoxicidade (NT) e/ou um resultado da terapia celular, por exemplo, resposta à terapia celular, em um objeto administrado com a composição de célula T, tais como durabilidade da resposta e sobrevida livre de progressão. Em algumas modalidades, composições incluindo células com fenótipos particulares e, mais particularmente, porcentagens de células com esses fenótipos específicos, correlacionam-se com resultados clínicos, como resposta durável e/ou sobrevivência livre de progressão. Em algumas modalidades, o fenótipo é determinado pela avaliação da presença ou ausência de uma ou mais moléculas específicas, incluindo moléculas de superfície e/ou moléculas que podem acumular ou ser produzidas pelas células ou uma subpopulação de células dentro de uma composição de célula T. Em algumas modalidades, o fenótipo, direta ou inversamente, indica ou é indicativo de uma atividade biológica das células ou de uma população de células dentro da composição de célula T. Em algumas modalidades, o fenótipo pode incluir a ativi-

dade celular, como a produção de um fator (por exemplo, citocina) em resposta a um estímulo. Em certas modalidades, a avaliação de uma composição de célula é realizada para identificar, detectar ou quantificar um fenótipo da composição de célula. Em modalidades particulares, uma medição de uma composição de célula é realizada para identificar, detectar ou quantificar a presença, ausência, grau de expressão ou nível de uma molécula específica.

[00201] É contemplado que o fenótipo da composição de célula (por exemplo, composição de célula T manipulada geneticamente) pode, em alguns casos, depender de muitos fatores, incluindo, mas não se limitando ao fenótipo do material celular inicial (por exemplo, produto de aférese ou produto de leucaférese) usado para gerar a composição de célula e o fenótipo do material celular submetido a processamento para gerar a composição de célula. Assim, em algumas modalidades, o fenótipo é avaliado em células do material de partida e/ou do material submetido a processamento para gerar a composição de célula, bem como a composição de célula final.

[00202] Em algumas modalidades, o fenótipo é indicativo de viabilidade de uma célula. Em algumas modalidades, o fenótipo é indicativo de ausência de apoptose, ausência de estágios iniciais de apoptose ou ausência de estágios finais de apoptose. Em algumas modalidades, o fenótipo é a ausência de um fator indicativo de ausência de estágios de apoptose, apoptose inicial ou tardio de apoptose. Em algumas modalidades, o fenótipo é um fenótipo de uma subpopulação ou subconjunto de células T, como células T que expressam receptores recombinantes (por exemplo, células T CAR^+), células T $CD8^+$ ou células T $CD4^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é um fenótipo de células que não são ativadas e/ou que carecem ou são reduzidas para ou baixas para expressão de um ou mais marcadores de ativação. Em algumas modalidades, o fenótipo é um fenótipo de células que não estão

depletadas e/ou que carecem ou são reduzidas para ou baixas para a expressão de um ou mais marcadores de exaustão.

[00203] Em algumas modalidades, o fenótipo é indicado pela presença, ausência ou nível de expressão em uma célula de uma ou mais moléculas específicas, tais como certos marcadores de superfície indicativos do fenótipo, por exemplo, proteínas de superfície, marcadores intracelulares indicativos do fenótipo ou ácidos nucleicos indicativos do fenótipo ou outras moléculas ou fatores indicativos do fenótipo. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou compreende uma expressão positiva ou negativa de uma ou mais moléculas específicas. Em algumas modalidades, as moléculas específicas incluem, mas não estão limitadas a, um marcador de superfície, por exemplo, uma glicoproteína de membrana ou um receptor; um marcador associado à apoptose ou viabilidade; ou uma molécula específica que indica o status de uma célula imune, por exemplo, um marcador associado à ativação, exaustão ou um fenótipo maduro ou puro. Em algumas modalidades, qualquer método conhecido para avaliar ou medir, contar e/ou quantificar células com base em moléculas específicas pode ser usado para determinar o número de células do fenótipo.

[00204] Em algumas modalidades, um fenótipo é ou inclui uma expressão positiva ou negativa de uma ou mais moléculas específicas em uma célula. Em algumas modalidades, a expressão positiva é indicada por uma quantidade detectável da molécula específica na célula. Em certas modalidades, a quantidade detectável é qualquer quantidade detectada da molécula específica na célula. Em modalidades particulares, a quantidade detectável é uma quantidade maior que um fundo, por exemplo, coloração de fundo, sinal, etc., na célula. Em certas modalidades, a expressão positiva é uma quantidade da molécula específica que é maior que um limite, por exemplo, um limite predeterminado. Da mesma forma, em modalidades particulares, uma célula com

expressão negativa de uma molécula específica pode ser qualquer célula que não seja determinada como tendo expressão positiva ou é uma célula que não possui uma quantidade detectável da molécula específica ou uma quantidade detectável da molécula específica acima do fundo. Em algumas modalidades, a célula tem expressão negativa de uma molécula específica se a quantidade da molécula específica estiver abaixo de um limite. Um especialista na técnica entenderá como definir um limite para definir expressão positiva e/ou negativa para uma molécula específica como uma questão de habilidade rotineira, e que os limites podem ser definidos de acordo com parâmetros específicos de, por exemplo, mas não limitado a, ensaio ou método de detecção, identidade da molécula específica, reagentes usados para detecção e instrumentação.

[00205] Exemplos de métodos que podem ser usados para detectar uma molécula específica e/ou analisar um fenótipo das células incluem, mas não estão limitados a, análises bioquímicas; análise imunoquímica; análise de imagem; análise citomorfológica; análise de moléculas como PCR, sequenciamento, sequenciamento de alto rendimento, determinação de metilação de DNA; análise proteômica, como determinação de glicosilação de proteínas e/ou padrão de fosforilação; análise genômica; análise epigenômica (por exemplo, ChIP-seq ou ATAC-seq); análise transcriptômica (por exemplo, RNA-seq); e qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, os métodos podem incluir avaliação do repertório de receptores imunes, por exemplo, repertório de receptores de células T (TCRs). Em alguns aspectos, a determinação de qualquer um dos fenótipos pode ser avaliada em métodos de alto rendimento, automatizados e/ou baseados em células únicas. Em alguns aspectos, métodos em larga escala ou de genoma amplo, podem ser usados para identificar uma ou mais assinaturas moleculares. Em alguns aspectos, métodos em larga escala ou de ge-

noma amplo, podem ser usados para identificar assinaturas moleculares que estão associadas aos resultados da terapia, por exemplo, eficácia e segurança ou parâmetros farmacocinéticos. Em alguns aspectos, uma ou mais assinaturas moleculares, por exemplo, expressão de RNA ou proteínas específicas na célula, podem ser determinadas. Em algumas modalidades, características moleculares do fenótipo analisado por análise de imagem, PCR (incluindo o padrão e todas as variantes de PCR), microarranjo (incluindo, mas não limitado a microarranjo de DNA, MMchips para microRNA, microarranjo de proteínas, microarranjo celular, microarranjo de anticorpos, e arranjo de carboidratos), sequenciamento, detecção de biomarcadores ou métodos para determinar o padrão de metilação de DNA ou glicosilação de proteína. Em modalidades particulares, a molécula específica é um polipeptídeo, isto é, uma proteína. Em algumas modalidades, a molécula específica é um polinucleotídeo.

[00206] Em algumas modalidades, a expressão positiva ou negativa de uma molécula específica é determinada incubando células com um ou mais anticorpos ou outro agente de ligação que se ligam especificamente a um ou mais marcadores de superfície expressos ou expressos (marcador^{+}) em um nível relativamente mais alto (marcador^{alto}) nas células selecionadas positiva ou negativamente, respectivamente. Em modalidades particulares, a expressão positiva ou negativa é determinada por citometria de fluxo, imuno-histoquímica ou qualquer outro método adequado para detectar marcadores específicos.

[00207] Em modalidades particulares, a expressão de uma molécula específica é avaliada com citometria de fluxo. A citometria de fluxo é uma tecnologia biofísica baseada em laser ou impedância empregada na contagem de células, classificação de células, detecção de biomarcadores e manipulação genética de proteínas, suspendendo as células em uma corrente de fluido e passando-as por um aparelho de detec-

ção eletrônica. Permite a análise multiparamétrica simultânea das características físicas e químicas de até milhares de partículas por segundo.

[00208] Os dados gerados pelos citômetros de fluxo podem ser plotados em uma única dimensão, para produzir um histograma, ou em gráficos de pontos bidimensionais ou mesmo tridimensional. As regiões nessas parcelas podem ser sequencialmente separadas, com base na intensidade da fluorescência, criando uma série de extrações de subconjuntos, denominadas "portas". Existem protocolos de bloqueio específicos para fins de diagnóstico e clínicos, especialmente em relação à imunologia. Muitas vezes, são feitas plotagens em escalas logarítmicas. Como os espectros de emissão de diferentes corantes fluorescentes se sobrepõem, os sinais nos detectores precisam ser compensados eletronicamente e computacionalmente. Os dados acumulados usando o citômetro de fluxo podem ser analisados usando software, por exemplo, JMP (software de estatística), WinMDI, Software de fluxo e Cytobank baseado na Web), Cellcion, FCS Express, FlowJo, FACCDiva, CytoPaint (também conhecido como Paint-A-Gate), VenturiOne, CellQuest Pro, Infinicyt ou Cytospec.

[00209] A citometria de fluxo é uma técnica padrão na área e um especialista na técnica entenderia prontamente como projetar ou adaptar protocolos para detectar uma ou mais moléculas específicas e analisar os dados para determinar a expressão de uma ou mais moléculas específicas em uma população de células. Protocolos e técnicas padrão para citometria de fluxo são encontrados em Loyd "Flow Cytometry in Microbiology; Practical Flow Cytometry por Howard M. Shapiro; Flow Cytometry for Biotechnology por Larry A. Sklar, Handbook of Flow Cytometry Methods por J. Paul Robinson, et al., Current Protocols in Cytometry, Wiley-Liss Pub, Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, v4, (Carey, McCoy, e Keren, eds), ASCP Press, 2007, Ormerod,

M.G. (ed.) (2000) Flow Cytometry -A practical approach. 3º edição. Oxford University Press, Oxford, UK, Ormerod, M.G. (1999) Flow Cytometry. 2º edição. BIOS Scientific Publishers, Oxford., e Flow Cytometry -A basic introduction. Michael G. Ormerod, 2008.

[00210] Em algumas modalidades, as células são classificadas por fenótipo para análise posterior. Em algumas modalidades, as células de diferentes fenótipos dentro da mesma composição de célula são classificadas por classificação celular ativada por fluorescência (FACS). FACS é um tipo especializado de citometria de fluxo que permite classificar uma mistura heterogênea de células em dois ou mais recipientes, uma célula por vez, com base nas características específicas da dispersão de luz e fluorescência de cada célula. É um instrumento científico útil, pois fornece registro rápido, objetivo e quantitativo de sinais fluorescentes de células individuais, bem como separação física de células de interesse particular.

[00211] Em algumas modalidades, o fenótipo inclui o número total de células T ou o número total de células T $CD3^+$. Em modalidades particulares, uma composição de célula T, por exemplo, uma composição terapêutica de células T que contém células que expressam um receptor recombinante ou um CAR, pode incluir um ou mais subtipos diferentes de células T. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a identidade de um subtipo de célula T. Diferentes populações ou subtipos de células T incluem, mas não estão limitados a, células T efetoras, células T auxiliares, célula T de memória, células T reguladoras, células T puras, células T $CD4^+$ e células $CD8^+$. Em certas modalidades, um subtipo de célula T pode ser identificado pela detecção da presença ou ausência de uma molécula específica. Em certas modalidades, a molécula específica é um marcador de superfície que pode ser usado para identificar um subtipo de célula T.

[00212] Em algumas modalidades, o fenótipo é expressão positiva

ou de alto nível de uma ou mais moléculas específicas que são marcadores de superfície, por exemplo, CD3, CD4, CD8, CD8, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD4, CD8, CD45RA, e/ou CD45RO. Em certas modalidades, o fenótipo é um marcador de superfície de células T ou de uma subpopulação ou subconjunto de células T, como com base na expressão positiva de marcador de superfície de um ou mais marcadores de superfície, por exemplo, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, CD28+, CD62L+, $CCR7^+$, $CD27^+$, CD127+, $CD4^+$, $CD8^+$, CD45RA+ e/ou $CD45RO^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é expressão positiva ou de alto nível de uma ou mais molécula específica que são marcadores de superfície, por exemplo, receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7), Cluster de diferenciação 27 (CD27), Cluster de diferenciação 28 (CD28), e Cluster de diferenciação 45 RA (CD45RA). Em certas modalidades, os marcadores de fenótipo incluem CCR7, CD27, CD28, CD44, CD45RA, CD62L e L-selectina. Em algumas modalidades, o fenótipo é negativo ou a ausência de expressão de uma ou mais molécula específica que são marcadores de superfície, por exemplo, CD3, CD4, CD8, CD8, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD4, CD8, CD45RA e/ou CD45RO. Em certas modalidades, o fenótipo é um marcador de superfície de células T ou de uma subpopulação ou subconjunto de células T, como com base na ausência de expressão de marcador de superfície de um ou mais marcadores de superfície, por exemplo, $CD3^-$, $CD4^-$, CD8-, $CD28^-$, $CD62L^-$, $CCR7^-$, $CD27^-$, $CD127^-$, $CD4^-$, $CD8^-$, $CD45RA^-$ e/ou $CD45RO^-$. Em algumas modalidades, o fenótipo é negativo ou a ausência de expressão de uma ou mais molécula específica que são marcadores de superfície, por exemplo, receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7), cluster de diferenciação 27 (CD27), cluster de diferenciação 28 (CD28) e Cluster de diferenciação 45 RA (CD45RA). Em certas modalidades, os marcadores de fenótipo incluem CCR7, CD27, CD28, CD44, CD45RA, CD62L

e L-selectina.

[00213] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de CD27, CCR7 e/ou CD45RA. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CD27^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CD45RA^-$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD45RA^-$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CD27^+/CD45RA^-$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-$.

[00214] Em certas modalidades, o marcador de superfície indica a expressão de um receptor recombinante, por exemplo, um CAR. Em modalidades particulares, o marcador de superfície é a expressão do receptor recombinante, por exemplo, CAR, que, em alguns aspectos, pode ser determinado usando um anticorpo, como um anticorpo anti-idiotipo. Em algumas modalidades, o marcador de superfície que indica a expressão do receptor recombinante é um marcador substituto. Em modalidades particulares, esse marcador substituto é uma proteína de superfície que foi modificada para ter pouca ou nenhuma atividade. Em certas modalidades, o marcador substituto é codificado no mesmo polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante. Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante está operacionalmente ligada a uma sequência de ácido nucleico que codifica um marcador, opcionalmente separado por um sítio interno de entrada ribossomal (IRES), ou um ácido nucleico que codifica um peptídeo que se autocliva ou um peptídeo que causa um salto no ribossoma, como uma sequência 2A, como um T2A (por exemplo, SEQ ID NOS: 6 e 17), um P2A (por exemplo, SEQ ID NOS: 18 e 19), um E2A (por exemplo, SEQ ID NO: 20) ou um F2A (por exemplo, SEQ ID NO: 21). Genes marcadores extrínsecos podem em alguns casos ser utilizados em conexão com células manipuladas ge-

neticamente para permitir a detecção ou seleção de células e, em alguns casos, também para promover o suicídio celular.

[00215] Marcadores substitutos exemplares podem incluir polipeptídeos de superfície celular truncados, tal como um receptor de fator de crescimento epidérmico humano truncado 2 (tHER2), um receptor de fator de crescimento epidérmico truncado (EGFRt, sequência de EGFRt exemplar estabelecida em SEQ ID NO: 7 ou 16) ou um antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) ou sua forma modificada. O EGFRt pode conter um epítopo reconhecido pelo anticorpo cetuximab (Erbitux®) ou outro anticorpo terapêutico anti-EGFR ou molécula de ligação, que pode ser usado para identificar ou selecionar células que foram modificadas com o construto EGFRt e um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou para eliminar ou separar células que expressam o receptor. Vide Patente U.S. No. 8.802.374 e Liu et al., Nature Biotech. Abril de 2016; 34 (4): 430-434). Em alguns aspectos, o marcador, por exemplo, marcador substituto, inclui todo ou parte (por exemplo, forma truncada) de CD34, um NGFR, ou receptor de fator de crescimento epidérmico (por exemplo, tEGFR). Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o marcador está operacionalmente ligado a um polinucleotídeo que codifica uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante clivável, por exemplo, T2A. Por exemplo, um marcador e, opcionalmente, uma sequência de ligante, pode ser qualquer como divulgada em Pub. PCT WO2014031687. Por exemplo, o marcador pode ser um EGFR truncado (tEGFR) que é, opcionalmente, ligado a uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante clivável em T2A. Um polipeptídeo exemplar para um EGFR truncado (por exemplo, tEGFR) compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 7 ou 16 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 7 ou 16.

[00216] Em algumas modalidades, o marcador é ou compreende uma proteína fluorescente, tal como proteína verde fluorescente (GFP), proteína verde fluorescente aperfeiçoada (EGFP), tal como GFP superdobrável, proteína fluorescente vermelha (RFP), tais como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed ou DsRed2, proteína fluorescente ciano (CFP), proteína fluorescente verde azul (BFP), proteína fluorescente azul aperfeiçoada (EBFP) e proteína fluorescente amarela (YFP) e variantes das mesmas, incluindo variantes de espécies, variantes monoméricas e variantes otimizadas por códon e/ou aperfeiçoadas das proteínas fluorescentes. Em algumas modalidades, o marcador é ou compreende uma enzima, tal como uma luciferase, o gene lacZ de *E. coli*, fosfatase alcalina, fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferase (CAT). Exemplos de genes repórteres emissores de luz incluem luciferase (luc), β-galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), β-glucuronidase (GUS) ou variantes dos mesmos.

[00217] Em certas modalidades, o fenótipo compreende expressão, por exemplo expressão de superfície, de um ou mais dos marcadores de superfície CD3, CD4, CD8 e/ou um receptor recombinante (por exemplo, CAR) ou seu marcador substituto indicando ou correlacionando com a expressão de um receptor recombinante (por exemplo, CAR).

[00218] Em modalidades particulares, o fenótipo é identificado pela expressão de uma ou mais moléculas específicas que são marcadores de superfície. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de CD3, CD4, CD8 e/ou um receptor recombinante, por exemplo um CAR. Em certas modalidades, o receptor recombinante é um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo compreen-

de $CD3^+/CAR^+$, $CD4^+/CAR^+$ e/ou $CD8^+/CAR^+$.

[00219] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de CD27, CCR7 e/ou CD45RA e/ou um receptor recombinante, por exemplo um CAR. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CD27^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD27^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CD45RA^-/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD45RA^-/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CD27^+/CD45RA^-/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD27^+/CD45RA^-/CAR^+$.

[00220] Em algumas modalidades, o fenótipo é viabilidade. Em certas modalidades, o fenótipo é a expressão positiva de um marcador que indica que a célula se submeteu a processos celulares funcionais normais e/ou não se submeteu ou não está sob o processo de necrose ou morte celular programada. Em algumas modalidades, a viabilidade pode ser avaliada pelo potencial redox da célula, pela integridade da membrana celular ou pela atividade ou função das mitocôndrias. Em algumas modalidades, viabilidade é a ausência de uma molécula específica associada à morte celular, ou a ausência da indicação de morte celular em um ensaio.

[00221] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou compreende a viabilidade celular. Em certas modalidades, a viabilidade das células pode ser detectada, medida e/ou avaliada por vários meios que são rotineiros na técnica. Exemplos não limitativos de tais ensaios de viabilidade incluem, mas não estão limitados a, ensaios de captação de corante (por exemplo, ensaios AM de calceína), ensaios de viabilidade celular XTT e ensaios de exclusão de corantes (por exemplo, ensaios de exclusão de corantes de azul de tripano, eosina ou propídio). Os ensaios de viabilidade são úteis para determinar o número ou porcentagem (por exemplo, frequência) de células viáveis em uma dose celu-

lar, uma composição de célula e/ou uma amostra celular. Em modalidades particulares, o fenótipo compreende viabilidade celular juntamente com outras características, por exemplo, expressão do receptor recombinante.

[00222] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui viabilidade celular, $CD3^+$ viável, $CD4^+$ viável, $CD8^+$ viável, $CD3^+/CAR^+$ viável, $CD4^+/CAR^+$ viável, $CD8^+/CAR^+$ viável, $CD8^+/CAR^+$ viável, $CD4^+/CCR7^+/CAR$ viável, $CD8^+/CD27^+$ viável/CAR^+, $CD4^+/CD27^+/CAR^+$ viável, $CD8^+/CCR7^+/CD27^+/CAR^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^+/CAR^+$ viável, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-/CAR$ viável, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-/CAR^+$ ou $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ ou uma combinação viável.

[00223] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui uma ausência de apoptose e/ou uma indicação de que a célula está passando pelo processo apoptótico. A apoptose é um processo de morte celular programada que inclui uma série de eventos morfológicos e bioquímicos estereotipados que levam a alterações celulares características e morte. Essas alterações incluem formação de bolha (blebbing), encolhimento celular, fragmentação nuclear, condensação de cromatina, fragmentação cromossômica do DNA e decaimento global do mRNA. A apoptose é um processo bem caracterizado, e moléculas específicas associadas a vários estágios são bem conhecidas na técnica.

[00224] Em algumas modalidades, o fenótipo é a ausência de um estágio inicial de apoptose e/ou a ausência de um indicador e/ou de uma molécula específica associada a um estágio inicial de apoptose. Nos estágios iniciais da apoptose, mudanças na membrana celular e mitocondrial se tornam aparentes. Alterações bioquímicas também são aparentes no citoplasma e no núcleo da célula. Por exemplo, os estágios iniciais da apoptose podem ser indicados pela ativação de certas caspases, por exemplo, 2, 8, 9 e 10. Em modalidades particulares, o

fenótipo é a ausência de um estágio tardio da apoptose e/ou a ausência de um indicador e/ou uma molécula específica associada a um estágio tardio da apoptose. Os estágios médio e tardio da apoptose são caracterizados por perda adicional da integridade da membrana, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, e incluem eventos bioquímicos, como a ativação de caspases 3, 6 e 7.

[00225] Em certas modalidades, o fenótipo é a expressão negativa de um ou mais fatores associados à apoptose, incluindo fatores pró-apoptóticos conhecidos por iniciar a apoptose, por exemplo, membros da via do receptor de morte, membros ativados da via mitocondrial (intrínseca), como membros da família Bcl-2, por exemplo, Bax, Bad e Bid e caspases. Em algumas modalidades, o fenótipo é uma quantidade negativa ou baixa de um marcador de apoptose. Em certas modalidades, o fenótipo é a expressão negativa de um marcador de apoptose. Em certas modalidades, o fenótipo é a ausência de um indicador, por exemplo, uma molécula de Anexina V, que se ligará preferivelmente a células submetidas à apoptose quando incubadas com ou contatadas com uma composição de célula. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a expressão de um ou mais marcadores que são indicativos de um estado apoptótico na célula.

[00226] Em algumas modalidades, o fenótipo é a expressão negativa (ou baixa) de uma molécula específica que é um marcador de apoptose. Vários marcadores de apoptose são conhecidos dos versados na técnica e incluem, mas não estão limitados a, um aumento na atividade de uma ou mais caspases, isto é, uma caspase ativada (por exemplo, uma caspase ativa), um aumento na clivagem de PARP, ativação e/ou translocação de proteínas da família Bcl-2, membros da via de morte celular, por exemplo, Fas e FADD, presença de encolhimento nuclear (por exemplo, monitorada por microscópio) e presença de fragmentação do DNA cromossômico (por exemplo, presença de frag-

mentação de DNA cromossômica) ou com ensaios de apoptose que incluem coloração com TUNEL e coloração com Anexina V.

[00227] Caspases são enzimas que clivam proteínas após um resíduo de ácido aspártico, o termo é derivado de "proteases de ácido cisteína-aspártico". As caspases estão envolvidas na apoptose, portanto, a ativação de caspases, como a caspase-3, é indicativa de um aumento ou ressurgimento da apoptose. Em certas modalidades, a ativação da caspase pode ser detectada por métodos conhecidos pelo especialista na matéria. Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga especificamente a uma caspase ativada (isto é, se liga especificamente ao polipeptídeo clivado) pode ser usado para detectar a ativação da caspase. Em outro exemplo, um ensaio de inibidor de fluorocromo da atividade da caspase (FLICA) pode ser utilizado para detectar a ativação da caspase-3, detectando a hidrólise de acetil Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) por caspase-3 (isto é, detectar liberação da 7-amino-4-metilcumarina fluorescente (AMC)). Os ensaios FLICA podem ser usados para determinar a ativação da caspase detectando o produto de um substrato processado por várias caspases (por exemplo, FAM-VAD-FMK FLICA). Outras técnicas incluem os ensaios CASPASE-GLO® caspase (PROMEGA) que usam substrato luminogênico de caspase-8 tetrapeptídeo (Z-LETD-aminoluciferina), o substrato caspase-9 tetrapeptídeo (Z-LEHD-aminoluciferina), o substrato caspase-3/7 (Z-DEVD-aminoluciferina), o substrato da caspase-6 (Z-VEID-aminoluciferina) ou o substrato da caspase-2 (Z-VDVAD-aminoluciferina).

[00228] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão negativa da caspase-1 ativada, caspase-2 ativada, caspase-3 ativada, caspase-7 ativada, caspase-8 ativada, caspase-8 ativada, caspase-9 ativada, caspase-10 ativada e/ou caspase-13 ativada em uma célula. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a caspase 3^- ativa-

da. Em algumas modalidades, a forma pró-forma (clivada por zimogênio) de uma caspase, como qualquer uma acima, também é um marcador que indica a presença de apoptose. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a ausência ou expressão negativa de uma proforma de uma caspase, como a pró-forma da caspase-3.

[00229] Em algumas modalidades, o marcador de apoptose é clivado a Poli ADP-ribose polimerase 1 (PARP). PARP é clivada pela caspase durante os estágios iniciais da apoptose. Assim, a detecção de um peptídeo PARP clivado é um marcador para apoptose. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de PARP clivada.

[00230] Em algumas modalidades, o marcador de apoptose é um reagente que detecta um recurso em uma célula que está associada à apoptose. Em certas modalidades, o reagente é uma molécula de Anexina V. Durante os estágios iniciais da apoptose, a fosfatidilserina lipídica (PS) transloca-se do folheto interno para o externo da membrana plasmática. O PS é normalmente restrito à membrana interna em células saudáveis e/ou não apoptóticas. A Anexina V é uma proteína que se liga preferivelmente à fosfatidilserina (PS) com alta afinidade. Quando conjugada com um marcador fluorescente ou outro repórter, a Anexina V pode ser usada para detectar rapidamente esse indicador precoce de apoptose na superfície celular. Em algumas modalidades, a presença de PS na membrana externa persistirá nos estágios finais da apoptose. Assim, em algumas modalidades, a coloração com Anexina V é uma indicação dos estágios inicial e tardio da apoptose. Em certas modalidades, uma anexina, por exemplo, A Anexina V é etiquetada com um marcador detectável e incubada, exposta e/ou contatada com células de uma composição de célula para detectar células que sofrem apoptose, por exemplo, por citometria de fluxo. Em algumas modalidades, anexinas marcadas com fluorescência, por exem-

plo, Anexina V, são usadas para colorir células para análise por citometria de fluxo, por exemplo, com o ensaio de anexina$^-$V/7$^-$AAD. Protocolos alternativos adequados para detecção de apoptose com anexina incluem técnicas e ensaios que utilizam anexina V radimarcada. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui coloração negativa pela anexina, por exemplo, anexina V$^-$. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a ausência de PS na membrana plasmática externa. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui células que não estão ligadas pela anexina, por exemplo, Anexina V. Em certas modalidades, a célula que não possui PS detectável na membrana externa é Anexina V$^-$. Em modalidades particulares, a célula que não está ligada à Anexina V$^-$ em um ensaio, por exemplo, citometria de fluxo após incubação com Anexina V marcada, é Anexina V$^–$.

[00231] Em modalidades particulares, o fenótipo é anexina V$^–$, anexina V$^–$ CD3$^+$, anexina V$^–$CD4$^+$, anexina V$^–$ CD8$^+$, anexina V$^–$ CD3$^+$/CAR$^+$, anexina V$^–$ CD4$^+$/CAR$^+$, anexina V$^–$ CD8$^+$/CAR$^+$, caspase 3$^–$ ativada, caspase 3$^–$/CD3$^+$ ativada, caspase ativada 3$^–$/CD4$^+$, caspase ativada 3$^–$ /CD8$^+$, caspase ativada 3$^–$/CD3$^+$/CAR$^+$, caspase ativada 3$^–$/ CD4$^+$/CAR$^+$, caspase ativada 3$^–$/CD8$^+$/CAR$^+$, anexina V$^–$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CAR$^+$, anexina V$^–$/CD8$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, anexina V-/CD4$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, anexina V$^–$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, anexina V-/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, anexina V$^–$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^–$/CAR$^+$ ou anexina V-/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^–$; caspase ativada 3$^–$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CAR$^+$, caspase ativada 3-/CD8$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, caspase ativada 3$^–$/CD4$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, caspase ativada 3$^–$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, caspase ativada 3$^–$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$, caspase ativada 3$^–$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^–$CAR$^+$ ou caspase ativada 3$^–$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^–$ou uma combinação dos mesmos.

[00232] Modalidades particulares contemplam que as células positivas para expressão de um marcador para apoptose estão sofrendo

morte celular programada, mostram função imune reduzida ou inexistente e têm capacidades diminuídas, se houver, para ativação, expansão e/ou ligação a um antígeno para iniciar, realizar ou contribuir para uma resposta ou atividade imune. Em modalidades particulares, o fenótipo é definido pela expressão negativa para uma caspase ativada e/ou coloração negativa com Anexina V.

[00233] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a caspase 3-ativada (caspase 3-) e/ou a Anexina V-.

[00234] Entre os fenótipos estão a expressão ou expressão de superfície de um ou mais marcadores geralmente associados a um ou mais subtipos ou subpopulações de células T, ou fenótipos dos mesmos. Os subtipos e subpopulações de células T podem incluir células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$ e subtipos das mesmas que podem incluir células T (T_N) puras, células T efetoras (T_{EFF}), células T de memória e subtipos das mesmas, tais como memória T de células tronco (T_{SCM}), memória central T (T_{CM}), memória efetiva T (T_{EM}), células T_{EMRA} ou células T de memória efetiva terminalmente diferenciada, linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), células T imaturas, células T maduras, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T invariantes associadas à mucosa, células T reguladoras adaptativas e que ocorrem naturalmente (Treg), células T auxiliares, tais como células TH1, células TH2, células TH3, células TH17, células TH17, células TH9, células TH22, auxiliar folicular T, células T alfa/beta e células T delta/gama.

[00235] Em alguns aspectos, entre os fenótipos incluem expressão ou marcadores ou funções, por exemplo funções específicas de antígeno, como secreção de citocinas, que estão associadas a um subconjunto de células menos diferenciado ou a um subconjunto mais diferenciado. Em algumas modalidades, os fenótipos são aqueles associados a um subconjunto menos diferenciado, como um ou mais da produção de $CCR7^+$, $CD27^+$ e interleucina-2 (IL-2). Em alguns aspec-

tos, subconjuntos menos diferenciados também podem estar relacionados à eficácia terapêutica, autorrenovação, funções de sobrevivência ou doença do enxerto contra hospedeiro. Em algumas modalidades, os fenótipos são aqueles associados a um subconjunto mais diferenciado, como um ou mais da produção de interferon-gama (IFN-γ) ou IL-13. Em alguns aspectos, subconjuntos mais diferenciados também podem estar relacionados à senescência e função efetora.

[00236] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui um fenótipo de uma célula T de memória ou subconjunto de células T de memória exposto ao seu antígeno cognato. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui um fenótipo de uma célula T de memória (ou um ou mais marcadores associados a ela), como uma célula T_{CM}, uma célula T_{EM} ou uma célula T_{EMRA}, uma célula T_{SCM} ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a expressão de uma ou mais moléculas específicas que são um marcador para memória e/ou células T de memória ou seus subtipos. Em alguns aspectos, fenótipos exemplares associados às células T_{CM} podem incluir um ou mais CD45RA$^-$, CD62L+, CCR7$^+$ e CD95 +. Em alguns aspectos, fenótipos exemplares associados às células TEM podem incluir um ou mais CD45RA$^-$, CD62L-, CCR7- e CD95 +.

[00237] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a expressão de uma ou mais moléculas específicas que são um marcador para células T puras.

[00238] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma célula T de memória ou uma célula T pura. Em certas modalidades, o fenótipo é a expressão positiva ou negativa de uma ou mais moléculas específicas que são marcadoras para memória. Em algumas modalidades, o marcador de memória é uma molécula específica que pode ser usada para definir uma população de células T de memória.

[00239] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui um fenóti-

po de ou um ou mais marcadores associados a uma célula T sem memória ou subtipo da mesma; em alguns aspectos, é ou inclui um fenótipo ou marcador (es) associado (s) a uma célula pura. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD27^+$/CD28+/CD45RA+. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CCR7^+$/CD45RA+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui um fenótipo de uma célula T de memória central. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui $CCR7^+/CD27^+$/CD28+/CD45RA−. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui CCR7−/$CD27^+$/CD28+/CD45RA−. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula T_{EMRA} ou uma célula T_{SCM}. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui CD45RA+. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui CCR7−/CD27−/CD28−/CD45RA+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui um de $CD27^+$/CD28+, CD27−/CD28+, $CD27^+$/CD28− ou CD27−/CD28−. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CCR7^+/CD27^+$/CD45RA+. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CCR7^+$/CD45RA+. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui $CCR7^+/CD27^+$/CD45RA−. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui CCR7−/$CD27^+$/CD45RA−. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui CD45RA+. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui CCR7−/CD27−/CD45RA+.

[00240] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui qualquer uma das propriedades fenotípicas anteriores e inclui adicionalmente a expressão de um receptor recombinante, como o fenótipo associado a uma célula T de memória ou subtipo de memória e que expressa um CAR ou um fenótipo associado a uma célula pura que expressa um CAR. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula T de memória central ou célula T de memória central estaminal que expressa um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula de memória efetora que expressa um CAR. Em

algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula T_{EMRA} que expressa um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28+/CD45RA-$; $CAR^+/$ $CCR7-/CD27^+/$ $CD28+/CD45RA-$; $CAR^+/CCR7-/CD27-/CD28-/$ $CD45RA+$; $CAR^+/$ $CD27^+/CD28+$; $CAR^+/CD27-/CD28+$; $CAR^+/CD27^+/CD28-$; ou $CAR^+/$ $CD27-/CD28-$. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui $CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD45RA-$; $CAR^+/CCR7-/CD27^+/CD45RA-$; $CAR^+/$ $CCR7-/CD27-/CD28-/CD45RA+$; $CAR^+/CD27^+$; $CAR^+/CD27-$; $CAR^+/$ $CD27^+/CD28-$; ou $CAR^+/CD27-/CD28-$.

[00241] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui um fenótipo de uma célula T que é negativa para um marcador de apoptose. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma célula pura que é negativa para um marcador de apoptose. Em algumas modalidades, o marcador de apoptose é a caspase ativada 3. Em algumas modalidades, o marcador de apoptose é uma coloração positiva pela Anexina V.

[00242] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula T de memória ou seu subtipo negativo para um marcador de apoptose que expressa um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula T de memória ou subtipo particular que é negativo para um marcador de apoptose que expressa um CAR. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma célula pura que é negativa para um marcador de apoptose que expressa um CAR. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula T de memória central ou célula T_{SCM} ou célula pura que é negativa para um marcador de apoptose que expressa um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui aquele de uma célula de memória efetiva que é negativa para um marcador de apoptose que expressa um CAR. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui anexina $V^-/CAR^+/CCR7^+/CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; anexina $V^-/CAR^+/$ $CCR7^-/$ $CD27^+/CD28^+/CD45RA^-$; anexina $V^-/CAR^+/CCR7^-/CD27^-/CD28^-/$ CD45

RA$^+$; anexina V$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28$^+$; anexina V$^-$/CAR$^+$/CD27$^-$/CD28$^+$; anexina V$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28$^-$; ou anexina V$^-$/CAR$^+$/CD27$^-$/CD28$^-$. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui caspase 3$^-$/CAR$^+$/ CCR7$^+$/CD27$^+$/CD28$^+$/CD45RA$^-$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CCR7$^-$/ CD27$^+$/CD28$^+$/CD45RA$^-$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CCR7$^-$/CD27$^-$/ CD28$^-$/CD45RA$^+$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28$^+$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CD27$^-$/CD28$^+$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$/ CD28$^-$; ou caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CD27$^-$/CD28$^-$. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui anexina V$^-$/CAR$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$/ CD45 RA$^-$; anexina V$^-$/CAR$^+$/CCR7$^-$/CD27$^+$/CD45RA$^-$; anexina V$^-$/CAR$^+$/ CCR7$^-$/CD27$^-$/CD45RA$^+$; anexina V$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28$^+$; anexina V$^-$/ CAR$^+$/CD27$^-$/CD28$^+$; anexina V$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$; ou anexina V$^-$/CAR$^+$/ CD27$^-$. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$/CD45RA$^-$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CCR7$^-$/ CD27$^+$/CD45RA$^-$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CCR7$^-$/CD27$^-$/CD45RA$^+$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28$^+$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/ CD27$^-$/ CD28$^+$; caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CD27$^+$; ou caspase ativada 3$^-$/CAR$^+$/CD27$^-$.

[00243] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui CD27$^+$/CD28+, CD27−/CD28+, CD27$^+$/CD28−, CD27−/CD28− ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui CAR$^+$/CD27$^+$/CD28+, CAR$^+$/CD27−/CD28+, CAR$^+$/CD27$^+$/CD28−, CAR$^+$/CD27−/CD28− ou uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui caspase ativada 3−/CAR$^+$/CD27$^+$/ CD28+, caspase ativada 3−/CAR$^+$/CD27−/CD28+, caspase ativada 3−/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28−, caspase ativada 3−/CAR$^+$/CD27−/CD28−, ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a anexina V−/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28+, anexina V−/CAR$^+$/ CD27−/CD28+, anexina V−/CAR$^+$/CD27$^+$/CD28−, anexina V−/CAR$^+$/ CD27−/CD28−, ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades

particulares, o fenótipo é ou inclui $CD27^+$, CD27−, $CD27^+$, CD27− ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CAR^+/CD27^+$, CAR^+/CD27−, $CAR^+/CD27^+$, CAR^+/CD27− ou uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui caspase ativada 3−/$CAR^+/CD27^+$, caspase ativada 3−/CAR^+/CD27−, caspase ativada 3−/$CAR^+/CD27^+$, caspase ativada 3−/CAR^+/CD27− ou uma combinação disso. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a anexina V−/$CAR^+/CD27^+$, anexina V−/CAR^+/CD27−, anexina V−/$CAR^+/CD27^+$, anexina V−/CAR^+/CD27− ou uma combinação dos mesmos.

[00244] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui $CCR7^+$/CD28+, CCR7−/CD28+, $CCR7^+$/CD28−, CCR7−/CD28− ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CAR^+/CCR7^+$/CD28+, CAR^+/CCR7−/CD28+, $CAR^+/CCR7^+$/CD28−, CAR^+/CCR7−/CD28− ou uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui caspase ativada 3−/$CAR^+/CCR7^+$/CD28+, caspase ativada 3−/CAR^+/CCR7−/CD28+, caspase ativada 3−/$CAR^+/CCR7^+$/CD28−, caspase ativada 3−/CAR^+/CCR7−/CD28−, ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui anexina V−/$CAR^+/CCR7^+$/CD28+, anexina V−/CAR^+/CCR7−/CD28+, anexina V−/$CAR^+/CCR7^+$/CD28−, anexina V−/CAR^+/CCR7−/CD28−, ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui $CCR7^+$, CCR7−, $CCR7^+$, CCR7− ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CAR^+/CCR7^+$, CAR^+/CCR7−, $CAR^+/CCR7^+$, CAR^+/CCR7− ou uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui caspase ativada 3−/$CAR^+/CCR7^+$, caspase ativada 3−/CAR^+/CCR7−, caspase ativada 3−/$CAR^+/CCR7^+$, caspase ativada 3−/CAR^+/CCR7− ou uma combinação disso. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui anexina V−/$CAR^+/CCR7^+$, anexina

V−/CAR$^+$/CCR7−, anexina V−/CAR$^+$/CCR7$^+$, anexina V−/CAR$^+$/CCR7− ou uma combinação dos mesmos.

[00245] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de exaustão. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de uma molécula específica que está associada à exaustão. Em certas modalidades, a molécula específica é qualquer molécula que está associada à exaustão ou a uma qualidade associada à exaustão, por exemplo, função efetora fraca ou expressão inibitória de receptor. Em modalidades particulares, o fenótipo é expressão positiva ou negativa de um inibidor de ponto de verificação imune. Em modalidades particulares, o marcador de exaustão é CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA ou CD96, ou uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, o fenótipo é a expressão positiva ou negativa de CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA ou CD96 ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, o fenótipo é expressão positiva ou negativa de PD1 e/ou FOXP3.

[00246] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de exaustão em uma célula CD3$^+$ que expressa um receptor recombinante ou um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de exaustão em uma célula CD4$^+$ que expressa um receptor recombinante ou um CAR. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de exaustão e CD3$^+$ e expressão positiva de um receptor recombinante ou de um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de exaustão em uma célula CD4$^+$ que expressa um receptor recombinante ou um CAR. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de exaustão em uma célula CD8$^+$ que expressa um

receptor recombinante ou um CAR. Em modalidades particulares, o marcador de exaustão é um ou mais dentre CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA ou CD96. Em modalidades particulares, o marcador de exaustão é PD1 e/ou FOXP3.

[00247] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui PD1−/CD3$^+$, PD1−/CD4$^+$, PD1−/CD8$^+$, PD1−/CD3$^+$/CAR$^+$, PD1−/CD4$^+$/CAR$^+$, PD1−/CD8$^+$/CAR$^+$, PD1−/anexina V−, PD1−/anexina V−/CD3$^+$, PD1−/anexina V−/CD4$^+$, PD1−/anexina V−/CD8$^+$, PD1−/anexina V/−CD3$^+$/CAR$^+$, PD1-/anexina V−/CD4$^+$/CAR$^+$, PD1−/anexina V−/CD8$^+$/CAR$^+$, PD1−/caspase ativada 3−, PD1−/caspase ativada 3−/CD3$^+$, PD1−/caspase ativada 3−/CD4$^+$, PD1-/caspase ativada 3−/CD8$^+$, PD1−/caspase ativada 3−/CD3$^+$/CAR$^+$, PD1−/caspase ativada 3−/CD4$^+$/CAR$^+$, PD1−/caspase ativada 3−/CD8$^+$/CAR$^+$, ou uma combinação das mesmas.

[00248] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui FOXP3−/CD3$^+$, FOXP3− CD4$^+$, FOXP3−/CD8$^+$, FOXP3−/CD3$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/CD4$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/CD8$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/anexina V−, FOXP3−/anexina V−/CD3$^+$, FOXP3−/anexina V−/CD4$^+$, FOXP3−/anexina V−/CD8$^+$, FOXP3−/anexina V/−CD3$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/anexina V−/CD4$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/anexina V−/CD8$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/caspase ativada 3−, FOXP3−/caspase ativada 3−/CD3$^+$, FOXP3−/caspase ativada 3−/CD4$^+$, FOXP3−/caspase ativada 3−/CD8$^+$, FOXP3−/caspase ativada 3−/CD3$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/caspase ativada 3−/CD4$^+$/CAR$^+$, FOXP3−/caspase ativada 3−/CD8$^+$/CAR$^+$, ou uma combinação dos mesmos.

[00249] Em certas modalidades, o fenótipo é a expressão negativa de uma molécula específica que está associada à ativação de células T. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a expressão negativa de uma ou mais de uma molécula específica que é um marcador de ativação. Em geral, a ativação de células T requer dois sinais simultâneos. O primeiro é a ligação do complexo receptor de células T

(TCR) a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que transporta um antígeno peptídico. O segundo é fornecido pela ligação do receptor estimulatório CD28 a proteínas na superfície da APC, tal como B7-2 ou B7-1. Em certas modalidades, a molécula específica está associada à ativação de TCR, por exemplo, é ativada, alterada ou expressa como resultado da ativação das células T. Em algumas modalidades, a molécula específica está associada à ativação de um receptor CD28, por exemplo, uma molécula que é ativada, alterada ou expressa como resultado da ativação de células T.

[00250] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a expressão negativa de uma ou mais de uma molécula específica que é um marcador de ativação. Em certas modalidades, o marcador de ativação é um ou mais de CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3, Ki67 ou uma combinação dos mesmos. Em certas modalidades, o fenótipo é a expressão negativa ou positiva de um ou mais de CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 ou Ki67. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a expressão de CD25, CD127, LAG3, Ki67 ou uma combinação dos mesmos.

[00251] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de ativação em uma célula $CD3^+$ que expressa um receptor recombinante ou um CAR. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa do marcador de ativação em uma célula $CD4^+$ que expressa um receptor recombinante ou um CAR. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa do marcador de ativação em uma célula $CD8^+$ que expressa um receptor recombinante ou um CAR. Em modalidades particulares, o marcador de ativação é um ou mais de CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3 ou Ki67. Em modalidades particulares, o marcador de ativação é

CD25, CD127, LAG3, Ki67 ou uma combinação dos mesmos.

[00252] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui expressão positiva ou negativa de um marcador de ativação e $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+/CAR^+$, $CD4^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, anexina V−, anexina V−/$CD3^+$, anexina V−/$CD4^+$, anexina V−/$CD8^+$, anexina V/−$CD3^+/CAR^+$, anexina V−/$CD4^+/CAR^+$, anexina V−/$CD8^+/CAR^+$, caspase ativada 3−, caspase ativada 3−/$CD3^+$, caspase ativada 3 -/$CD4^+$, caspase ativada 3−/$CD8^+$, caspase ativada 3−/$CD3^+/CAR^+$, caspase ativada 3−/$CD4^+$/CAR^+, caspase ativada 3−/$CD8^+/CAR^+$ ou uma combinação das mesmas.

[00253] Em algumas modalidades, o fenótipo é avaliado por uma resposta a um estímulo, por exemplo, um estímulo que desencadeia, induz, estimula ou prolonga uma função celular imune. Em certas modalidades, as células são incubadas na presença de condições estimulantes ou de um agente estimulatório, o fenótipo é ou inclui a resposta à estimulação. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a produção ou secreção de um fator solúvel em resposta a uma ou mais estimulações. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma falta ou produção ou secreção de um fator solúvel em resposta a um ou mais estimulações. Em certas modalidades, o fator solúvel é uma citocina. Em algumas modalidades, a citocina é IL-2. Em algumas modalidades, a citocina é TNFa.

[00254] As condições podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, teor de oxigênio, teor de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons e/ou fatores estimulantes, como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes ou qualquer outro agente projetado para ativar as células. Em algumas modalidades, as células são estimuladas e o fenótipo é determinado em se um fator solúvel, por exemplo, uma citocina ou uma quimiocina

é produzido ou secretado. Em algumas modalidades, a estimulação é inespecífica, isto é, não é uma estimulação específica de antígeno. Em algumas modalidades, a estimulação compreende PMA e ionomicina. Em algumas modalidades, as células são incubadas na presença de condições estimulantes ou um agente estimulatório por cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 18 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas ou durante um período de tempo entre 1 hora e 4 horas, entre 1 hora e 12 horas, entre 12 horas e 24 horas ou por mais de 24 horas.

[00255] Em algumas modalidades, as células são estimuladas com um agente que é um antígeno ou um epítopo do mesmo que é específico para o receptor recombinante, ou é um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga a e/ou reconhece o receptor recombinante ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um CAR, e o agente é um antígeno ou um epítopo do mesmo que é específico para o CAR, ou é um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga a e/ou reconhece o CAR, ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, as células são estimuladas incubando as células na presença de células-alvo com expressão de superfície do antígeno que é reconhecido pelo CAR. Em certas modalidades, o receptor recombinante é um CAR e o agente é um anticorpo ou um fragmento ativo, variante ou porção do mesmo que se liga ao CAR. Em certas modalidades, o anticorpo ou o fragmento ativo, variante ou porção do mesmo que se liga ao CAR é um anticorpo anti-idiotípico (anti-ID).

[00256] Em algumas modalidades, as condições ou agentes estimulantes incluem um ou mais agentes, por exemplo, ligante, que é capaz de estimular ou ativar um domínio de sinalização intracelular de um

complexo TCR. Em alguns aspectos, o agente liga ou inicia a cascata de sinalização intracelular do TCR/CD3 em uma célula T. Tais agentes podem incluir anticorpos, como aqueles específicos para um componente de TCR e/ou receptor coestimulatório, por exemplo, anti-CD3, anti-CD28, por exemplo, ligados a um suporte sólido, tal como uma conta, e/ou uma ou mais citocinas. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes são PMA e ionomicina.

[00257] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a produção ou secreção de uma citocina em resposta a um ou mais estímulos. A produção e/ou secreção de citocinas contribui para as respostas imunes e está envolvida em diferentes processos, incluindo a indução de proteínas antivirais e a indução da proliferação de células T. As citocinas não são fatores pré-formados, mas são rapidamente produzidas e secretadas em resposta à ativação celular. A produção ou secreção de citocinas pode ser medida, detectada e/ou quantificada por qualquer técnica adequada conhecida na técnica.

[00258] Em certas modalidades, o fenótipo é a produção de uma ou mais citocinas. Em algumas modalidades, a produção de duas ou mais citocinas da mesma célula pode ser indicativa de características polifuncionais de tais células. Em modalidades particulares, a produção de uma ou mais citocinas é medida, detectada e/ou quantificada por coloração intracelular de citocinas. A coloração intracelular de citocinas (ICS) por citometria de fluxo é uma técnica adequada para o estudo da produção de citocinas no nível de célula única. Ela detecta a produção e o acúmulo de citocinas dentro do retículo endoplasmático após estimulação celular, permitindo a identificação de populações celulares positivas ou negativas para a produção de uma citocina particular ou para a separação de células de alta e baixa produção com base em um limite. Em algumas modalidades, como descrito acima, a estimulação pode ser realizada usando estimulação não específica, por exem-

plo, não é uma estimulação específica de antígeno. Por exemplo, PMA/ionomicina pode ser usada para estimulação celular inespecífica. Em algumas modalidades, a estimulação pode ser realizada por um agente que é um antígeno ou um epítopo do mesmo que é específico para o receptor recombinante (por exemplo, CAR), ou é um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga a e/ou reconhece o receptor recombinante ou uma combinação dos mesmos. A ICS também pode ser usada em combinação com outros protocolos de citometria de fluxo para imunofenotipagem usando marcadores de superfície celular ou com multímetros MHC para acessar a produção de citocinas em um subgrupo específico de células, tornando-a um método extremamente flexível e versátil. Outras técnicas de célula única para medir ou detectar a produção de citocinas incluem, mas não estão limitadas a ELISPOT, diluição limitante e clonagem de células T.

[00259] Em algumas modalidades, o fenótipo é a produção de uma citocina, como após a estimulação do receptor recombinante com um antígeno específico e/ou reconhecido pelo receptor recombinante. Em modalidades particulares, o fenótipo é a falta de produção da citocina, tal como após a estimulação do receptor recombinante com um antígeno específico para e/ou reconhecido pelo receptor recombinante. Em modalidades particulares, o fenótipo é positivo para ou é um alto nível de produção de uma citocina. Em certas modalidades, o fenótipo é negativo para ou é um baixo nível de produção de uma citocina. As citocinas podem incluir, entre outras, interleucina-1 (IL-1), IL-1β, IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL 27, IL-33, IL-35, TNF, fator alfa de necrose tumoral (TNF-α), CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, interferon gama (IFN-γ), fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1α, MIP-1β, Flt-3L, fracktalkine e/ou IL-5. Em algumas modalidades, o fenótipo inclui produção de ci-

tocinas, por exemplo, citocinas associadas a tipos celulares específicos, como citocinas associadas aos subtipos Th1, Th2, Th17 e/ou Treg. Em algumas modalidades, citocinas relacionadas com Th1 exemplares incluem IL-2, IFN-γ e fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e, em alguns casos, estão envolvidas em respostas imunes celulares. Em algumas modalidades, citocinas relacionadas a Th2 exemplares incluem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e, em alguns casos, estão associadas à imunidade humoral e propriedades anti-inflamatórias. Em algumas modalidades, citocinas relacionadas a Th17 exemplares incluem IL-17A e IL-17F e, em alguns casos, estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, por exemplo, durante uma reação inflamatória.

[00260] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de uma citocina. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de mais de uma citocina (por exemplo, polifuncional). Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de uma produção de uma ou mais citocinas. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção, ou a falta dele, de um ou mais de IL-2, IL-5, IL-13, IFN-gama ou TNF-alfa. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção, ou a falta dele, de um ou mais de IL-2, IL-13, IFN-gama ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, o fenótipo é a presença de uma produção e/ou a presença de um alto nível de produção da citocina. Em algumas modalidades, o fenótipo é uma produção baixa, reduzida ou ausente de uma citocina.

[00261] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção interna (intracelular) de uma citocina, por exemplo, avaliada na presença de um agente estimulatório ou sob condições estimulantes quando a secreção é impedida ou inibida. Em algumas modalidades, o agente estimulatório é um agente estimulatório não específico, por exemplo, um agente estimulatório que não se liga a um domínio de

ligação a antígeno, por exemplo, em um receptor recombinante (por exemplo, CAR). Em algumas modalidades, o agente estimulatório é PMA/ionomicina, que pode atuar como um agente estimulatório não específico. Em algumas modalidades, o agente estimulatório é um agente estimulatório específico, por exemplo, é um agente estimulatório que é um antígeno ou um epítopo do mesmo que é específico para o receptor recombinante (por exemplo, CAR), ou é um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga a e/ou reconhece o receptor recombinante, ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a falta ou ausência de uma produção interna de uma citocina. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a quantidade interna de uma ou mais citocinas quando a produção de mais de uma citocina, conforme avaliada com um ensaio de ICS. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a quantidade interna de um ou mais de IL-2, IL-5, IL-13, IFN-gama ou TNF-alfa, conforme avaliado com um ensaio de ICS. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma quantidade interna baixa ou a falta de uma quantidade detectável de uma ou mais citocinas, conforme avaliado com um ensaio de ICS. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma quantidade interna baixa ou a falta de uma quantidade detectável de IL-2, IL-5, IL-13, IFN-gama ou TNF-alfa, conforme avaliado com um ensaio ICS. Em algumas modalidades, o fenótipo inclui avaliação de múltiplas citocinas, por exemplo, por ensaios multiplexados ou ensaios para avaliar a polifuncionalidade (vide, por exemplo, Xue et al., (2017) Journal for ImmunoTherapy of Cancer 5:85). Em algumas modalidades, a falta de expressão de citocinas é inversamente correlacionada com ou associada à atividade e/ou função das células e/ou durabilidade da resposta e sobrevida livre de progressão. Em algumas modalidades, as células com produção reduzida, mínima ou inexistente de citocinas, avaliado de acordo com qualquer método ou método conhecido aqui descrito,

são reduzidas na composição de célula (por exemplo, composição de saída, composição de célula terapêutica).

[00262] Modalidades particulares contemplam que o fenótipo pode incluir a produção de uma citocina ou uma falta ou uma quantidade baixa de produção para uma citocina. Isso pode depender de vários fatores que incluem, entre outros, a identidade da citocina, o ensaio realizado para detectar a citocina e o agente ou condição estimulante usado com o ensaio. Por exemplo, em algumas modalidades, é contemplado que o fenótipo é ou inclui uma falta ou um baixo nível de produção de IL-13, conforme indicado pelo ICS, enquanto em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IFN-gama, conforme indicado por ICS.

[00263] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de uma ou mais citocinas e $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+/CAR^+$, $CD4^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, anexina V−, anexina V− $CD3^+$, anexina V− $CD4^+$, anexina V-$CD8^+$, anexina V-$CD3^+/CAR^+$, anexina V-$CD4^+/CAR^+$, anexina V-$CD8^+/CAR^+$, caspase ativada 3−, caspase ativada 3−/$CD3^+$, caspase ativada 3−/$CD4^+$, caspase ativada 3 -/$CD8^+$, caspase ativada 3−/$CD3^+/CAR^+$, caspase ativada 3−/$CD4^+/CAR^+$ ou caspase ativada 3−/$CD8^+/CAR^+$ ou uma combinação dos mesmos. Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a produção de uma ou mais citocinas em $CD4^+/CAR^+$ e/ou $CD8^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, as uma ou mais citocinas são IL-2, IFN-gama e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 em células $CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de TNF-alfa em células $CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 e TNF-alfa em células $CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 e IFN-gama em células $CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de TNF-alfa em células

$CD8^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IFN-gama e TNF-alfa em células $CD8^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 em células caspase ativada $3^-/CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de TNF-alfa em células caspase ativada $3^-/CD4^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 e TNF-alfa em células caspase ativada $3^-/CD4^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 e IFN-gama em células caspase ativada $3^-/CD4^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de TNF-alfa em células caspase ativada $3^-/CD8^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IFN-gama e TNF-alfa em células caspase ativada $3^-/CD8^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de TNF-alfa nas células anexina $V^-/CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 e TNF-alfa nas células anexina $V^-/CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 e IFN-gama nas células anexina $V^-/CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de TNF-alfa nas células $V^-/CD8^+/CAR^+$ da anexina. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IFN-gama e TNF-alfa nas células $V^-/CD8^+/CAR^+$ da anexina. Em algumas modalidades, os fenótipos descritos neste parágrafo estão correlacionados positivamente com resposta durável e sobrevida livre de progressão. Assim, em algumas modalidades, as células incluindo esses fenótipos são maximizadas ou aumentadas na composição de célula (por exemplo, composição de saída, composição de célula terapêutica). Em algumas modalidades, a composição de célula inclui pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$, como células T CD4 manipuladas ge-

neticamente que expressam um receptor recombinante (por exemplo, CAR), na composição que são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, a composição de célula inclui pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% ou mais do número total de células T $CD4^+$, como células T CD4 manipuladas geneticamente que expressam um receptor recombinante (por exemplo, CAR), na composição polifuncional para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

[00264] Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma falta de produção de uma ou mais citocinas. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de produção de uma ou mais citocinas e $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+/CAR^+$, $CD4^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, anexina V−, anexina V− $CD3^+$, anexina V −$CD4^+$, anexina V-$CD8^+$, anexina V-$CD3^+/CAR^+$, anexina V-$CD4^+/CAR^+$, anexina V− $CD8^+/CAR^+$, caspase ativada 3−, caspase ativada 3−/$CD3^+$, caspase ativada 3−/$CD4^+$, caspase ativada 3−/$CD8^+$, caspase ativada 3−/$CD3^+/CAR^+$, caspase ativada 3−/$CD4^+/CAR^+$ ou caspase ativada 3−/$CD8^+/CAR^+$, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, as uma ou mais citocinas são IL-2, IFN-gama e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de produção de IL-2 em células caspase ativada 3−/$CD4^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de produção de TNF-alfa em células caspase ativada 3−/$CD4^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de produção de IL-2 e TNF-alfa em células caspase ativada 3−/$CD4^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de produção de IL-2 e IFN-gama em células caspase ativada 3−/$CD4^+$/CAR+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de produção de TNF-alfa em células caspase ativada 3−/$CD8^+$/CAR+. Em

algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta de produção de INF-gama e TNF-alfa em células caspase ativada 3−/$CD8^+$/CAR+. Em algumas modalidades, os fenótipos descritos neste parágrafo estão correlacionados negativamente com resposta durável e sobrevida livre de progressão. Assim, em algumas modalidades, as células incluindo esses fenótipos são minimizadas ou reduzidas na composição de célula (por exemplo, composição de saída, composição de célula terapêutica). Por exemplo, em algumas modalidades, as células incluindo o fenótipo deste parágrafo compõem menos de 2%, 5%, 10%, 15,%, 20,% ou 25% do total de células na composição de célula (por exemplo, composição de saída, composição de célula terapêutica).

[00265] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui a presença ou ausência de uma quantidade interna de uma ou mais de IL-2, IL-13, IFN-gama ou TNF-alfa, avaliadas com um ensaio ICS e um ou marcadores mais específicos para um subconjunto de células ou células de um tipo de célula específico. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção, ou a falta dela, de um ou mais de IL-2, IL-13, IFN-gama ou TNF-alfa e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-2 e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma falta ou baixa produção de IL-2 e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-13 e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IL-13 e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a falta ou baixa produção de IL-13 e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de IFN-gama e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui a produção de TNF-alfa e $CD4^+$/CAR^+ e/ou $CD8^+$/CAR^+. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui uma falta ou baixa produção de TNF-alfa e $CD4^+$/CAR^+ e/ou

$CD8^+/CAR^+$.

[00266] Qualquer um ou mais dos fenótipos, isoladamente ou em combinação, podem ser avaliados ou determinados de acordo com os métodos fornecidos. Em algumas modalidades, o fenótipo é $CD3^+$, $CD3^+/CAR^+$, $CD4^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ ou uma combinação dos mesmos.

[00267] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CD3^+$. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CD3^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CD8^+/CAR^+$. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CD4^+/CAR^+$.

[00268] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui Anexina−/$CD3^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é ou inclui Anexina−/$CD4^+/CAR^+$. Em modalidades particulares, o fenótipo é Anexina−/$CD8^+$/CAR.

[00269] Em modalidades particulares, o fenótipo é ou inclui uma falta ou uma quantidade baixa de IL-2 intracelular e $CD4^+/CAR^+$. Em modalidades particulares, o fenótipo é uma falta ou uma quantidade baixa de IL-13 intracelular e $CD4^+/CAR^+$. Em algumas modalidades, o fenótipo é uma falta ou uma quantidade baixa de expressão intracelular de células IL-13 e $CD8^+/CAR^+$. Em modalidades particulares, o fenótipo é uma falta ou uma quantidade baixa de TNF-alfa $CD4^+/CAR^+$ intracelular.

[00270] Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui $CD8^+/CAR^+$. Em certas modalidades, o fenótipo é ou inclui anexina-/$CD8^+/CAR^+$.

[00271] Em algumas modalidades, o fenótipo compreende um indicador de produção de uma ou uma combinação de citocinas, opcionalmente não específicas para o antígeno ou para o receptor recombinante e/ou produzido de forma policlonal, em que as uma ou mais citocinas são IL-2, IL-13, IL-17, IFN-gama ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, o indicador de produção é medido em um ensaio, opcio-

nalmente um ensaio de coloração de citocina intracelular, compreendendo incubar uma amostra da composição de célula T com um agente policlonal, um agente específico de antígeno ou um agente que se liga ao receptor recombinante, opcionalmente CARR. Em algumas modalidades, o agente é ou compreende PMA e ionomicina ou é ou compreende um agonista do receptor de células T ou do receptor de células T. Em algumas modalidades, o fenótipo compreende expressão negativa de um marcador de ativação, em que o marcador de ativação é selecionado a partir de CD25, CD127, LAG3, Ki67 e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o fenótipo compreende expressão negativa de um marcador de exaustão, em que o marcador de exaustão é um produto do gene PD1 ou FOXP3 ou uma combinação dos mesmos. Em alguma modalidade, no entanto, o fenótipo compreende um fenótipo puro ou um fenótipo de memória, opcionalmente em que o fenótipo de memória compreende um fenótipo de memória efetora T, um fenótipo de memória central T ou um fenótipo de memória efetora T que expressa CD45RA (Temra).

[00272] Em algumas modalidades, a atividade dependente de receptor recombinante (por exemplo, CAR) é uma medida da produção ou acumulação de uma citocina pró-inflamatória, opcionalmente, um ou uma combinação de TNF-alfa, IFN-gama e IL-2. Em algumas modalidades, uma medida de referência é a média da medida entre uma pluralidade, opcionalmente pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, de composições terapêuticas de células T de referência que compreendem o receptor recombinante (por exemplo, CAR) no qual: (i) cada uma das composições terapêuticas de células T de referência foi observada ou determinada como resultado de um perfil de segurança aceitável após a administração a um objeto, opcionalmente em que o objeto tem uma doença ou condição que expressa ou está associada ao antígeno; e/ou (ii) cada uma das composições terapêuticas

de células T de referência foi observada ou determinada como resultado de uma eficácia desejada após a administração a um objeto, opcionalmente em que o objeto tem uma doença ou condição que expressa ou está associada ao antígeno.

[00273] Em certas modalidades, um número, múltiplo ou fração de células de um fenótipo particular de uma composição de célula é determinado, medido, obtido, detectado, observado e/ou identificado. Em algumas modalidades, a composição de célula é uma composição de célula T. Em certas modalidades, a composição de célula contém células que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um CAR. Em modalidades particulares, a composição de célula é uma composição T terapêutica contendo células que expressam um receptor recombinante que pode ser administrado a um objeto para tratar uma doença ou condição. Em certas modalidades, o número de células do fenótipo é a quantidade total de células do fenótipo da composição de célula. Em certas modalidades, o número de células do fenótipo é o número total de células do fenótipo presente em uma dose da composição de célula. Em modalidades particulares, o número de células do fenótipo é o número de células do fenótipo presente em uma amostra da composição de célula. Em algumas modalidades, o número de células do fenótipo pode ser expresso como uma frequência, razão e/ou uma porcentagem de células do fenótipo presente na composição de célula, ou uma dose ou uma amostra da mesma.

[00274] Em modalidades particulares, o número, múltiplo ou fração das células de um fenótipo é transformado, por exemplo, para comprimir a faixa de valores relevantes do número, múltiplo ou fração. Em algumas modalidades, a transformação é qualquer aplicação de uma função matemática determinística para cada ponto em um conjunto de dados, como, cada ponto de dados x é substituído pelo valor transformado y = f(x), em que f é uma função. Em geral, as transformações

podem ser aplicadas para que os dados pareçam atender mais de perto às suposições de um procedimento de inferência estatística a ser aplicado ou para melhorar a interpretabilidade ou a aparência dos gráficos. Na maioria dos casos, a função usada para transformar os dados é invertível e geralmente é contínua. A transformação é geralmente aplicada a uma coleção de medidas comparáveis. Exemplos de transformações adequadas incluem, mas não estão limitados a, logaritmo e transformação de raiz quadrada, transformações recíprocas e transformações de potência. Em certas modalidades, o número, múltiplo ou fração das células de um fenótipo é transformado por uma transformação logarítmica. Em certas modalidades, a transformação logarítmica é um log comum ($\log_{10}(x)$), um log natural ($\ln(x)$) ou um log binário ($\log_2(x)$).

B. Determinação de Dosagem e Administração

[00275] A composição terapêutica ou uma dose da mesma, em algumas modalidades, contém as células em quantidades efetivas para tratar ou prevenir a doença ou condição, como uma quantidade terapeuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz. Em algumas modalidades, a composição inclui as células em uma quantidade eficaz para reduzir a carga da doença ou condição. Em algumas modalidades, a composição inclui células em uma quantidade que fornece resultados mais consistentes, por exemplo, resultados de resposta e/ou segurança, entre um grupo de objetos administrados com a composição e/ou parâmetros farmacocinéticos mais consistentes. Em algumas modalidades, a composição inclui as células em uma quantidade eficaz para promover uma resposta durável e/ou sobrevivência livre de progressão. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos envolvem avaliar uma composição terapêutica contendo células T para fenótipos celulares e determinar doses com base em tais resultados.

[00276] Em algumas modalidades, a dose é determinada para

abranger um número, proporção, razão e/ou porcentagem relativamente consistente de células manipuladas geneticamente com um fenótipo particular em uma ou mais composições particulares. Em alguns aspectos, a consistência está associada ou relacionada com, função, parâmetros farmacocinéticos, resultado de toxicidade e/ou resultado de resposta relativamente consistentes. Em alguns aspectos, em uma pluralidade de objetos, composições e/ou doses, os números, proporção, razão e/ou porcentagem são relativamente consistentes, por exemplo, o número ou razão de células que têm um fenótipo específico, por exemplo, expressam CCR7 ($CCR7^+$) ou que produzem uma citocina, por exemplo, produzem IL-2, TNF-alfa ou IFN-gama, na composição ou na dose unitária, varia não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%. Em alguns aspectos, o número ou a razão de células que têm um fenótipo específico, por exemplo, expressam CCR7 ($CCR7^+$), na composição ou dose unitária, varia em não mais do que 20% ou mais que 10% ou mais que 5% de uma média do referido número ou razão em uma pluralidade de composições de célula T produzidas pelo processo e/ou varia dessa média em não mais do que um desvio padrão ou varia em não mais do que 20% ou não mais do que 10% ou não mais do que 5% entre uma pluralidade de composições de célula T ou doses determinadas. Em algumas modalidades, a pluralidade de objetos inclui pelo menos 10 objetos, como pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90, pelo menos 100 ou mais objetos.

[00277] Em alguns aspectos, a dose, por exemplo, uma ou mais dose (s) unitária (s) é determinada com base no número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de um subconjunto particular de células T manipuladas geneticamente, por exemplo, células com

um fenótipo particular, como fenótipo de marcador de superfície particular. Em alguns aspectos, o fenótipo celular é determinado com base na expressão e/ou ausência de expressão de marcadores celulares específicos, por exemplo, marcadores de superfície. Em alguns aspectos, o marcador celular inclui marcadores indicativos de viabilidade e/ou estado apoptótico das células. Em alguns aspectos, marcadores exemplares incluem CD3, CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, Anexina V ou caspase ativada 3. Em alguns aspectos, um marcador exemplar é CCR7. Em alguns aspectos, um marcador exemplar é CD27. Em alguns aspectos, marcadores exemplares incluem CCR7 e/ou CD27. Em alguns aspectos, marcadores exemplares incluem CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

[00278] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos que envolvem a administração a um objeto de uma ou mais doses unitárias de uma composição terapêutica de células T, como qualquer uma descrita aqui e/ou qualquer dose unitária determinada pelos métodos aqui fornecidos.

[00279] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos que envolvem a administração a um objeto tendo uma doença ou condição de uma dose unitária de uma composição de célula T compreendendo células compreendendo um receptor recombinante, como um receptor de antígeno quimérico (CAR), que se liga especificamente a um antígeno associado à doença ou condição, em que um número definido de células que expressam receptores recombinantes totais (receptor$^+$) da composição terapêutica, são administradas células que expressam receptores recombinantes CD8$^+$ totais (receptor$^+$/CD8$^+$) e/ou uma dose unitária as células são administradas nas quais a dose unitária contém um número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção definido de células com um dado fenótipo, por exemplo, CCR7$^+$/CD4$^+$, CCR7$^+$/CD8$^+$, CD27$^+$/CD4$^+$, CD27$^+$/CD8$^+$, CD45RA+/CD4$^+$, CD45RA+/

$CD8^+$, $CCR7^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD8^+$, $CD27^-/CD4^+$, $CD27^-/CD8^+$, $CD45RA^-/CD4^+$, $CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD8^+$, $CCR7^+/$ $CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^-/CD45RA^-/$ $CD4^+$, $CCR7^-/CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^-/CD27^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD27^-/CD8^+$.

[00280] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células recombinantes células T $CD4^+$ que expressam receptores que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+$. Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD27 e/ou CD45RA nas células.

[00281] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de receptor recombinante expressando células T $CD8^+$ que expressam um cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de receptor recombinante expressando células T $CD4^+$ que expressam CD27 ($receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um nú-

mero definido de $CD8^+$/CD2 7+ células. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CCR7 e/ou CD45RA nas células.

[00282] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou um número definido de células recombinantes que expressam receptores células T $CD4^+$ que expressam CCR7 e CD27 (receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ para células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou uma razão definida de receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ a outro subconjunto de células na composição. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD45RA nas células.

[00283] Em algumas modalidades, o número de células na dose unitária é o número de células ou o número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de tais células de um fenótipo determinado, por exemplo, células que expressam ou não expressam um ou mais marcadores selecionados de CD3 CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, Anexina V ou caspase ativada 3, que se deseja administrar a um objeto particular em uma dose, como um objeto a partir do qual as células foram derivadas. Em algumas modalidades, o

número de células na dose unitária é o número de células ou o número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de tais células de um dado fenótipo, por exemplo, células $CCR7^+$, $CD27^+$, CD45RA+, $CD45RA^-$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+$, marcador de apoptose negativo (por exemplo, Anexina V– ou Caspase 3-) ou células positivas ou negativas para um ou mais dos itens anteriores.

[00284] Em algumas modalidades, o número de células na dose unitária é o número de células ou o número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão e/ou proporção de tais células de um dado fenótipo, por exemplo, $CCR7^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD8^+$, $CD27^+/CD4^+$, $CD27^+/CD8^+$, $CD45RA^+/CD4^+$, $CD45RA^+/CD8^+$, CCR7-/$CD4^+$, CCR7-/$CD8^+$, CD27-/$CD4^+$, CD27-/$CD8^+$, $CD45RA^–/CD4^+$, $CD45RA^–/CD8^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD8^+$, $CCR7^+/CD45RA^–/CD4^+$, $CCR7^+/CD45RA^–/CD8^+$, CCR7-/$CD45RA^–/CD4^+$, CCR7-/$CD45RA^–/CD8^+$, CCR7-/CD27-/$CD4^+$, CCR7-/CD27-/$CD8^+$; e células negativas para marcador de apoptose (por exemplo, Anexina V- ou Caspase 3-), que se deseja administrar a um objeto particular em uma dose, como um objeto do qual as células foram derivadas. Em algumas modalidades, a dose unitária contém um número definido de células ou número de células que expressam receptores ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão e/ou proporção de tais células de um dado fenótipo, por exemplo, $CCR7^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD8^+$, $CD27^+/CD4^+$, $CD27^+/CD8^+$, CD45RA+/$CD4^+$, CD45RA+/$CD8^+$, CCR7-/$CD4^+$, CCR7-/$CD8^+$, CD27-/$CD4^+$, CD27-/$CD8^+$, $CD45RA^-/CD4^+$, $CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD8^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD8^+$, CCR7-/$CD45RA^-/CD4^+$, CCR7-/$CD45RA^-/CD8^+$, CCR7-/CD27-/$CD4^+$, CCR7 -/CD27-/$CD8^+$; e células negativas para marcador de apoptose (por exemplo, Anexina V- ou Caspase 3-) e/ou qualquer sub-

conjunto das mesmas.

[00285] Em algumas modalidades, a dose unitária é determinada com base no número de células ou tipo (s) de célula e/ou frequência, razão e/ou porcentagem de células ou tipos de células, por exemplo, populações individuais, fenótipos ou subtipos, na composição de célula, tal como aqueles com os fenótipos de anexina V–/CCR7$^+$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CD27$^+$/CAR$^+$; anexina V–/CD27$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7-/CD27-/CAR$^+$, anexina V–/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CD27$^+$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CD27$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD27-/CAR$^+$; caspase ativada 3–/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD4$^+$; e/ou caspase ativada 3-/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD8$^+$; ou uma combinação dos mesmos.

[00286] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cer-

ca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6, ou não mais de cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais.

[00287] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^7, entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos ou pelo menos cerca de 5 x 10^7, 1 x 10^7, 5 x 10^6, 1 x 10^6, ou pelo menos cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ células.

[00288] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^7, entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos ou pelo menos cerca de 5 x 10^7, 1 x 10^7, 5 x 10^6, 1 x 10^6, ou pelo menos cerca de 5 x 10^5

células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[00289] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos em ou cerca de 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais e/ou pelo menos em ou cerca de 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00290] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos em ou cerca de 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos em ou cerca de 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende dose unitária compreendida entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7 ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00291] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^7, entre em ou cer-

ca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais/CD27$^+$ ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos ou pelo menos em ou cerca de 5 x 10^7, 1 x 10^7, 5 x 10^6, 1 x 10^6 ou pelo menos em ou cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[00292] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende pelo menos em ou cerca de 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos pelo menos cerca de 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00293] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00294] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximada-

mente 3:1.

[00295] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que em ou cerca de 1 x 10^8, não mais do que em ou cerca de 5 x 10^7, não mais do que em ou cerca de 1 x 10^7, não mais do que em ou cerca de 5 x 10^6, não mais do que em ou cerca de 1 x 10^6, ou não mais do que em ou cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais.

[00296] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00297] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^8, entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD3^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD3^+$) ou células $CD3^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que 5 x 10^8, nem mais que 1 x 10^8, não mais do que 5 x 10^7, não mais do que 5 x 10^7, não mais do que 1 x 10^7, não mais do que em ou cerca

de 5 x 10^6, não mais do que em ou cerca de 1 x 10^6, ou não mais do que em ou cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD3$^+$ totais ou células CD3$^+$ totais.

[00298] Em algumas modalidades, o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis. Em algumas modalidades, o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, total número de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ é o número total de células que não expressam um marcador apoptótico e/ou o número total de células negativas (-) para marcador apoptótico, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[00299] Em algumas modalidades, em qualquer composição que compreende células T que expressam um receptor recombinante aqui fornecido, pelo menos em ou cerca, ou em ou cerca de 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T em

a composição (ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante) são positivos para a superfície para CCR7 e/ou CD27.

[00300] Em algumas modalidades, em qualquer composição que compreende células T que expressam um receptor recombinante aqui fornecido, pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição (ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante), são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, a célula T capaz de produzir IL-2 e/ou TNF-alfa é uma célula T $CD4^+$.

[00301] Em algumas modalidades, em qualquer composição que compreende células T que expressam um receptor recombinante aqui fornecido, pelo menos em ou cerca, ou em ou cerca de 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e cerca de 90%, entre cerca de 20% e cerca de 80%, entre cerca de 30% e cerca de 70% ou entre cerca de 40% e em ou cerca de 60%, cada uma inclusive, das células $receptor^+$ totais na dose unitária são $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ ou $receptor^+/CD8^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, em qualquer composição que compreende células T que expressam um receptor recombinante aqui fornecido, pelo menos em cerca de 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e cerca de 90%, entre cerca de 20% e cerca de 80%, entre cerca de 30% e cerca de 70%, ou entre em ou cerca de 40% e em ou cerca de 60%, ou em ou cerca de 60%, das células $receptor^+$ totais na dose unitária são $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ ou $receptor^+/CD4^+/CD27^+$. Em algumas modalidades, pelo menos em cerca de 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células re-

ceptor$^+$ totais na dose unitária ou entre em ou cerca de 15% e cerca de 90%, entre cerca de 20% e cerca de 80%, entre cerca de 30% e cerca de 70%, ou entre cerca de 40% e cerca de 60%, cada inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00302] Em algumas modalidades, em qualquer composição que compreende células T que expressam um receptor recombinante aqui fornecido, pelo menos em cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$/CD8$^+$ totais na composição ou dose unitária são ou a dose unitária, ou entre cerca de 50% e cerca de 90%, entre cerca de 60% e cerca de 90%, entre cerca de 70% e cerca de 80%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$/CD8$^+$ totais na composição ou a dose unitária é receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$. Em algumas modalidades, em qualquer composição que compreende células T que expressam um receptor recombinante aqui fornecido, pelo menos em cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$/CD4$^+$ totais na composição ou dose unitária são ou a dose unitária, ou entre cerca de 50% e cerca de 90%, entre cerca de 60% e cerca de 90%, entre cerca de 70% e cerca de 80%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$/CD4$^+$ totais na composição ou na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/ CD4$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$. receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$. Em algumas modalidades, pelo menos em ou cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$/CD8$^+$ totais na composição são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$/CD4$^+$ totais na composição são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[00303] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que em ou cerca de 1 x 10^8, não mais do que em ou cerca de 5 x 10^7, não mais do que em ou cerca de 1 x 10^7, não mais do que em ou cerca de 5 x 10^6, não mais do que em ou cerca de 1 x 10^6, ou não mais do que em ou cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, célula $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais, ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais.

[00304] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00305] Em algumas modalidades, a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende não mais do que em ou cerca de 1 x 10^8,

não mais do que em ou cerca de 5 x 10^7, não mais do que em ou cerca de 1 x 10^7, não mais do que em ou cerca de 5 x 10^6, não mais do que em ou cerca de 1 x 10^6, ou não mais do que em ou cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[00306] Em algumas modalidades, a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00307] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos envolvem a administração de uma dose contendo um número definido de células. Em algumas modalidades, a dose, tal como o número definido de células, tal como um número definido de células CAR$^+$ que são CCR7$^+$/CD4$^+$, CCR7$^+$/CD8$^+$, CD27$^+$/CD4$^+$, CD27$^+$/CD8$^+$, CD45RA+/CD4$^+$, CD45RA+/CD8$^+$, CCR7 -/CD4$^+$, CCR7-/CD8$^+$, CD27-/CD4$^+$, CD27-/CD8$^+$, CD45RA$^-$/CD4$^+$, CD45RA$^-$/CD8$^+$, CCR7$^+$/CD27$^+$/CD4$^+$, CCR7$^+$/CD27$^+$/CD8$^+$, CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CD4$^+$, CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CD8$^+$, CCR7-/CD45RA$^-$/CD4$^+$, CCR7-/CD45RA$^-$/CD8$^+$, CCR7-/CD27-/CD4$^+$ ou CCR7-/CD27-/CD8$^+$, está entre ou entre cerca de 5,0 x 10^6 e 2,25 x 10^7, 5,0 x 10^6 e 2,0 x 10^7, 5,0 x 10^6 e 1,5 x 10^7, 5,0 x 10^6 e 1,0 x 10^7, 5,0 x 10^6 e 7,5 x 10^6, 7,5 x 10^6 e 2,25 x 10^7, 7,5 x 10^6 e 2,0 x 10^7, 7,5 x 10^6 e 1,5 x 10^7, 7,5 x 10^6 e 1,0 x 10^7, 1,0 x 10^7 e 2,25 x 10^7, 1,0 x 10^7 e 2,0 x 10^7, 1,0 x 10^7 e 1,5 x 10^7, 1,5 x 10^7 e 2,25 x 10^7, 1,5 x 10^7 e 2,0 x 10^7, 2,0 x 10^7 e 2,25 x 10^7. Em algumas modalidades, essa dose, tal como o número definido de células, refere-se ao total de células que expressam receptores recombinantes no composto administrado. Em alguns aspectos, o número definido de células que expressam receptores recombinantes que são administradas são células negativas para

marcador apoptótico (-) e, opcionalmente, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[00308] Em algumas modalidades, a dose de células da dose unitária contém um número de células, tal como um número definido de células, entre pelo menos ou pelo menos cerca de 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, 10 x 10^6 e cerca de 15 x10^6 células que expressam receptores recombinantes, como células que expressam receptores recombinantes que são $CCR7^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD8^+$, $CD27^+/CD4^+$, $CD27^+/CD8^+$, CD45RA+/$CD4^+$, CD45RA+/$CD8^+$, CCR7-/$CD4^+$, CCR7-/$CD8^+$, CD27-/$CD4^+$, CD27-/$CD8^+$, $CD45RA^-/CD4^+$, $CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD8^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD8^+$, CCR7-/$CD45RA^-/CD4^+$, CCR7-/$CD45RA^-/CD8^+$, CCR7-/CD27-/$CD4^+$ ou CCR7-/CD27-/$CD8^+$ e/ou com marcador apoptótico (-) e $CD8^+$, opcionalmente, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[00309] Em algumas modalidades, uma dose de células é administrada a objetos de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidas. Em algumas modalidades, o tamanho ou o momento das doses é determinado em função da doença ou condição específica no objeto. Em alguns casos, o tamanho ou o momento das doses para uma doença específica, em vista da descrição fornecida, pode ser determinado empiricamente.

[00310] Em algumas modalidades, a dose de células compreende entre em ou cerca de 2 x 10^5 das células/kg e em ou cerca de 2 x 10^6 das células/kg, tal como entre em ou cerca de 4 x 10^5 das células/kg e em ou cerca de 1 x 10^6 das células/kg ou entre ou em torno de 6 x 10^5 das células/kg e em ou cerca de 8 x 10^5 das células/kg. Em algumas modalidades, a dose de células compreende não mais do que 2 x 10^5 das células (por exemplo, que expressam antígeno, como células que expressam CAR) por quilograma de peso corporal do objeto (célu-

las/kg), como não mais do que em ou cerca de 3 x 10^5 células/kg, não mais do que em ou cerca de 4 x 10^5 células/kg, não mais do que em ou cerca de 5 x 10^5 células/kg, não mais do que em ou cerca de 6 x 10^5 células/kg, não mais do que em ou cerca de 7 x 10^5 células/kg, não mais do que 8 ou 10^5 células/kg, não mais do que 9 x 10^5 células/kg, ou não mais do que 1 x 10^6 células/kg, ou não mais do que a cerca de 2 x 10^6 células/kg. Em algumas modalidades, a dose de células compreende pelo menos ou pelo menos cerca de 2 x 10^5 das células (por exemplo, que expressam antígeno, como células que expressam CAR) por quilograma de peso corporal do objeto (células/kg), como pelo menos ou pelo menos cerca de 3 x 10^5 células/kg, pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 4 x 10^5 células/kg, pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 5 x 10^5 células/kg, pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 6 x 10^5 células/kg, pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 7 x 10^5 células/kg, pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 8 x 10^5 células/kg, pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 9 x 10^5 células/kg, pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 1 x 10^6 células/kg, ou pelo menos ou pelo menos cerca de ou em ou cerca de 2 x 10^6 células/kg.

[00311] Em certas modalidades, as células, ou populações individuais de subtipos de células, são administradas ao objeto em uma faixa de em ou cerca de 0,1 milhão a em ou cerca de 100 bilhões de células e/ou essa quantidade de células por quilograma do peso corporal do objeto, tal como, por exemplo, em ou cerca de 0,1 milhão a em ou cerca de 50 bilhões de células (em ou cerca de 5 milhões de células, em ou cerca de 25 milhões de células, em ou cerca de 25 milhões de células, em ou cerca de 500 milhões de células, em ou cerca de 1 bilhão de células, em ou cerca de 5 bilhões de células, em ou cerca de 20 bilhões de células, em ou cerca de 30 bilhões de células, em ou

cerca de 40 bilhões de células, ou uma faixa definida por dois dos valores anteriores), em ou cerca de 1 milhão a em ou cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, em ou cerca de 5 milhões de células, em ou cerca de 25 milhões de células, em ou cerca de 500 milhões de células, em ou cerca de 1 bilhão de células, em cerca de 5 bilhões de células, em ou cerca de 20 bilhões de células, em ou cerca de 30 bilhões de células, em ou cerca de 30 bilhões de células, em ou cerca de 40 bilhões de células ou em um intervalo definido por quaisquer dois dos valores anteriores), tal como em ou cerca de 10 milhões a em ou cerca de 100 bilhões de células (por exemplo, em ou cerca de 20 milhões de células, em ou cerca de 30 milhões de células, em ou cerca de 30 milhões de células, em ou cerca de 40 milhões de células, em ou cerca de 60 milhões de células, em ou cerca de 70 milhões de células, em ou cerca de 80 milhões de células, em ou cerca de 90 milhões de células, em ou cerca de 10 bilhões de células, em ou cerca de 25 bilhões de células, em ou cerca de 50 bilhões de células, em ou cerca de 75 bilhões de células, em ou cerca de 90 bilhões de células ou em um intervalo definido por dois dos valores anteriores) e, em alguns casos, em cerca de 100 milhões de células s para em ou cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, em ou cerca de 120 milhões de células, em ou cerca de 250 milhões de células, em ou cerca de 350 milhões de células, em ou cerca de 450 milhões de células, em ou cerca de 450 milhões de células, em ou cerca de 650 milhões de células, em ou cerca de 800 milhões de células, em ou cerca de 900 milhões de células, em ou cerca de 3 bilhões de células, em ou cerca de 30 bilhões de células, em ou cerca de 45 bilhões de células) ou qualquer valor entre essas faixas e/ou por quilograma de peso corporal do objeto. As dosagens podem variar dependendo dos atributos particulares da doença ou distúrbio e/ou paciente e/ou outros tratamentos. Em algumas modalidades, a dose de células é uma dose plana de células ou dose fixa de

células, de modo que a dose de células não esteja ligada ou baseada na área da superfície corporal ou no peso de um objeto.

[00312] Em algumas modalidades, por exemplo, onde o objeto é humano, a dose inclui menos de cerca de 5 x 10^8 células totais de expressão de receptor recombinante (por exemplo, CAR), células T ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), por exemplo, na faixa de 1 x 10^6 a 5 x 10^8 células, como 2 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 1,5 x 10^8, ou 5 x 10^8 total de tais células, ou a faixa entre dois dos valores anteriores. Em algumas modalidades, por exemplo, onde o objeto é humano, a dose inclui mais do que em ou cerca de 1 x 10^6 células totais de expressão de receptor recombinante (por exemplo, CAR), células T ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e menos do que em ou cerca de 2 x 10^9 total de células que expressam de receptores recombinantes (por exemplo, CAR), células T ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), por exemplo, na faixa de 2,5 a 10^7 a 1,2 a 10^9 essas células, tal como em ou cerca de 2,5 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 1,5 x 10^8 total de tais células, ou a faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores.

[00313] Em algumas modalidades, a dose de células geneticamente manipuladas geneticamente compreende de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total (expressando CAR), de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 2.5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 1 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 5 x 10^6 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 2.5 x 10^6 células T que expres-

sam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^5 a em ou cerca de 1 x 10^6 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 2.5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 1 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^6 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^6 a em ou cerca de 2.5 x 10^6 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^6 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^6 a em ou cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^6 a em ou cerca de 2.5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^6 a em ou cerca de 1 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^6 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^6 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^6 a em ou cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^6 a em ou cerca de 5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^6 a em ou cerca de 2.5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^6 a em ou cerca de 1 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^7 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam

CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^7 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^7 a em ou cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^7 a em ou cerca de 5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^7 a em ou cerca de 2.5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^7 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^7 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^7 a em ou cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 2.5 x 10^7 a em ou cerca de 5 x 10^7 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^7 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^7 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 5 x 10^7 a em ou cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^8 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de 1 x 10^8 a em ou cerca de 2.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, de em ou cerca de or 2.5 x 10^8 a em ou cerca de 5 x 10^8 células T que expressam CAR total. Em algumas modalidades, a dose de células genticamente manipuladas geneticamente compreende de ou de cerca de 2.5 x 10^7 a em ou cerca de 1.5 x 10^8 células T que expressam CAR total, tal como de ou de cerca de 5 x 10^7 a ou até cerca de 1 x 10^8 células T que expressam CAR total.

[00314] Em algumas modalidades, a dose de células genticamente manipuladas geneticamente compreende pelo menos em ou cerca de 1 x 10^5 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 2.5 x 10^5 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 5 x 10^5 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 1 x 10^6 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 2.5 x 10^6 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 5 x 10^6 células que

expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 1 x 10^7 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 2.5 x 10^7 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 5 x 10^7 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 1 x 10^8 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 1.5 x 10^8 células que expressam CAR, pelo menos em ou cerca de 2.5 x 10^8 células que expressam CAR, ou pelo menos em ou cerca de 5 x 10^8 células que expressam CAR

[00315] Em algumas modalidades, a terapia celular compreende administrar uma dose compreendendo um número de células de ou de cerca de 1 x 10^5 a ou até cerca de 5 x 10^8 células que expressam receptores recombinantes totais, células T totais, ou células mononucleares de sangue periférico total (PBMCs), de ou de cerca de 5 x 10^5 a ou até cerca de 1 x 10^7 células que expressam de receptores recombinantes totais, células T totais, ou células mononucleares de sangue periférico total (PBMCs) ou de ou de cerca de 1 x 10^6 a ou até cerca de 1 x 10^7 células que expressam receptores recombinantes totais, células T totais, ou células mononucleares do sangue periférico total (PBMCs), cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a terapia celular compreende administrar uma dose de células compreendendo um número de células pelo menos ou pelo menos cerca de 1 x 10^5 células que expressam receptores recombinantes totais, células T totais, ou células mononucleares de sangue periférico total (PBMCs), tais pelo menos ou pelo menos 1 x 10^6, pelo menos ou pelo menos cerca de 1 x 10^7, pelo menos ou pelo menos cerca de 1 x 10^8 de tais células. Em algumas modalidades, o número é com referência ao número total de $CD3^+$ ou $CD8^+$, em alguns casos também células que expressam receptores recombinantes (por exemplo, CAR^+). Em algumas modalidades, a terapia celular compreende administrar uma dose compreendendo um número de células de ou de cerca de 1 x 10^5 a ou até cerca

de 5 x 10^8 células T totais de $CD3^+$ ou $CD8^+$ ou células que expressam receptores recombinantes $CD3^+$ ou $CD8^+$, de ou de cerca de 5 x 10^5 a ou até cerca de 1 x 10^7 células T totais de $CD3^+$ ou $CD8^+$ ou células que expressam receptores recombinantes $CD3^+$ ou $CD8^+$ ou de ou de cerca de 1 x 10^6 a ou até cerca de 1 x 10^7 células T totais de $CD3^+$ ou $CD8^+$ ou $CD3^+$ ou células que expressam receptores $CD8^+$ recombinantes, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a terapia celular compreende administrar uma dose compreendendo um número de células de ou de cerca de 1 x 10^5 a ou até cerca de 5 x 10^8 células $CD3^+/CAR^+$ ou $CD8^+/CAR^+$ totais, de ou de cerca de 5 x 10^5 a ou até cerca de 1 x 10^7 total de células $CD3^+/CAR^+$ ou $CD8^+/CAR^+$, ou de ou de cerca de 1 x 10^6 a ou até cerca de 1 x 10^7 de células $CD3^+/CAR^+$ totais ou $CD8^+/CAR^+$, cada uma inclusive.

[00316] Em algumas modalidades, as células T da dose incluem células T $CD4^+$, células T $CD8^+$ ou células T $CD4^+$ e $CD8^+$.

[00317] Em algumas modalidades, por exemplo, onde o objeto é humano, as células T $CD8^+$ da dose, incluindo em uma dose incluindo células T $CD4^+$ e $CD8^+$, incluem entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 5 x 10^8 células $CD8^+$ que expressam receptores recombinantes totais (por exemplo, CAR), por exemplo, na faixa de em ou cerca de 5 x 10^6 a 1 ou 10^8 tais células, como 1 x 10^7, 2,5 x 10^7, 5 x 10^7, 7,5 x 10^7, 1 x 10^8, 1,5 x 10^8 ou 5 x 10^8 tais células totais, ou a faixa entre dois dos valores anteriores. Em algumas modalidades, o paciente recebe doses múltiplas e cada uma das doses ou a dose total pode estar dentro de qualquer um dos valores anteriores. Em algumas modalidades, a dose de células compreende administração de ou de cerca de 1 x 10^7 a ou cerca de 0,75 x 10^8 células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante total, de ou de cerca de 1 x 10^7 a ou cerca de 5 x 10^7 células T $CD8^+$ expressando receptores recombinantes totais, de ou de cerca de 1 x 10^7 a ou cerca de 0,25 x 10^8 células T $CD8^+$ expres-

sando receptor recombinante total, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a dose de células compreende administrar pelo menos 1 x 10^7, 2,5 x 10^7, 5 x 10^7, 7,5 x 10^7, 1 x 10^8, 1,5 x 10^8, 2,5 x 10^8 ou 5 x 10^8 células T expressando receptor recombinante total $CD8^+$.

[00318] Em algumas modalidades, a dose de células, por exemplo, células T que expressam receptores recombinantes, é administrada ao objeto como uma dose única ou é administrada apenas uma vez dentro de um período de duas semanas, um mês, três meses, seis meses, 1 ano ou mais.

[00319] No contexto da terapia celular adotiva, a administração de uma determinada "dose" abrange a administração da quantidade ou número de células dadas como uma composição única e/ou administração ininterrupta única, por exemplo, como uma injeção única ou infusão contínua, e também abrange a administração da quantidade ou número dado de células como uma dose dividida ou como uma pluralidade de composições, fornecidas em múltiplas composições ou infusões individuais, durante um período de tempo especificado, como por um período de não mais do que 3 dias. Assim, em alguns contextos, a dose é uma administração única ou contínua do número especificado de células, administrada ou iniciada em um único momento. Em alguns contextos, no entanto, a dose é administrada em várias injeções ou infusões por um período não mais do que três dias, como uma vez ao dia por três dias ou por dois dias ou por múltiplas infusões durante um único dia.

[00320] Assim, em alguns aspectos, as células da dose são administradas em uma única composição farmacêutica. Em algumas modalidades, as células da dose são administradas em uma pluralidade de composições, contendo coletivamente as células da dose.

[00321] Em algumas modalidades, o termo "dose dividida" refere-se a uma dose que é dividida para que seja administrada por mais de um

dia. Este tipo de dosagem é abrangido pelos presentes métodos e é considerado uma dose única.

[00322] Assim, a dose de células pode ser administrada como uma dose dividida, por exemplo, uma dose dividida administrada ao longo do tempo. Por exemplo, em algumas modalidades, a dose pode ser administrada ao objeto durante 2 dias ou durante 3 dias. Métodos exemplares para dosagem dividida incluem administrar 25% da dose no primeiro dia e administrar os 75% restantes da dose no segundo dia. Em outras modalidades, 33% da dose pode ser administrada no primeiro dia e os restantes 67% administrados no segundo dia. Em alguns aspectos, 10% da dose é administrada no primeiro dia, 30% da dose é administrada no segundo dia e 60% da dose é administrada no terceiro dia. Em algumas modalidades, a dose dividida não é espalhada por mais de 3 dias.

[00323] Em algumas modalidades, as células da dose podem ser administradas pela administração de uma pluralidade de composições ou soluções, como uma primeira e uma segunda, opcionalmente adicionalmente, cada uma contendo algumas células da dose. Em alguns aspectos, a pluralidade de composições, cada uma contendo uma população diferente e/ou subtipos de células, é administrada separadamente ou independentemente, opcionalmente dentro de um certo período de tempo. Por exemplo, as populações ou subtipos de células podem incluir células T $CD8^+$ e $CD4^+$, respectivamente, e/ou populações enriquecidas com $CD8^+$- e $CD4^{+-}$, respectivamente, por exemplo, células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$, cada uma delas individualmente, incluindo células geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, a administração da dose compreende administrar uma primeira composição compreendendo uma dose de células T $CD8^+$ ou uma dose de células T $CD4^+$ e a administração de uma segunda composição compreendendo a outra da dose da célula T

$CD4^+$ e as células T $CD8^+$.

[00324] Em algumas modalidades, a administração da composição ou dose, por exemplo, administração da pluralidade de composições celulares, envolve a administração das composições celulares separadamente. Em alguns aspectos, as administrações separadas são realizadas simultaneamente ou sequencialmente, em qualquer ordem. Em algumas modalidades, a dose compreende uma primeira composição e uma segunda composição, e a primeira composição e a segunda composição são administradas com intervalo de 0 a 12 horas, intervalo de 0 a 6 horas ou intervalo de 0 a 2 horas. Em algumas modalidades, o começo da administração da primeira composição e o começo da administração da segunda composição são realizados não mais do que 2 horas, não mais do que 1 h, não mais do que 30 minutos de intervalo, não mais do que 15 minutos de intervalo, não mais do que 10 minutos de intervalo ou não mais do que 5 minutos de intervalo. Em algumas modalidades, o começo e/ou conclusão da administração da primeira composição e a conclusão e/ou começo da administração da segunda composição são realizados não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora ou não mais do que 30 minutos de intervalo, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo.

[00325] Em algumas modalidades, a primeira composição, por exemplo, a primeira composição da dose, compreende células T $CD4^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição, por exemplo, a primeira composição da dose, compreende células T $CD8^+$. Em algumas modalidades, a primeira composição é administrada antes da segunda composição. Em algumas modalidades, a segunda composição, por exemplo, segunda composição da dose, compreende células T $CD4^+$. Em algumas modalidades, a segunda composição, por exemplo, segunda composição da dose, compreende células T $CD8^+$.

[00326] Em algumas modalidades, a dose ou composição de célula inclui uma razão definida ou alvo de células $CD4^+$ que expressam um receptor recombinante para células $CD8^+$ que expressam um receptor recombinante e/ou de células $CD4^+$ para células $CD8^+$, cuja razão é opcionalmente é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1, tal como aproximadamente 1:1. Em alguns aspectos, a administração de uma composição ou dose com a razão desejada ou alvo de diferentes populações celulares (tal como a razão $CD4^+$:$CD8^+$ ou a razão CAR^+ $CD4^+$:CAR^+ $CD8^+$, por exemplo, 1:1) envolve a administração de uma célula composição contendo uma das populações e, em seguida, administração de uma composição de célula separada compreendendo a outra das populações, em que a administração está no ou em ou cerca de na razão alvo ou desejada. Em alguns aspectos, a administração de uma dose ou composição de célula em uma razão definida leva a uma expansão, persistência e/ou atividade antitumoral melhorada da terapia de células T.

[00327] Em algumas modalidades, o objeto recebe doses múltiplas, por exemplo, duas ou mais doses ou doses consecutivas múltiplas, das células. Em algumas modalidades, duas doses são administradas a um objeto. Em algumas modalidades, o objeto recebe a dose consecutiva, por exemplo, segunda dose, é administrada aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 dias após a primeira dose. Em algumas modalidades, várias doses consecutivas são administradas após a primeira dose, de modo que uma dose ou doses adicionais são administradas após a administração da dose consecutiva. Em alguns aspectos, o número de células administradas ao objeto na dose adicional é igual ou semelhante à primeira dose e/ou dose consecutiva. Em algumas modalidades, a dose ou doses adicionais são maiores que as doses anteriores.

[00328] Em alguns aspectos, o tamanho da primeira dose e/ou con-

secutiva é determinado com base em um ou mais critérios, como resposta do objeto a tratamento anterior, por exemplo, quimioterapia, carga de doença no objeto, como carga tumoral, volume, tamanho ou grau, extensão ou tipo de metástase, estágio e/ou probabilidade ou incidência de o objeto desenvolver resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófagos, síndrome de lise tumoral, neurotoxicidade e/ou uma resposta imune do hospedeiro contra as células e/ou receptores recombinantes sendo administrados.

[00329] Em alguns aspectos, o tempo entre a administração da primeira dose e a administração da dose consecutiva é de cerca de 9 a cerca de 35 dias, cerca de 14 a cerca de 28 dias ou 15 a 27 dias. Em algumas modalidades, a administração da dose consecutiva é em um ponto no tempo mais de cerca de 14 dias após e menos de cerca de 28 dias após a administração da primeira dose. Em alguns aspectos, o tempo entre a primeira dose e a consecutiva é de em ou cerca de 21 dias. Em algumas modalidades, uma dose ou doses adicionais, por exemplo, doses consecutivas, são administradas após a administração da dose consecutiva. Em alguns aspectos, a dose ou doses consecutivas adicionais são administradas pelo menos cerca de 14 e menos de cerca de 28 dias após a administração de uma dose anterior. Em algumas modalidades, a dose adicional é administrada menos de cerca de 14 dias após a dose anterior, por exemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 dias após a dose anterior. Em algumas modalidades, nenhuma dose é administrada menos de cerca de 14 dias após a dose anterior e/ou nenhuma dose é administrada mais de cerca de 28 dias após a dose anterior.

[00330] Em algumas modalidades, a dose de células, por exemplo, células que expressam receptores recombinantes, compreende duas doses (por exemplo, uma dose dupla), compreendendo uma primeira dose das células T e uma dose consecutiva das células T, em que

uma ou ambas da primeira dose e a segunda dose compreende a administração da dose dividida de células T.

[00331] Em algumas modalidades, a dose de células é geralmente grande o suficiente para ser eficaz na redução da carga da doença.

[00332] Em algumas modalidades, as células são administradas em uma dosagem desejada, que em alguns aspectos inclui uma dose ou número desejado de células ou tipo (s) de célula e/ou uma razão desejada de tipos de célula. Assim, a dosagem de células em algumas modalidades é baseada em um número total de células (ou número por kg de peso corporal) e uma razão desejada das populações ou subtipos individuais, como a razão $CD4^+$ para $CD8^+$. Em algumas modalidades, a dosagem de células é baseada em um número total desejado (ou número por kg de peso corporal) de células nas populações individuais ou nos tipos de células individuais. Em algumas modalidades, a dosagem é baseada em uma combinação de tais características, como um número desejado de células totais, razão desejada e número total desejado de células nas populações individuais.

[00333] Em algumas modalidades, as populações ou subtipos de células, como as células T $CD8^+$ e $CD4^+$, são administradas na ou dentro de uma diferença tolerada de uma dose desejada de células totais, como uma dose desejada de células T. Em alguns aspectos, a dose desejada é um número desejado de células ou um número desejado de células por unidade de peso corporal do objeto ao qual as células são administradas, por exemplo, células/kg. Em alguns aspectos, a dose desejada é igual ou superior a um número mínimo de células ou número mínimo de células por unidade de peso corporal. Em alguns aspectos, entre as células totais, administradas na dose desejada, as populações ou subtipos individuais estão presentes em uma razão de saída desejada ou próxima (tal como a razão $CD4^+$ a $CD8^+$), por exemplo, dentro de uma certa diferença tolerada ou erro de tal razão.

[00334] Em algumas modalidades, as células são administradas a uma diferença tolerada de uma dose desejada de uma ou mais das populações individuais ou subtipos de células, como uma dose desejada de células $CD4^+$ e/ou uma dose desejada de células $CD8^+$. Em alguns aspectos, a dose desejada é um número desejado de células do subtipo ou população, ou um número desejado de tais células por unidade de peso corporal do objeto ao qual as células são administradas, por exemplo, células/kg. Em alguns aspectos, a dose desejada é igual ou superior a um número mínimo de células da população ou subtipo ou número mínimo de células da população ou subtipo por unidade de peso corporal.

[00335] Assim, em algumas modalidades, a dosagem é baseada em uma dose fixa desejada de células totais e em uma razão desejada, e/ou em uma dose fixa desejada de um ou mais, por exemplo, cada um dos subtipos individuais ou subpopulações. Assim, em algumas modalidades, a dosagem é baseada em uma dose fixa ou mínima desejada de células T e em uma razão desejada de células $CD4^+$ para $CD8^+$, e/ou é baseada em uma dose fixa ou mínima desejada de células $CD4^+$ e/ou $CD8^+$.

[00336] Em algumas modalidades, as células são administradas em ou dentro de uma faixa tolerada de uma razão de saída desejada de múltiplas populações ou subtipos de células, como células $CD4^+$ e $CD8^+$ ou subtipos. Em alguns aspectos, a razão desejada pode ser uma razão específica ou uma faixa de razões. Por exemplo, em algumas modalidades, a razão desejada (por exemplo, razão de células $CD4^+$ para $CD8^+$) está entre em ou cerca de 1:5 e em ou cerca de 5:1 (ou maior do que cerca de 1:5 e menor do que cerca de 5:1) ou entre em ou cerca de 1:3 e em ou cerca de 3:1 (ou maior do que cerca de 1:3 e menor do que cerca de 3:1), tal como entre 2:1 e em ou cerca de 1: 5 (ou maior que cerca de 1:5 e menor que cerca de 2:1), como em

ou em ou cerca de 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1,1:1, 1:1, 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, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, ou 1:5. Em alguns aspectos, a diferença tolerada é de cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4% 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% da razão desejada, incluindo qualquer valor entre tais faixas.

[00337] Em modalidades particulares, os números e/ou concentrações de células se referem ao número de células que expressam receptores recombinantes (por exemplo, CAR). Em outras modalidades, os números e/ou concentrações de células se referem ao número ou concentração de todas as células, células T, ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) administradas.

[00338] Em alguns aspectos, o tamanho da dose é determinado com base em um ou mais critérios, como resposta do objeto ao tratamento anterior, por exemplo, quimioterapia, carga de doença no objeto, como carga tumoral, volume, tamanho ou grau, extensão ou tipo de metástase, estágio e/ou probabilidade ou incidência do objeto desenvolver resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófagos, síndrome de lise tumoral, neurotoxicidade e/ou uma resposta imune do hospedeiro contra as células e/ou receptores recombinantes sendo administrados.

[00339] Em algumas modalidades, os métodos também incluem a administração de uma ou mais dose adicional de células que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou terapia para linfonodos, e/ou uma ou mais etapas dos métodos são repetidas. Em algumas modalidades, as uma ou mais dose adicional é a mesma que a dose inicial. Em algumas modalidades, a uma ou mais dose adicional é diferente da dose inicial, por exemplo, mais alta, tais como 2 vezes,

3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou mais. 10 vezes ou mais acima da dose inicial, ou mais baixa, como por exemplo, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes ou mais abaixa do que a dose inicial. Em algumas modalidades, a administração de uma ou mais dose adicional é determinada com base na resposta do objeto ao tratamento inicial ou a qualquer tratamento anterior, carga de doença no objeto, como carga tumoral, volume, tamanho ou grau, extensão ou tipo de metástase, estágio e/ou probabilidade ou incidência do objeto desenvolver resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófagos, síndrome de lise tumoral, neurotoxicidade e/ou uma resposta imune do hospedeiro contra as células e/ou receptores recombinantes sendo administrados.

C. Métodos de Tratamento

[00340] São aqui fornecidos métodos de tratamento, por exemplo, incluindo a administração de qualquer uma das células manipuladas geneticamente ou composições contendo células manipuladas geneticamente descritas neste documento, incluindo uma ou mais doses, por exemplo, doses unitárias ou quaisquer composições que contenham uma ou mais doses unitárias descritas aqui. Em alguns aspectos, também são fornecidos métodos para administrar qualquer uma das células manipuladas geneticamente ou composições contendo células manipuladas geneticamente ou doses unitárias descritas aqui para um objeto, como um objeto que tem uma doença ou distúrbio. Em alguns aspectos, também são fornecidos usos de qualquer uma das células manipuladas geneticamente ou composições contendo células manipuladas geneticamente aqui descritas para o tratamento de uma doença ou distúrbio. Em alguns aspectos, também são fornecidos usos de qualquer uma das células manipuladas geneticamente ou composições contendo células manipuladas geneticamente ou doses unitárias

descritas aqui para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio. Em alguns aspectos, também são fornecidas quaisquer células ou composições manipuladas geneticamente que contêm células manipuladas geneticamente ou doses unitárias descritas aqui, para uso no tratamento de uma doença ou distúrbio, ou para administração a um objeto tendo uma doença ou distúrbio.

[00341] As células manipuladas geneticamente que expressam um receptor recombinante, como um receptor de antígeno quimérico (CAR), ou composições compreendendo o mesmo, são úteis em uma variedade de indicações terapêuticas, de diagnóstico e profiláticas. Por exemplo, as células ou composições manipuladas geneticamente compreendendo as células manipuladas geneticamente são úteis no tratamento de uma variedade de doenças e distúrbios em um objeto. Tais métodos e usos incluem métodos terapêuticos e usos, por exemplo, envolvendo a administração das células manipuladas geneticamente, ou composições contendo as mesmas, a um objeto tendo uma doença, condição ou distúrbio, como um tumor ou câncer. Em algumas modalidades, as células ou composições manipuladas geneticamente compreendendo as mesmas são administradas em uma quantidade eficaz para efetuar o tratamento da doença ou distúrbio. As utilizações incluem utilizações das células ou composições manipuladas geneticamente em tais métodos e tratamentos e na preparação de um medicamento para realizar esses métodos terapêuticos. Em algumas modalidades, os métodos são realizados administrando as células manipuladas geneticamente, ou composições compreendendo as mesmas, ao objeto que tem ou suspeita de ter a doença ou condição. Em algumas modalidades, os métodos tratam desse modo a doença ou condição ou distúrbio no objeto.

[00342] Os métodos para administração de células para terapia celular adotiva são conhecidos e podem ser utilizados em conexão com

os métodos e composições fornecidos. Por exemplo, os métodos adotados de terapia com células T são descritos, por exemplo, na publicação do pedido de patente US No. 2003/0170238 de Gruenberg et al; Patente US No. 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8 (10): 577-85). Vide, por exemplo, Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31 (10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8 (4): e61338.

[00343] A doença ou condição que é tratada pode ser qualquer uma na qual a expressão de um antígeno esteja associada e/ou envolvida na etiologia de uma condição ou distúrbio de doença, por exemplo, causa, exacerba ou de outra forma está envolvido em tal doença, condição ou distúrbio. Doenças e condições exemplares podem incluir doenças ou condições associadas à malignidade ou transformação de células (por exemplo, câncer), doença autoimune ou inflamatória ou uma doença infecciosa, por exemplo, causada por um patógeno bacteriano, viral ou outro. Antígenos exemplares, que incluem antígenos associados a várias doenças e condições que podem ser tratadas, são descritos acima. Em modalidades particulares, o receptor de antígeno quimérico ou TCR transgênico se liga especificamente a um antígeno associado à doença ou condição.

[00344] Entre as doenças, condições e distúrbios estão os tumores, incluindo tumores sólidos, neoplasias hematológicas e melanomas, incluindo tumores localizados e metastáticos, doenças infecciosas, como infecção por vírus ou outro patógeno, por exemplo, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV e doença parasitária e doenças autoimunes e doenças inflamatórias. Em algumas modalidades, a doença, distúrbio ou condição é um tumor, câncer, malignidade, neoplasia ou outra doença ou distúrbio proliferativo. Em algumas modalidades, a doença ou condição é uma malignidade de células B. Em algumas modalidades, a

malignidade das células B é uma leucemia ou um linfoma. Tais doenças incluem, entre outras, leucemia, linfoma, por exemplo, leucemia mieloide aguda (ou mieloide) (CML), leucemia mieloide crônica (ou mieloide) (CML), leucemia linfocítica aguda (ou linfoblástica) (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma da zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin (HL), linfoma não-Hodgkin (NHL), linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfoma folicular, linfoma folicular refratário, linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) e mieloma múltiplo (MM). Em algumas modalidades, doença ou condição é uma neoplasia de células B selecionada entre leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA adulta, leucemia linfoblástica crônica (LLC), linfoma não Hodgkin (NHL) e linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Em algumas modalidades, a doença ou condição é NHL e o NHL é selecionado a partir do grupo que consiste em NHL agressivo, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), NOS (de novo e transformado a partir de indolente), linfoma mediastinal primário de células B grandes (PMBCL), Linfoma de células B grandes rico em células T/histócitos (TCHRBCL), linfoma de Burkitt, linfoma de células do manto (MCL) e/ou linfoma folicular (FL), opcionalmente, linfoma folicular Grau 3B (FL3B).

[00345] Em alguns aspectos, a doença ou condição é leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA adulta, leucemia linfoblástica crônica (LLC), linfoma não Hodgkin (NHL) ou linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Em alguns casos, a doença ou condição é um NHL, como ou incluindo um NHL agressivo, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), NOS (de novo e transformado de indolente), linfoma mediastinal primário de células B grandes (PMBCL), linfoma de células B grandes rico em células T/histócitos (TCHRBCL), linfoma de Burkitt, linfoma de células do manto (MCL) e/ou linfoma folicular (FL), opcio-

nalmente, linfoma folicular Grau 3B (FL3B). Em alguns aspectos, o receptor recombinante, como um CAR, liga-se especificamente a um antígeno associado à doença ou condição ou expresso nas células do ambiente de uma lesão associada à malignidade das células B. Os antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados a uma malignidade de células B, como qualquer um de vários marcadores conhecidos de células B. Em algumas modalidades, o antígeno direcionado pelo receptor é CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igcapa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30, ou combinações dos mesmos.

[00346] Em algumas modalidades, a doença ou condição é um mieloma, como um mieloma múltiplo. Em alguns aspectos, o receptor recombinante, como um CAR, liga-se especificamente a um antígeno associado à doença ou condição ou expresso nas células do ambiente de uma lesão associada ao mieloma múltiplo. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados ao mieloma múltiplo. Em alguns aspectos, o antígeno, por exemplo, o segundo ou antígeno adicional, como o antígeno específico da doença e/ou o antígeno relacionado, é expresso no mieloma múltiplo, como o antígeno de maturação das células B (BCMA), membro D de grupo 5 de classe C de receptores acoplados à proteína G (GPRC5D), CD38 (ADP ribose hidrolase cíclica), CD138 (syndecan-1, syndecan, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 subconjunto 1, CRACC, SLAMF7, CD319 e 19A24), BAFF-R, TACI e/ou FcRH5. Outros antígenos de mieloma múltiplo exemplares incluem CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β2-Microglobulina, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1 e o receptor de ativina tipo IIA (ActRIIA). Vide Benson e Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30 (16): 2013-15; Tao e Anderson, Bone Marrow Research (2011): 924058; Chu et al., Leukemia (2013) 28 (4): 917-27; Garfall et al., Discov Med. (2014) 17 (91): 37-46.

Em algumas modalidades, os antígenos incluem aqueles presentes em tumores linfoides, mieloma, linfoma associado à AIDS e/ou linfoproliferações pós-transplante, tais como CD38. Os anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno direcionados contra tais antígenos são conhecidos e incluem, por exemplo, os descritos na Patente U.S. No. 8.153.765; 8,603477, 8,008,450; U.S. Pub. US20120189622 ou US20100260748; e/ou Publicações PCT internacionais Nos. WO2006 099875, WO2009080829 ou WO2012092612 ou WO2014210064. Em algumas modalidades, esses anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno (por exemplo, scFv) estão contidos em anticorpos multiespecíficos, receptores quiméricos multiespecíficos, como CARs multiespecíficos e/ou células multiespecíficas.

[00347] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio está associado à expressão do membro D do grupo 5 da classe C do receptor acoplado à proteína G (GPRC5D) e/ou à expressão do antígeno de maturação das células B (BCMA).

[00348] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio é um distúrbio relacionado às células B. Em algumas das modalidades fornecidas dos métodos fornecidos, a doença ou distúrbio associado ao BCMA é uma doença ou distúrbio autoimune. Em algumas das modalidades fornecidas dos métodos fornecidos, a doença ou distúrbio autoimune é lúpus eritematoso sistêmico (LES), nefrite lúpica, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, vasculite associada a ANCA, púrpura trombocitopenia idiopática (ITP), púrpura trombocitopenia trombótica (TTP), trombocitopenia autoimune, doença de Chagas, doença de Grave, granulomatose de Wegener, poliarterite nodosa, síndrome de Sjögren, pênfigo vulgar, esclerodermia, esclerose múltipla, psoríase, nefropatia por IgA, polineuropatias IgM, vasculite, diabetes mellitus, síndrome de Reynaud, síndrome antifosfolipídio, doença de Goodpasture, doença de Kawasaki, anemia hemolítica autoimune, mi-

astenia gravis ou glomerulonefrite progressiva.

[00349] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio é um câncer. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer que expressa GPRC5D. Em algumas modalidades, o câncer é uma neoplasia de células plasmáticas e a neoplasia de células plasmáticas é mieloma múltiplo (MM) ou plasmocitoma. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo (MM). Em algumas modalidades, o câncer é um mieloma múltiplo recidivado/refratário.

[00350] Em algumas modalidades, a doença ou condição é uma doença ou condição infecciosa, como, entre outras, infecções virais, retrovirais, bacterianas e protozoárias, imunodeficiência, citomegalovírus (CMV), vírus de Epstein-Barr (EBV), adenovírus, poliomavírus BK. Em algumas modalidades, a doença ou condição é uma doença ou condição autoimune ou inflamatória, como artrite, por exemplo, artrite reumatoide (RA), diabetes tipo I, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), doença inflamatória intestinal, psoríase, esclerodermia, tireoide autoimune doença, doença de Grave, doença de Crohn, esclerose múltipla, asma e/ou uma doença ou condição associada ao transplante.

[00351] Em algumas modalidades, o antígeno associado à doença ou distúrbio ou inclui integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 da quimioterapia Motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epi-

telial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo 5 do receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Rα2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo Membro A da família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos do membro D de grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de célula-tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), tirosina quinase de receptor tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de

crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno, ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos. Os antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados a uma malignidade de células B, tal como qualquer um de vários marcadores conhecidos de células B. Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igcapa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30.

[00352] Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui um antígeno específico ao patógeno ou expresso ao patógeno. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno viral (como um antígeno viral do HIV, HCV, HBV, etc.), antígenos bacterianos e/ou antígenos parasitários.

[00353] Em algumas modalidades, a terapia celular, por exemplo, terapia adotiva de células T, é realizada por transferência autóloga, na qual as células são isoladas e/ou preparadas de outro modo a partir do objeto que deve receber a terapia celular ou de uma amostra derivada de tal objeto. Assim, em alguns aspectos, as células são derivadas de um objeto, por exemplo, paciente, em necessidade de um tratamento e as células, após isolamento e processamento, são administradas ao mesmo objeto.

[00354] Em algumas modalidades, a terapia celular, por exemplo, terapia adotiva de células T, é realizada por transferência alogênica, na qual as células são isoladas e/ou preparadas de outro modo a partir de um objeto que não seja um objeto que deve receber ou que finalmente recebe a terapia celular, por exemplo, um primeiro objeto. Em tais modalidades, as células são então administradas a um objeto diferente, por exemplo, um segundo objeto, da mesma espécie. Em algu-

mas modalidades, o primeiro e o segundo objetos são geneticamente idênticos. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo objetos são geneticamente semelhantes. Em algumas modalidades, o segundo objeto expressa a mesma classe HLA ou supertipo que o primeiro objeto.

[00355] As células podem ser administradas por qualquer meio adequado, por exemplo, por infusão em bolus, por injeção, por exemplo, injeções intravenosas ou subcutâneas, injeção intraocular, injeção periocular, injeção sub-retiniana, injeção intravítrea, injeção transseptal, injeção subescleral, injeção intracoroidal, injeção intracameral, injeção subconjuntival, injeção da subconjuntiva, injeção sub-Tenon, injeção retrobulbar, injeção peribulbar ou entrega justa-escleral posterior. Em algumas modalidades, elas são administradas por administração parentérica, intrapulmonar e intranasal e, se desejado para o tratamento local, administração intralesional. As infusões parentéricas incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Em algumas modalidades, uma dada dose é administrada por uma única administração em bolo das células. Em algumas modalidades, é administrada por múltiplas administrações em bolo das células, por exemplo, durante um período não mais do que 3 dias, ou por administração de infusão contínua das células. Em algumas modalidades, a administração da dose celular ou de quaisquer terapias adicionais, por exemplo, a terapia de eliminação de linfonodos, terapia de intervenção e/ou terapia combinada, é realizada via entrega ambulatorial.

[00356] Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada pode depender do tipo de doença a ser tratada, do tipo de células ou receptores recombinantes, da gravidade e do curso da doença, se as células são administradas para finalidades de prevenção ou tratamento, terapia anterior, histórico clínico e resposta do objeto às

células e a critério do médico assistente. As composições e células são, em algumas modalidades, administradas adequadamente ao objeto ao mesmo tempo ou ao longo de uma série de tratamentos.

[00357] Em algumas modalidades, as células são administradas como parte de um tratamento combinado, como simultaneamente ou sequencialmente com, em qualquer ordem, outra intervenção terapêutica, como um anticorpo ou célula ou receptor ou agente manipulado geneticamente, tal como um agente citotóxico ou terapêutico. As células em algumas modalidades são coadministradas com um ou mais agentes terapêuticos adicionais ou em conexão com outra intervenção terapêutica, simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem. Em alguns contextos, as células são coadministradas com outra terapia suficientemente próxima no tempo, de modo que as populações celulares aumentam o efeito de um ou mais agentes terapêuticos adicionais, ou vice-versa. Em algumas modalidades, as células são administradas antes de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, as células são administradas após um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes adicionais incluem uma citocina, tal como IL-2, por exemplo, para melhorar a persistência. Em algumas modalidades, os métodos compreendem a administração de um agente quimioterapêutico.

[00358] Em algumas modalidades, os métodos compreendem a administração de um agente quimioterapêutico, por exemplo, um agente quimioterápico condicionador, por exemplo, para reduzir a carga tumoral antes da administração.

[00359] Pré-condicionar objetos com terapias imunoempobrecidas (por exemplo, linfoempobrecidas) em alguns aspectos pode melhorar os efeitos da terapia celular adotiva (ACT).

[00360] Assim, em algumas modalidades, os métodos incluem a

administração de um agente de pré-condicionamento, tal como um agente linfoempobrecido ou quimioterápico, tal como ciclofosfamida, fludarabina ou combinações dos mesmos, a um objeto antes do início da terapia celular. Por exemplo, o objeto pode ser administrado um agente de pré-condicionamento pelo menos 2 dias antes, como pelo menos 3, 4, 5, 6 ou 7 dias antes, para o início da terapia celular. Em algumas modalidades, o objeto é administrado um agente de pré-condicionamento não mais do que 7 dias antes, como não mais do que 6, 5, 4, 3 ou 2 dias antes, para o início da terapia celular.

[00361] Em algumas modalidades, o objeto é pré-condicionado com ciclofosfamida em uma dose entre ou entre cerca de 20 mg/kg e 100 mg/kg, como entre ou entre cerca de 40 mg/kg e 80 mg/kg. Em alguns aspectos, o objeto é pré-condicionado com ou com cerca de 60 mg/kg de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida pode ser administrada em uma dose única ou em uma pluralidade de doses, como as administradas diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada uma vez ao dia por um ou dois dias. Em algumas modalidades, onde o agente linfoempobrecido compreende ciclofosfamida, o objeto recebe ciclofosfamida em uma dose entre ou entre cerca de 100 mg/m^2 e 500 mg/m^2, como entre ou entre cerca de 200 mg/m^2 e 400 mg/m^2, ou 250 mg/m^2 e 350 mg/m^2, cada uma inclusive. Em alguns casos, o objeto é administrado cerca de 300 mg/m^2 de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida pode ser administrada em uma dose única ou em uma pluralidade de doses, como as administradas diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada diariamente, como por 1-5 dias, por exemplo, por 3 a 5 dias. Em alguns casos, o objeto é administrado com cerca de 300 mg/m^2 de ciclofosfamida, diariamente por 3 dias, antes do início da terapia celular.

[00362] Em algumas modalidades, em que o agente linfoempobrecido compreende fludarabina, o objeto recebe fludarabina em uma dose entre ou entre cerca de 1 mg/m^2 e 100 mg/m^2, como entre ou entre cerca de 10 mg/m^2 e 75 mg/m^2, 15 mg/m^2 e 50 mg/m^2, 20 mg/m^2 e 40 mg/m^2, ou 24 mg/m^2 e 35 mg/m^2, cada uma inclusive. Em alguns casos, o objeto é administrado com cerca de 30 mg/m^2 de fludarabina. Em algumas modalidades, a fludarabina pode ser administrada em uma dose única ou em uma pluralidade de doses, como as administradas diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada diariamente, tal como por 1-5 dias, por exemplo, por 3 a 5 dias. Em alguns casos, o objeto é administrado com cerca de 30 mg/m^2 de fludarabina, diariamente por 3 dias, antes do início da terapia celular.

[00363] Em algumas modalidades, o agente linfoempobrecido compreende uma combinação de agentes, tal como uma combinação de ciclofosfamida e fludarabina. Assim, a combinação de agentes pode incluir ciclofosfamida em qualquer dose ou esquema de administração, tal como aqueles descritos acima, e fludarabina em qualquer dose ou esquema de administração, tal como aqueles descritos acima. Por exemplo, em alguns aspectos, o objeto recebe 60 mg/kg (~ 2 g/m^2) de ciclofosfamida e 3 a 5 doses de 25 mg/m^2 de fludarabina antes da primeira dose ou subsequente.

[00364] Após a administração das células, a atividade biológica das populações de células manipuladas geneticamente em algumas modalidades é medida, por exemplo, por qualquer um de vários métodos conhecidos. Os parâmetros para avaliar incluem a ligação específica de uma célula T manipulada geneticamente ou natural ou outra célula imune ao antígeno, in vivo, por exemplo, por imagem ou ex vivo, por exemplo, por ELISA ou citometria de fluxo. Em certas modalidades, a capacidade das células manipuladas geneticamente para destruir as

células-alvo pode ser medida usando quaisquer métodos conhecidos adequados, como ensaios de citotoxicidade descritos em, por exemplo, Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32 (7): 689-702 (2009) e Herman et al. J. Immunological Methods, 285 (1): 25-40 (2004). Em certas modalidades, a atividade biológica das células é medida testando a expressão e/ou secreção de uma ou mais citocinas, como CD107a, IFNγ, IL-2 e TNF. Em alguns aspectos, a atividade biológica é medida pela avaliação do resultado clínico, como redução na carga ou carga do tumor.

[00365] Em certas modalidades, as células manipuladas geneticamente são adicionalmente modificadas de várias maneiras, de modo que sua eficácia terapêutica ou profilática seja aumentada. Por exemplo, o CAR ou TCR manipulado geneticamente expresso pela população pode ser conjugado direta ou indiretamente através de um ligante a uma porção alvo. A prática de conjugar compostos, por exemplo, o CAR ou TCR, para porções alvo é conhecida. Vide, por exemplo, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:1 1 1 (1995) e Patente U.S. 5.087.616.

[00366] Em algumas modalidades, as células são administradas como parte de um tratamento combinado, como simultaneamente ou sequencialmente com, em qualquer ordem, outra intervenção terapêutica, como um anticorpo ou célula ou receptor ou agente manipulado geneticamente, como um agente citotóxico ou terapêutico. As células em algumas modalidades são coadministradas com uma ou mais terapias adicionais agentes clínicos ou em conexão com outra intervenção terapêutica, simultânea ou sequencialmente, em qualquer ordem. Em alguns contextos, as células são coadministradas com outra terapia suficientemente próxima no tempo, de modo que as populações celulares aumentam o efeito de um ou mais agentes terapêuticos adicionais, ou vice-versa. Em algumas modalidades, as células são adminis-

tradas antes de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, as células são administradas após um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes adicionais inclui uma citocina, como IL-2, por exemplo, para melhorar a persistência.

D. Monitorando ou Avaliação de Terapia com Composições Terapêuticas de Células T

1. Avaliação de Farmacocinéticas (PK) de Células Manipuladas Geneticamente, por exemplo, Níveis Máximos de Células e Fatores de Paciente

[00367] Em algumas modalidades, o método inclui avaliação da exposição, número, concentração, persistência e proliferação das células T, por exemplo, células T administradas para a terapia baseada em células T. Em algumas modalidades, o método inclui avaliação da exposição, número ou nível de células T manipuladas geneticamente, por exemplo, células T administradas para a terapia baseada em células T ou subconjunto das mesmas, tais como células $CD3^+$, células $CD4^+$, células $CD8^+$, células $CD3^+$ CAR^+, células $CD4^+$ CAR^+ ou células $CD8^+$ CAR^+. Em algumas modalidades, a exposição, ou expansão prolongada e/ou persistência das células, e/ou alterações nos fenótipos celulares ou na atividade funcional das células, por exemplo, células administradas para imunoterapia, por exemplo, terapia com células T, nos métodos aqui fornecidos, podem ser medidas avaliando as características das células T *in vitro* ou *ex vivo*. Em algumas modalidades, esses ensaios podem ser usados para determinar ou confirmar a função das células T usadas para a imunoterapia, por exemplo terapia de células T, antes ou após a administração da terapia celular aqui fornecida.

[00368] Em alguns aspectos, a exposição, número, concentração, persistência e proliferação estão relacionados a parâmetros farmaco-

cinéticos. Em alguns casos, a farmacocinética pode ser avaliada medindo parâmetros tais como a concentração plasmática máxima (pico) (C_{max}), o tempo de pico (ou seja, quando ocorre a concentração plasmática máxima (C_{max}); T_{max}), a concentração plasmática mínima (ou seja, a concentração plasmática mínima entre doses de um agente terapêutico, por exemplo, células T CAR+; C_{min}), a meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) e a área sob a curva (ou seja, a área sob a curva gerada pela plotagem do tempo versus a concentração plasmática de células T CAR^+ do agente terapêutico; AUC), após administração. A concentração de um agente terapêutico específico, por exemplo, células T CAR+, no plasma após a administração pode ser medida usando qualquer método conhecido na técnica adequado para avaliar as concentrações dos agentes terapêuticos, por exemplo, células T CAR+, em amostras de sangue, ou quaisquer métodos aqui descritos. Por exemplo, métodos baseados em ácido nucleico, como PCR quantitativo (qPCR) ou métodos baseados em citometria de fluxo, ou outros ensaios, como um imunoensaio, ELISA ou ensaios baseados em cromatografia/espectrometria de massa podem ser usados.

[00369] Em algumas modalidades, a farmacocinética (PK) de células administradas, por exemplo, composição de célula T CAR^+, é determinada para avaliar a disponibilidade, por exemplo, biodisponibilidade, das células administradas. Em algumas modalidades, os parâmetros farmacocinéticos determinados das células administradas incluem concentrações plasmáticas máximas (pico) (C_{max}), como C_{max} de células $CD3^+$ CAR^+, células $CD4^+$ CAR^+ e ou células T $CD8^+$ CAR^+; o ponto no tempo no qual a C_{max} é alcançada (T_{max}), tal como a T_{max} das células $CD3^+$ CAR^+, das células $CD4^+$ CAR^+ e ou das células T $CD8^+$ CAR^+ e ou a área sob a curva (AUC), como AUC_{0-28}, de células T $CD3^+$ CAR^+, células $CD4^+$ CAR^+ e ou células $CD8^+$ CAR^+. Em algumas modalidades, o parâmetro farmacocinético é o pico de concentração

de células $CD3^+$ CAR^+ T (células T C_{max} $CD3^+$ CAR^+) ou concentração de células T $CD8^+$ CAR^+ (C_{max} células T $CD8^+$ CAR^+). Em algumas modalidades, o parâmetro farmacocinético é AUC_{0-28}, de células T $CD3^+$ CAR^+, (AUC_{0-28} de células T $CD3^+$ CAR^+) ou AUC_{0-28}, de células T $CD8^+$ CAR^+, (AUC_{0-28} de células T $CD8^+$ CAR^+),

[00370] Em algumas modalidades, "exposição" pode se referir à exposição do corpo de um agente terapêutico, por exemplo, células T CAR+ no plasma (sangue ou soro) após a administração do agente terapêutico durante um certo período de tempo. Em algumas modalidades, a exposição pode ser estabelecida como a área sob a curva de concentração-tempo do agente terapêutico (AUC), conforme determinado por análise farmacocinética após a administração de uma dose do agente terapêutico, por exemplo, células T CAR^+. Em alguns casos, a AUC é expressa em células*dias/μL, para células administradas em terapia celular ou em unidades correspondentes. Em algumas modalidades, a AUC é medida como uma AUC média em uma população de pacientes, como uma amostra de população de pacientes, por exemplo, a AUC média de um ou mais pacientes. Em algumas modalidades, a exposição sistêmica se refere à área sob a curva (AUC) dentro de um determinado período de tempo, por exemplo, do dia 0 ao dia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28 dias ou mais, ou semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais, ou mês 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 ou mais. Em algumas modalidades, a AUC é medida como uma AUC do dia 0 ao dia 28 (AUC_{0-28}) após a administração do agente terapêutico, por exemplo, células T CAR+, incluindo todos os dados medidos e dados extrapolados a partir de parâmetros farmacocinéticos medidos (PK), como uma AUC média de uma população de pacientes, como uma amostra de população de pacientes. Em algumas modalidades, para determinar a exposição ao longo do tempo, por exemplo, AUC por um determinado período de

tempo, como AUC_{0-28}, uma curva de concentração-tempo do agente terapêutico é gerada, usando várias medições ou avaliação de parâmetros, por exemplo, concentrações celulares, sobre tempo, por exemplo, medições realizadas a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21 ou 28 dias ou mais.

[00371] Em algumas modalidades, a presença e/ou quantidade de células que expressam o receptor recombinante (por exemplo, células que expressam CAR administradas para terapia baseada em células T) no objeto após a administração das células T e antes, durante e/ou após a administração da terapia é detectada. Em alguns aspectos, métodos baseados em ácidos nucléicos, como PCR quantitativa (qPCR), são usados para avaliar a quantidade de células que expressam o receptor recombinante (por exemplo, células que expressam CAR administradas para terapia baseada em células T) no sangue ou soro ou amostra de órgão ou tecido (por exemplo, sítio da doença, por exemplo, amostra de tumor) do objeto. Em alguns aspectos, a persistência é quantificada como cópias de DNA ou plasmídeo que codifica o receptor, por exemplo, CAR, por micrograma de DNA, ou como o número de células que expressam receptores, por exemplo, que expressam CAR, por microlitro da amostra, por exemplo, de sangue ou soro ou por número total de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) ou glóbulos brancos ou células T por microlitro da amostra. Em algumas modalidades, os iniciadores ou sonda usados para qPCR ou outros métodos baseados em ácido nucleico são específicos para ligação, reconhecimento e/ou amplificação de ácidos nucleicos que codificam o receptor recombinante e/ou outros componentes ou elementos do plasmídeo e/ou vetor, incluindo elementos reguladores, por exemplo, promotores, elementos reguladores da transcrição e/ou pós-transcrição ou elementos de resposta ou marcadores, por exemplo, marcadores substitutos. Em algumas modalidades, os iniciadores podem ser

específicos para elementos reguladores, como o elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota (WPRE). Em alguns exemplos, a presença e/ou quantidade de células que expressam o receptor recombinante são expressas como cópias da sequência de ácido nucleico (por exemplo, sequência de transgene) que codifica o CAR ou uma sequência de ácido nucleico operacionalmente conectada às sequências que codificam o CAR, por massa de DNA (por exemplo, cópias/µg de DNA); AUC da curva de cópias/µg de DNA ao longo do tempo, cópias máximas ou de pico/µg de DNA após o tratamento ou cópias/µg de DNA no dia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21, ou semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 ou mais pós-tratamento ou começo do mesmo.

[00372] Em algumas modalidades, as células são detectadas no objeto em pelo menos 4, 14, 15, 27 ou 28 dias após a administração das células T, por exemplo, células T que expressam CAR. Em alguns aspectos, as células são detectadas em pelo menos 2, 4 ou 6 semanas após 3, 6 ou 12, 18 ou 24 ou 30 ou 36 meses ou 1, 2, 3, 4, 5, ou mais anos, após a administração das células T, por exemplo, células T que expressam CAR.

[00373] Em algumas modalidades, os níveis de pico e/ou AUC são avaliados e/ou a amostra é obtida do objeto em um tempo que é pelo menos 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias ou 21 dias após o começo da administração das células geneticamente modificadas. Em algumas modalidades, os níveis de pico e/ou AUC são avaliados e/ou a amostra é obtida do objeto em um momento entre 11 e 22 dias, 12 a 18 dias ou 14 a 16 dias, cada uma inclusive, após começo da administração das células geneticamente modificadas.

[00374] A exposição, por exemplo, número ou concentração de células, por exemplo, células T administradas para terapia de células T,

indicativas de expansão e/ou persistência, podem ser indicadas em termos de número máximo ou concentração das células às quais o objeto está exposto, duração células detectáveis ou de células acima de um determinado número ou porcentagem, área sob a curva (AUC) para número ou concentração de células ao longo do tempo e/ou combinações dos mesmos e seus indicadores. Tais resultados podem ser avaliados usando métodos conhecidos, como qPCR para detectar o número de cópias de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante em comparação com a quantidade total de ácido nucleico ou DNA na amostra em particular, por exemplo, sangue, soro, plasma ou tecido, como uma amostra de tumor e/ou ensaios citométricos de fluxo que detectam células que expressam o receptor geralmente usando anticorpos específicos para os receptores. Os ensaios baseados em células também podem ser usados para detectar o número ou porcentagem ou concentração de células funcionais, como células capazes de se ligar e/ou neutralizar e/ou induzir respostas, por exemplo, respostas citotóxicas, contra células da doença ou condição ou que expressam o antígeno reconhecido pelo receptor.

[00375] Em alguns aspectos, o aumento da exposição do objeto às células inclui aumento da expansão das células. Em algumas modalidades, as células que expressam receptores, por exemplo, as células que expressam CAR, expandem no objeto após a administração das células T, por exemplo, células T que expressam CAR.

[00376] Em algumas modalidades, as células que expressam o receptor são detectáveis no soro, plasma, sangue ou tecido, por exemplo, amostra de tumor, do objeto, por exemplo, por um método especificado, como qPCR ou método de detecção baseado em citometria de fluxo, pelo menos 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 ou mais dias após a administração das

células T, por exemplo, células T que expressam CAR, por pelo menos em 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, ou 24 ou mais semanas após a administração das células T, por exemplo, células T que expressam CAR.

[00377] Em alguns aspectos, pelo menos em ou cerca de 1 x 10^2, pelo menos em ou cerca de 1 x 10^3, pelo menos em ou cerca de 1 x 10^4, pelo menos em ou cerca de 1 x 10^5 ou pelo menos em ou cerca de 1 x 10^6 ou pelo menos em ou cerca de 5 x 10^6 ou pelo menos em ou cerca de 1 x 10^7 ou pelo menos em ou cerca de 5 x 10^7 ou pelo menos em ou cerca de 1 x 10^8 que expressam receptores recombinantes, por exemplo, células que expressam CAR, e/ou pelo menos 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ou 500 ou 1000 células que expressam receptores por microlitro, por exemplo, pelo menos 10 por microlitro, são detectáveis ou estão presentes no objeto ou fluido, plasma, soro, tecido ou compartimento do mesmo, como no sangue, por exemplo, sangue periférico ou local da doença, por exemplo, tumor. Em algumas modalidades, esse número ou concentração de células é detectável no objeto por pelo menos em ou cerca de 20 dias, pelo menos em ou cerca de 40 dias ou pelo menos em ou cerca de 60 dias ou pelo menos em ou cerca de 3 dias, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses, ou pelo menos 2 ou 3 anos, após a administração das células T, por exemplo, células T que expressam CAR. Tais números de células podem ser detectados por métodos baseados em PCR quantitativa ou baseados em citometria de fluxo e extrapolação para o número total de células usando métodos conhecidos. Vide, por exemplo, Brentjens *et al.*, *Sci Transl Med.* 2013 5(177), Park et al, Molecular Therapy 15(4):825–833 (2007), Savoldo *et al.*, *JCI* 121(5):1822-1826 (2011), Davila *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338, Davila *et al.*, *Oncoimmunology* 1(9):1577-1583 (2012), Lamers, *Blood* 2011 117:72-82, Jensen *et al.*, *Biol Blood Marrow Transplant* Setembro de 2010; 16(9): 1245–1256,

Brentjens *et al.*, *Blood* 2011 118(18):4817-4828.

[00378] Em alguns aspectos, o número de cópias de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante, por exemplo, número de cópias de vetores, por 100 células, por exemplo, no sangue periférico ou medula óssea ou outro compartimento, conforme medido por imunohistoquímica, PCR e/ou citometria de fluxo, é pelo menos 0,01, pelo menos 0,1, pelo menos 1 ou pelo menos 10, por cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 5 semanas ou pelo menos cerca de 6 semanas, ou pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. 9, 10, 11 ou 12 meses ou pelo menos 2 ou 3 anos após a administração das células, por exemplo, células T que expressam CAR. Em algumas modalidades, o número de cópias do vetor que expressa o receptor, por exemplo CAR, por micrograma de DNA genômico é pelo menos 100, pelo menos 1000, pelo menos 5000, ou pelo menos 10.000, ou pelo menos 15.000 ou pelo menos 20.000 por vez, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas ou pelo menos pelo menos cerca de 4 semanas após a administração das células T, por exemplo, células T que expressam CAR ou pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses ou pelo menos 2 ou 3 anos após a administração.

[00379] Em alguns aspectos, o receptor, por exemplo CAR, expresso pelas células, é detectável por PCR quantitativa (qPCR) ou por citometria de fluxo no objeto, plasma, soro, sangue, tecido e/ou sítio da doença, por exemplo, sítio do tumor, em um momento que seja pelo menos ou cerca de 3 meses, pelo menos em ou cerca de 6 meses, pelo menos em ou cerca de 12 meses, pelo menos em ou cerca de 1 ano, pelo menos em ou cerca de 2 anos, pelo menos em ou cerca de 3 anos ou mais de 3 anos, após a administração das células, por exemplo, após o começo da administração das células T. Em algumas modalidades, a área sob a curva (AUC) para concentração de células que

expressam receptores (por exemplo, CAR-) em um fluido, plasma, soro, sangue, tecido, órgão e/ou sítio da doença, por exemplo é medido o sítio do tumor, do objeto ao longo do tempo após a administração das células T, por exemplo, células T que expressam CAR.

[00380] Também são fornecidos métodos para avaliar a probabilidade de uma resposta ou uma resposta durável. Em algumas modalidades, os métodos envolvem detectar, em uma amostra biológica de um objeto, níveis de pico de um ou mais marcadores inflamatórios e/ou níveis de pico de células geneticamente modificadas compreendendo células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR), em que o objeto foi previamente administrado com uma dose das células geneticamente modificadas para tratar uma doença ou condição. Em algumas modalidades, os métodos envolvem comparar, individualmente, os níveis de pico com um valor limite, determinando assim a probabilidade de que um objeto atinja uma resposta durável à administração das células geneticamente modificadas.

[00381] Em algumas modalidades, é provável que o objeto alcance uma resposta ou uma resposta durável se os níveis de pico de um ou mais marcadores inflamatórios estiverem abaixo de um valor limite e é provável que o objeto não alcance uma resposta durável se os níveis de pico de um ou mais marcadores inflamatórios estiver acima de um valor limite. Em algumas modalidades, é provável que o objeto alcance uma resposta durável se o nível de pico das células geneticamente modificadas estiver dentro de um intervalo terapêutico entre um valor limite mais baixo e um valor limite superior, e é provável que o objeto não alcance uma resposta durável se o nível de pico das células geneticamente modificadas estiver abaixo do valor limite inferior ou acima do valor limite superior.

[00382] Em alguns casos, as modalidades fornecidas envolvem avaliar parâmetros, tal como atributos, fatores, características do paci-

ente e/ou a doença ou condição e/ou expressão de biomarcadores. Em algumas modalidades, os parâmetros avaliados estão associados e/ou correlacionados com parâmetros farmacocinéticos, resposta, resposta durável e/ou desenvolvimento de toxicidade. Em algumas modalidades, os parâmetros incluem fatores ou atributos do paciente. Em algumas modalidades, os parâmetros avaliados estão correlacionados com o fenótipo das composições celulares aqui divulgadas. Em algumas modalidades, os parâmetros avaliados indicam se a composição de saída terá a composição de célula necessária (por exemplo, porcentagem de fenótipos celulares) correlacionada com a sobrevivência livre de progressão e/ou resposta durável. Em algumas modalidades, os parâmetros avaliados podem ser usados para prever a probabilidade de produzir uma composição de saída útil para administração terapêutica. Em algumas modalidades, pacientes com alta carga de doença, por exemplo, aqueles com alta SPD (por exemplo, um valor maior ou igual a 50 cm^2) ou valores de PCR (por exemplo, um valor maior ou igual a 20 mg/L), são menos propensos a produzir composições de saída úteis para administração terapêutica. Em algumas modalidades, pacientes com baixa carga de doença, por exemplo, aqueles com baixa SPD (por exemplo, um valor inferior a 50 cm^2) ou valores de PCR (por exemplo, um valor inferior a 20 mg/L), têm maior probabilidade de produzir composições de saída úteis para administração terapêutica. Em algumas modalidades, os parâmetros incluem atributos, fatores, características da doença ou condição. Em algumas modalidades, os parâmetros são avaliados antes do tratamento, por exemplo, antes da administração da terapia celular. Em algumas modalidades, os parâmetros são avaliados após o tratamento, por exemplo, após a administração de uma ou mais doses da terapia celular.

[00383] Em algumas modalidades, o parâmetro é ou inclui parâmetros farmacocinéticos, por exemplo, concentração plasmática máxima

(pico) (C_{max}), o tempo de pico (isto é, quando a concentração plasmática máxima (C_{max}) ocorre; T_{max}), a concentração plasmática mínima (ou seja, a concentração plasmática mínima entre doses de um agente terapêutico, por exemplo, células T CAR+; C_{min}), a meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) e a área sob a curva (ou seja, a área sob a curva gerada pelo tempo de plotagem versus concentração plasmática das células T CAR+ de agente terapêutico; AUC; como AUC_{0-28}).

[00384] Em algumas modalidades, o parâmetro é ou inclui um ou mais fatores indicativos do estado do paciente e/ou da doença ou condição do paciente. Em algumas modalidades, o parâmetro é indicativo da carga do tumor. Em algumas modalidades, o fator indicativo da carga do tumor é uma medida volumétrica do (s) tumor (s). Em algumas modalidades, a medida volumétrica é uma medida da (s) lesão (s), como tamanho do tumor, diâmetro do tumor, volume do tumor, massa do tumor, carga ou volume do tumor, edema relacionado ao tumor, necrose relacionada ao tumor e/ou número ou extensão de metástases. Em algumas modalidades, a medida volumétrica do tumor é uma medida bidimensional. Por exemplo, em algumas modalidades, a área da (s) lesão (s) é calculada como o produto do diâmetro mais longo e do diâmetro perpendicular mais longo de todos os tumores mensuráveis. Em alguns casos, a medida volumétrica do tumor é uma medida unidimensional. Em alguns casos, o tamanho das lesões mensuráveis é avaliado como o maior diâmetro. Em algumas modalidades, a soma dos produtos de diâmetros (SPD), diâmetros de tumor mais longos (LD), soma dos diâmetros de tumor mais longos (SLD), necrose, volume de tumor, volume de necrose, razão necrose-tumor (NTR), edema peritumoral (TEP) e a relação edema-tumor (ETR) é medido.

[00385] Métodos exemplares para medir e avaliar a carga tumoral incluem aqueles descritos em, por exemplo, Carceller et al., Pediatr Blood Cancer. (2016) 63 (8): 1400-1406 e Eisenhauer et al., Eur J.

Cancer. (2009) 45 (2): 228-247. Em algumas modalidades, o volumétrico é uma soma dos produtos de diâmetros (SPD) medidos determinando a soma dos produtos dos maiores diâmetros perpendiculares de todos os tumores mensuráveis. Em alguns aspectos, o tumor ou lesão é medido em uma dimensão com o maior diâmetro (LD) e/ou determinando a soma dos maiores diâmetros tumorais (SLD) de todas as lesões mensuráveis. Em algumas modalidades, a medida volumétrica do tumor é uma quantificação volumétrica da necrose tumoral, tal como volume de necrose e/ou razão necrose-tumor (NTR), vide Monsky et al., Anticancer Res. (2012) 32 (11): 4951-4961. Em alguns aspectos, a medida volumétrica do tumor é uma quantificação volumétrica do edema relacionado ao tumor, como edema peritumoral (TEP) e/ou razão edema-tumor (ETR). Em algumas modalidades, a medição pode ser realizada usando técnicas de imagem, como tomografia computadorizada (CT), tomografia de emissão de pósitrons (PET) e/ou ressonância magnética (MRI) do objeto.

[00386] Em algumas modalidades, a medida volumétrica é SPD e, em alguns casos, o desenvolvimento de toxicidade, por exemplo, CRS ou NT, está correlacionado com o valor de SPD que está acima de um valor limite. Em algumas modalidades, a medida volumétrica é SPD, e o valor do limite é ou é de cerca de 30 cm^2, é ou é de cerca de 40 cm^2, é ou é de cerca de 50 cm^2, é ou é de cerca de 60 cm^2 ou é ou é de cerca de 70 cm^2. Em algumas modalidades, a medida volumétrica é SPD e o valor do limite é ou é de cerca de 30 cm^2, é ou é de cerca de 40 cm^2, é ou é de cerca de 50 cm^2, é ou é de cerca de 60 cm^2 ou é ou é de cerca de 70 cm^2.

[00387] Em algumas modalidades, a medida volumétrica do tumor é determinada em uma sessão de triagem, como uma avaliação de rotina ou coleta de sangue para confirmar e/ou identificar a condição ou doença no objeto.

[00388] Em alguns aspectos, o parâmetro, por exemplo, medições da carga tumoral, se correlaciona e/ou está associado a parâmetros farmacocinéticos. Em algumas modalidades, o parâmetro, incluindo parâmetros farmacocinéticos, está associado à resposta e/ou resposta durável e/ou a um risco para o desenvolvimento de toxicidade, por exemplo, CRS ou neurotoxicidade (NT).

[00389] Em algumas modalidades, o parâmetro é ou inclui pelo menos um ou um painel de biomarcadores. Em algumas modalidades, a expressão e/ou presença do biomarcador está associada e/ou correlacionada com parâmetros farmacocinéticos, resposta, resposta durável e/ou desenvolvimento de toxicidade. Em algumas modalidades, o parâmetro é comparado a um valor de referência particular, por exemplo, aqueles associados à resposta e/ou resposta durável, e/ou a um risco para o desenvolvimento de toxicidade, por exemplo, CRS ou neurotoxicidade (NT). Em algumas modalidades, os métodos também envolvem a administração de um agente capaz de modular a expansão, proliferação e/ou atividade de células T CAR^+, ao objeto, com base na avaliação dos fatores do paciente e/ou biomarcadores.

[00390] Em alguns aspectos, as modalidades envolvem obter uma amostra biológica para detectar o parâmetro e/ou avaliar a presença de e/ou detectar o parâmetro. Em algumas modalidades, a amostra biológica é obtida geralmente dentro de 4 horas a 12 meses após a administração da terapia celular, ou uma primeira administração ou dose da mesma, ou após o começo de qualquer uma das anteriores, como geralmente dentro ou dentro de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 30, 60 ou 90 ou mais dias, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais semanas ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 ou mais meses, após a administração da terapia celular, ou uma primeira administração ou dose da mesma, ou após o começo de qualquer uma das anteriores. Em algumas modalidades, o

parâmetro é avaliado ou medido em um objeto antes da administração da terapia celular ou logo após a administração da terapia celular, ou uma primeira administração ou dose da mesma, ou após o começo de qualquer um dos itens anteriores, como geralmente dentro de 4 horas a 3 dias após a administração da terapia celular, ou uma primeira administração ou dose da mesma, ou após o começo de qualquer um dos itens anteriores, como geralmente dentro ou cerca de 1 dia, 2 dias ou 3 dias após a administração da célula terapia, ou uma primeira administração ou dose da mesma, ou após o começo de qualquer uma das anteriores. Em algumas modalidades, o parâmetro é avaliado ou medido. Em algumas modalidades, o parâmetro é avaliado geralmente dentro de 4 horas a 12 meses após a administração da terapia celular, ou uma primeira administração ou dose da mesma, ou após o começo de qualquer um dos itens anteriores, como geralmente dentro ou dentro de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 30, 60 ou 90 ou mais dias, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais semanas, ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 48 ou mais meses, após a administração da terapia celular, ou uma primeira administração ou dose da mesma, ou após o começo de qualquer uma das anteriores.

[00391] Em alguns aspectos, o parâmetro, por exemplo, fator do paciente e/ou biomarcador, se correlaciona e/ou está associado a parâmetros farmacocinéticos. Em algumas modalidades, o parâmetro, incluindo parâmetros farmacocinéticos, está associado à resposta e/ou resposta durável e/ou a um risco para o desenvolvimento de toxicidade, por exemplo, CRS ou neurotoxicidade (NT).

[00392] Em algumas modalidades, o parâmetro é um biomarcador. Em algumas modalidades, o parâmetro é ou inclui a expressão do biomarcador e/ou o número, concentração e/ou porcentagem de células que expressam um biomarcador particular. Em algumas modalidades,

o parâmetro inclui biomarcadores ou cada biomarcador em um painel que compreende uma pluralidade de biomarcadores. Em algumas modalidades, o biomarcador é ou compreende uma citocina e/ou outro fator sérico ou sanguíneo, como qualquer um como aqui descrito. Em algumas modalidades, o biomarcador ou cada biomarcador em um painel é uma citocina, que, em alguns casos, pode ser uma quimiocina. Em algumas modalidades, os biomarcadores ou cada biomarcador em um painel compreendem um receptor solúvel. Em algumas modalidades, os biomarcadores ou cada biomarcador em um painel compreendem uma proteína sérica solúvel. Biomarcadores exemplares ou painel de biomarcadores são aqui descritos.

[00393] Em algumas modalidades, o parâmetro é ou inclui níveis e/ou concentrações de um analito sanguíneo. Em algumas modalidades, o parâmetro é ou inclui níveis e/ou concentrações de um marcador inflamatório. Em algumas modalidades, o analito sanguíneo e/ou marcador inflamatório é ou inclui níveis e/ou concentrações de interleucina-7 (IL-7), IL-15, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1a). Em algumas modalidades, o analito sanguíneo e/ou marcador inflamatório é ou inclui níveis e/ou concentrações de IL-6, IL-10, IL-16, interferon gama (IFN-γ), fator alfa de necrose tumoral (TNF-α), MIP-1a, MIP-1β, proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) e quimiocina de motivo C-X-C 10 (CXCL10). Em algumas modalidades, o analito sanguíneo e/ou marcador inflamatório é ou inclui níveis e/ou concentrações de ferritina, proteína C reativa (PCR), dímero D (produto de degradação da fibrina), IL-6, IL-10, IL- 15, IL-16, TNF-α, MIP-1a e MIP-1β. Em algumas modalidades, o analito sanguíneo e/ou marcador inflamatório é ou inclui níveis e/ou concentrações de LDH, Ferritina, PCR, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IFN-α2, MCP-1 e/ou MIP-1β. Em algumas modalidades, o analito sanguíneo e/ou marcador inflamatório é ou inclui níveis e/ou concentrações de PCR, amiloide sérico A1 (SAA-1),

IL-2, IL-6, IL-10, IL-15, TNF- a, MIP-1a, MIP-1β, MCP-1, CXCL10 e ligando de quimiocina Motivo C-C 13 (CCL13). Em algumas modalidades, o analito sanguíneo e/ou marcador inflamatório é ou inclui níveis e/ou concentrações de LDH, ferritina, PCR, dímero D, SAA-1, IL-6, IL-10, IL-15, IL-16, TNF-α, IFN-γ e/ou MIP-1a.

[00394] Em algumas modalidades, um marcador inflamatório é ou inclui o nível ou a presença de proteína C reativa (PCR), taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS), albumina, ferritina, microglobulina β2 (β2-M) ou lactato desidrogenase (LDH) é detectado e avaliado. Em algumas modalidades, o marcador inflamatório é avaliado usando um ensaio imune. Por exemplo, um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), imunoensaio enzimático (EIA), radioimunoensaio (RIA), ressonância plasmônica de superfície (SPR), Western Blot, ensaio de fluxo lateral, imuno-histoquímica, conjunto de proteínas ou imuno-PCR (iPCR) podes ser usados para detectar o marcador inflamatório. Em algumas modalidades, o uso dos artigos de fabricação inclui a detecção de um marcador inflamatório indicativo de carga tumoral. Em alguns casos, a análise ou avaliação de um marcador inflamatório é realizada por citometria de fluxo. Em alguns casos, o reagente é uma proteína solúvel que liga o marcador inflamatório. Em algum exemplo, o reagente é uma proteína que se liga à proteína C reativa (PCR), taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS), albumina, ferritina, microglobulina β2 (β2-M) ou lactato desidrogenase (LDH).

[00395] Em algumas modalidades, o biomarcador, por exemplo, marcador inflamatório é ou inclui proteína C-reativa (PCR). Em algumas modalidades, a PCR é avaliada usando um ensaio imunossorvente ligado à enzima in vitro para obter uma medida quantitativa da PCR humana a partir de uma amostra como soro, plasma ou sangue. Em alguns exemplos, a PCR é detectada usando um ensaio imunossorvente ligado à enzima humano (ELISA). Em algumas modalidades, o

biomarcador, por exemplo, marcador inflamatório é ou inclui a taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR). Em algumas modalidades, a ESR é avaliada medindo a distância (em milímetros por hora) que os glóbulos vermelhos caíram após a separação do plasma em uma pipeta ou tubo vertical. Em algumas modalidades, o biomarcador é ou inclui albumina. Em alguns aspectos, a albumina é avaliada usando um teste colorimétrico ou um ensaio imunossorvente enzimático in vitro. Em alguns exemplos, a albumina é detectada usando um ensaio imunossorvente ligado à enzima humano (ELISA). Em algumas modalidades, o biomarcador, por exemplo, marcador inflamatório, é ou inclui ferritina ou microglobulina β2. Em algumas modalidades, a ferritina ou a microglobulina β2 é avaliada usando um imunoensaio ou detectada usando um ELISA. Em alguns aspectos, o biomarcador, por exemplo, marcador inflamatório, é ou inclui lactato desidrogenase (LDH), e o LDH é avaliado usando um teste colorimétrico ou um ensaio imunossorvente ligado à enzima in vitro.

[00396] Em algumas modalidades, o parâmetro é LDH e, em alguns casos, o desenvolvimento de toxicidade, por exemplo, CRS ou NT, está correlacionado com o valor de LDH que está acima de um valor limite. Em algumas modalidades, o marcador inflamatório é LDH e o valor limite é ou é de cerca de 300 unidades por litro, é ou é de cerca de 400 unidades por litro, é ou é de cerca de 500 unidades por litro ou é ou é cerca de 600 unidades por litro.

[00397] Em algumas modalidades, o parâmetro ou biomarcador é LDH. Em algumas modalidades, o biomarcador é LDH e o valor limite é 500 U/L ou superior. Em algumas modalidades, o parâmetro ou biomarcador é SPD. Em algumas modalidades, o parâmetro é SPD e o valor do limite é ou é de cerca de 50 cm^2 ou superior. Em algumas modalidades, o biomarcador ou parâmetros são SPD e LDH, e os valores limite são SPD de 50 cm^2 ou superior e LDH de 500 U/L ou superi-

or. Em algumas modalidades, os biomarcadores ou parâmetros estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento de CRS ou NT. Em algumas modalidades, uma medição do parâmetro ou marcador que está acima do valor limite, por exemplo, SPD de 50 cm^2 ou superior e LDH de 500 U/L ou superior, está associada com 2-, 3-, 4-, 5, 6, 7, 8, 9, 10 vezes ou mais de um risco aumentado de desenvolver CRS ou NT, como qualquer CRS ou NT de classificação. Em algumas modalidades, uma medição do parâmetro ou marcador que está abaixo do valor limite, por exemplo, SPD menor que 500 cm^2 e LDH menor que 500 U/L, está associada com aproximadamente 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8, 9, 10 vezes ou mais de um risco diminuído de desenvolver CRS ou NT, como qualquer CRS ou NT de grau.

2. Avaliação da resposta, Eficácia e Sobrevivência

[00398] Em alguns aspectos, os métodos envolvem a determinação da associação ou relação entre a dose de células tendo um fenótipo celular particular, por exemplo, células $CCR7^+$, e resposta, eficácia e/ou sobrevivência em objetos administrados com tais doses de células.

[00399] Em alguns aspectos, as taxas de resposta em objetos, como objetos com LNH, são baseadas nos critérios de Lugano. (Cheson et al., (2014) JCO 32 (27): 3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2: 323–338; Cheson, BD (2015) Chin Clin Oncol 4 (1): 5). Em alguns aspectos, a avaliação da resposta utiliza qualquer método clínico, hematológico e/ou molecular. Em alguns aspectos, a resposta avaliada usando os critérios de Lugano envolve o uso de tomografia computadorizada (CT) por tomografia de emissão de pósitrons (PET) e/ou CT, conforme apropriado. As avaliações de PET-CT podem adicionalmente compreender o uso de fluorodeoxiglucose (FDG) para linfomas ávidos por FDG. Em alguns aspectos, onde o PET-CT será usado para avaliar a resposta em histologias ávidas por FDG, uma escala de 5 pontos

pode ser usada. Em alguns aspectos, a escala de 5 pontos compreende os seguintes critérios: 1, sem captação acima do plano de fundo; 2, captação ≤ mediastino; 3, captação > mediastino, mas ≤ fígado; 4, captação moderada > fígado; 5, captação acentuadamente superior do que no fígado e/ou novas lesões; X, é improvável que novas áreas de captação estejam relacionadas ao linfoma.

[00400] Em alguns aspectos, uma resposta completa (CR), conforme descrito usando os critérios de Lugano, envolve uma resposta metabólica completa e uma resposta radiológica completa em vários sítios mensuráveis. Em alguns aspectos, esses sítios incluem linfonodos e sítios extralinfáticos, em que uma CR é descrita como uma pontuação de 1, 2 ou 3 com ou sem uma massa residual na escala de 5 pontos, quando a PET-CT é usada. Em alguns aspectos, no anel de Waldeyer ou em sítios extranodais com alta captação fisiológica ou com ativação no baço ou na medula (por exemplo, com quimioterapia ou fatores estimulatórios de colônias mieloides), a captação pode ser maior que o mediastino e/ou o fígado normais. Nessa circunstância, a resposta metabólica completa pode ser inferida se a captação nos sítios de envolvimento inicial não for maior do que o tecido normal circundante, mesmo que o tecido tenha uma captação fisiológica alta. Em alguns aspectos, a resposta é avaliada nos linfonodos usando a CT, em que uma CR é descrita como nenhum sítio extralinfático da doença e os nodos/massas nodais alvo devem regredir para ≤ 1,5 cm no maior diâmetro transversal de uma lesão (LDi). Outros sítios de avaliação incluem a medula óssea em que a avaliação baseada em PET-CT deve indicar uma falta de evidência de doença ávida por FDG na medula e uma avaliação baseada em CT deve indicar uma morfologia normal que, se indeterminada, deve ser negativa para IHC. Outros sítios podem incluir a avaliação do aumento de órgãos, que deve regredir ao normal. Em alguns aspectos, lesões não mensuradas e

novas lesões são avaliadas, as quais, no caso de CR, devem estar ausentes (Cheson et al., (2014) JCO 32 (27): 3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4 (1): 5).

[00401] Em alguns aspectos, uma resposta parcial (PR), conforme descrita usando os critérios de Lugano, envolve uma resposta metabólica e/ou radiológica parcial em vários sítios mensuráveis. Em alguns aspectos, esses sítios incluem linfonodos e sítios extralinfáticos, em que uma PR é descrita como uma pontuação de 4 ou 5 com captação reduzida em comparação com a linha de base e a massa residual de qualquer tamanho, quando PET-CT é usada. Nesse ínterim, esses achados podem indicar a resposta da doença. No final do tratamento, esses achados podem indicar doença residual. Em alguns aspectos, a resposta é avaliada nos linfonodos usando CT, em que uma PR é descrita como uma redução de ≥ 50% na SPD de até 6 nodos mensuráveis alvo e sítios extranodais. Se uma lesão for muito pequena para ser medida na CT, 5 mm × 5 mm são atribuídos como valor padrão; se a lesão não estiver mais visível, o valor é 0 mm × 0 mm; para um nodo > 5 mm × 5 mm, mas menor que o normal, as medidas reais são usadas para o cálculo. Outros sítios de avaliação incluem a medula óssea em que a avaliação baseada em PET-CT deve indicar uma captação residual superior à captação na medula normal, mas reduzida em comparação com a linha de base (captação difusa compatível com alterações reativas da quimioterapia permitida). Em alguns aspectos, se houver alterações focais persistentes na medula no contexto de uma resposta nodal, deve-se considerar uma avaliação mais aprofundada com ressonância magnética ou biópsia ou uma varredura com intervalo. Em alguns aspectos, outros sítios podem incluir a avaliação do aumento de órgãos, onde o baço deve ter regredido em > 50% em comprimento além do normal. Em alguns aspectos, são avaliadas lesões

não medidas e novas lesões, que no caso de RP devem estar ausentes/normais, regredidas, mas sem aumento. Nenhuma resposta/doença estável (DP) ou doença progressiva (PD) também pode ser medida usando PET-CT e/ou avaliações baseadas em TC. (Cheson et al., (2014) JCO 32 (27): 3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2: 323–338; Cheson, BD (2015) Chin Clin Oncol 4 (1): 5).

[00402] Em alguns aspectos, a sobrevida livre de progressão (PFS) é descrita como o período de tempo durante e após o tratamento de uma doença, como o câncer, em que um objeto vive com a doença, mas não piora. Em alguns aspectos, a resposta objetiva (OR) é descrita como uma resposta mensurável. Em alguns aspectos, a taxa de resposta objetiva (ORR) é descrita como a razão de pacientes que alcançaram CR ou PR. Em alguns aspectos, a sobrevida global (OS) é descrita como o período de tempo a partir da data do diagnóstico ou do início do tratamento de uma doença, como o câncer, em que os objetos diagnosticados com a doença adicionalmente estão vivos. Em alguns aspectos, a sobrevida livre de eventos (EFS) é descrita como o período de tempo após o término do tratamento de um câncer para que o objeto permaneça livre de certas complicações ou eventos que o tratamento pretendia impedir ou atrasar. Esses eventos podem incluir o retorno do câncer ou o aparecimento de certos sintomas, como dor óssea por câncer que se espalhou para o osso ou morte.

[00403] Em algumas modalidades, a medida da duração da resposta (DOR) inclui o tempo desde a documentação da resposta do tumor até a progressão da doença. Em algumas modalidades, o parâmetro para avaliar a resposta pode incluir resposta durável, por exemplo, resposta que persiste após um período de tempo desde o começo da terapia. Em algumas modalidades, a resposta durável é indicada pela taxa de resposta em aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 ou 24 meses após o começo da terapia. Em algumas modalida-

des, a resposta é durável por mais de 3 meses ou mais de 6 meses.

[00404] Em alguns aspectos, o critério RECIST é usado para determinar a resposta objetiva do tumor; em alguns aspectos, em tumores sólidos. (Eisenhauer et al., European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247). Em alguns aspectos, o critério RECIST é usado para determinar a resposta objetiva do tumor para lesões alvo. Em alguns aspectos, uma resposta completa, conforme determinada pelo critério RECIST, é descrita como o desaparecimento de todas as lesões alvo e qualquer linfonodo patológico (alvo ou não alvo) deve ter redução no eixo curto para < 10 mm. Em outros aspectos, uma resposta parcial, determinada pelo critério RECIST, é descrita como uma redução de pelo menos 30% na soma dos diâmetros das lesões alvo, tomando como referência os diâmetros da soma da linha de base. Em outros aspectos, a doença progressiva (PD) é descrita como um aumento de pelo menos 20% na soma dos diâmetros das lesões alvo, tomando como referência a menor soma no estudo (isso inclui a soma da linha de base, se for a menor no estudo). Além do aumento relativo de 20%, a soma também deve demonstrar um aumento absoluto de pelo menos 5 mm (em alguns aspectos, o aparecimento de uma ou mais novas lesões também é considerado progressão). Em outros aspectos, a doença estável (SD) não é descrita nem como retração suficiente para se qualificar para PR nem aumento suficiente para se qualificar para PD, tomando como referência os menores diâmetros de soma enquanto no estudo.

[00405] Em alguns aspectos, a administração de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidas, geralmente reduz ou impede a expansão ou carga da doença ou condição no objeto. Por exemplo, onde a doença ou condição é um tumor, os métodos geralmente reduzem o tamanho do tumor, volume, metástase, porcentagem de blastos na medula óssea ou cân-

cer detectável molecularmente e/ou melhoram o prognóstico ou a sobrevivência ou outro sintoma associado à carga do tumor.

[00406] A carga da doença pode abranger um número total de células da doença no objeto ou em um órgão, tecido ou fluido corporal do objeto, tal como o órgão ou tecido do tumor ou outro local, por exemplo, o que indicaria metástase. Por exemplo, as células tumorais podem ser detectadas e/ou quantificadas no sangue ou na medula óssea no contexto de certas neoplasias hematológicas. A carga da doença pode incluir, em algumas modalidades, a massa de um tumor, o número ou extensão de metástases e/ou a porcentagem de células blásticas presentes na medula óssea.

[00407] Em algumas modalidades, um objeto tem leucemia. A extensão da carga da doença pode ser determinada pela avaliação da leucemia residual no sangue ou na medula óssea.

[00408] Em alguns aspectos, as taxas de resposta em objetos, como objetos com LLC, são baseadas nos critérios de resposta do Workshop Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crônica (IWCLL) (Hallek et al., Blood 2008, 15 de junho; 111 (12):5446-5456). Em alguns aspectos, esses critérios são descritos a seguir: remissão completa (CR), que em alguns aspectos requer ausência de linfócitos clonais do sangue periférico por imunofenotipagem, ausência de linfadenopatia, ausência de hepatomegalia ou esplenomegalia, ausência de sintomas constitucionais e contagem sanguínea satisfatória; remissão completa com recuperação medular incompleta (CRi), que em alguns aspectos é descrita como RC acima, mas sem hemograma; remissão parcial (PR), que em alguns aspectos é descrita como ≥ 50% de queda na contagem de linfócitos, ≥ 50% de redução na linfadenopatia ou ≥ 50% de redução no fígado ou baço, juntamente com melhora nas contagens sanguíneas periféricas; doença progressiva (PD), que em alguns aspectos é descrita como aumento de ≥ 50% na contagem de

linfócitos para > 5 x10^9/L, aumento de ≥ 50% na linfadenopatia, aumento de ≥ 50% no tamanho do fígado ou baço, transformação de Richter ou novas citopenias devido a CLL; e doença estável, que em alguns aspectos é descrita como não atendendo aos critérios de CR, RCi, PR ou PD.

[00409] Em algumas modalidades, o objeto exibe uma resposta durável após a administração de uma terapia celular compreendendo mais umas doses unitárias (ou dose unitária) das células da composição. Em algumas modalidades, uma resposta durável é um período de tempo, geralmente em meses, durante o qual um objeto exibe uma resposta parcial ou completa como resultado do tratamento. Em algumas modalidades, a resposta durável coincide com uma melhoria na sobrevida global.

[00410] Em algumas modalidades, o objeto exibe sobrevivência livre de progressão (PFS) após a administração de uma terapia celular que compreende mais umas doses unitárias (ou dose unitária) das células da composição. Em algumas modalidades, a sobrevivência livre de progressão é determinada medindo o período de tempo após o tratamento ou o início do tratamento (por exemplo, após a administração de uma terapia celular compreendendo mais umas doses unitárias (ou dose unitária) das células da composição) em que a doença não piora. Em algumas modalidades, quando a doença é câncer, a sobrevivência livre de progressão refere-se ao câncer que não piora ou se espalha. Em algumas modalidades, a sobrevivência livre de progressão coincide com uma resposta durável.

[00411] Em algumas modalidades, os objetos exibem um CR ou OR se, dentro de 1 mês após a administração da dose das células, os linfonodos no objeto tiverem tamanho menor ou igual a 20 mm, menor ou igual a 10 mm ou menor que ou igual a 10 mm.

[00412] Em algumas modalidades, um clone de índice da CLL não

é detectado na medula óssea do objeto (ou na medula óssea de mais de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais dos objetos tratados de acordo com os métodos. Em algumas modalidades, um clone de índice da CLL é avaliado por sequenciamento profundo de IgH. Em algumas modalidades, o clone de índice não é detectado em um momento que é igual ou próximo a, ou pelo menos igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 ou 24 meses após a administração das células.

[00413] Em algumas modalidades, um objeto exibe doença morfológica se houver blastos maiores ou iguais a 5% na medula óssea, por exemplo, como detectado por microscopia de luz, como blastos maiores ou iguais a 10% na medula óssea, maior ou igual a 20% de blastos na medula óssea, maior ou igual a 30% de blastos na medula óssea, maior ou igual a 40% de blastos na medula óssea ou maior ou igual a 50% de blastos na medula óssea. Em algumas modalidades, um objeto exibe remissão completa ou clínica se houver menos de 5% de blastos na medula óssea.

[00414] Em algumas modalidades, um objeto pode exibir remissão completa, mas uma pequena proporção de células leucêmicas residuais morfologicamente indetectáveis (por técnicas de microscopia de luz) está presente. Diz-se que um objeto exibe doença residual mínima (MRD) se o objeto exibir menos de 5% de blastos na medula óssea e exibir câncer molecularmente detectável. Em algumas modalidades, o câncer molecularmente detectável pode ser avaliado usando qualquer uma de uma variedade de técnicas moleculares que permitam a detecção sensível de um pequeno número de células. Em alguns aspectos, essas técnicas incluem ensaios de PCR, que podem determinar rearranjos únicos de genes de receptores de células Ig/T ou transcritos de fusão produzidos por translocações cromossômicas. Em algumas modalidades, a citometria de fluxo pode ser usada para identificar células cancerígenas com base em imunofenótipos específicos de leu-

cemia. Em algumas modalidades, a detecção molecular de câncer pode detectar até 1 célula de leucemia em 100.000 células normais. Em algumas modalidades, um objeto exibe MRD que é detectável molecularmente se pelo menos ou maior que 1 célula de leucemia em 100.000 células for detectada, como por PCR ou citometria de fluxo. Em algumas modalidades, a carga de doença de um objeto é molecularmente indetectável ou MRD^-, de modo que, em alguns casos, nenhuma célula de leucemia é capaz de ser detectada no objeto usando técnicas de PCR ou citometria de fluxo.

[00415] Em alguns aspectos, a doença ou condição persiste após a administração da primeira dose e/ou administração da primeira dose não é suficiente para erradicar a doença ou condição no objeto.

[00416] Em algumas modalidades, o método reduz a carga da doença ou condição, por exemplo, número de células tumorais, tamanho do tumor, duração da sobrevivência do paciente ou sobrevida livre de eventos, em maior grau e/ou por um período maior de tempo em comparação com a redução que seria observada com um método comparável usando um regime de dosagem alternativo, tal como aquele em que o objeto recebe um ou mais agentes terapêuticos alternativos e/ou aquele em que o objeto não recebe uma dose de células e/ou um agente de eliminação de linfonodos de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidos. Em algumas modalidades, uma dose alternativa de células é referida como uma composição de referência. Em algumas modalidades, a composição de referência contém um número não definido de células de um fenótipo particular e/ou células de um fenótipo particular que não estão em uma razão definida particular de acordo com as modalidades aqui fornecidas. Em algumas modalidades, a composição de referência é aquela em que está contida uma maior frequência ou número de células T com um fenótipo efetor ou diferenciado. Em algu-

mas modalidades, a carga de uma doença ou condição no objeto é detectada, avaliada ou medida. A carga de doença pode ser detectada em alguns aspectos pela detecção do número total de doenças ou células associadas a doenças, por exemplo, células tumorais, no objeto, ou em um órgão, tecido ou fluido corporal do objeto, como sangue ou soro. Em alguns aspectos, a sobrevivência do objeto, a sobrevivência dentro de um certo período de tempo, a extensão da sobrevivência, a presença ou a duração da sobrevida livre de eventos ou livre de sintomas, ou sobrevida livre de recaída, é avaliada. Em algumas modalidades, qualquer sintoma da doença ou condição é avaliado. Em algumas modalidades, a medida da carga de doença ou condição é especificada.

[00417] Em algumas modalidades, a taxa de sobrevivência livre de eventos ou taxa de sobrevivência geral do objeto é melhorada pelos métodos, em comparação com outros métodos, por exemplo, métodos nos quais o objeto recebe um ou mais agentes terapêuticos alternativos e/ou aquele em que o objeto não recebe uma dose de células (por exemplo, recebe uma composição de referência) e/ou um agente de eliminação de linfonodos de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidos. Por exemplo, em algumas modalidades, a taxa ou probabilidade de sobrevida livre de eventos para objetos tratados pelos métodos pelos 6 meses após a dose é maior que cerca de 40%, maior que cerca de 50%, maior que cerca de 60%, maior que cerca de 70%, maior que cerca de 80%, maior que cerca de 90% ou maior que cerca de 95%. Em alguns aspectos, a taxa de sobrevivência geral é maior que cerca de 40%, maior que cerca de 50%, maior que cerca de 60%, maior que cerca de 70%, maior que cerca de 80%, maior que cerca de 90% ou maior que cerca de 95%. Em algumas modalidades, o objeto tratado com os métodos exibe sobrevivência livre de eventos, sobrevivência livre de reca-

ída ou sobrevivência por pelo menos 6 meses ou pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 anos. Em algumas modalidades, o tempo para progressão é melhorado, tal como um tempo para progressão de mais de cerca de 6 meses ou pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 anos.

[00418] Em algumas modalidades, após o tratamento pelo método, a probabilidade de recaída é reduzida em comparação com outros métodos, por exemplo, métodos nos quais o objeto recebe um ou mais agentes terapêuticos alternativos e/ou nos quais o objeto não recebe uma dose de células (por exemplo, recebe uma composição de referência) e/ou um agente de eliminação de linfonodos, de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidas. Por exemplo, em algumas modalidades, a probabilidade de recaída em 6 meses após a primeira dose é menor que cerca de 80%, menor que cerca de 70%, menor que cerca de 60%, menor que cerca de 50%, menor que cerca de 40%, menor cerca de 30%, menos de cerca de 20% ou menos de cerca de 10%.

[00419] Em alguns casos, a farmacocinética das células administradas, por exemplo, células transferidas adotivamente, é determinada para avaliar a disponibilidade, por exemplo, biodisponibilidade das células administradas. Os métodos para determinar a farmacocinética das células transferidas adotivamente podem incluir retirar sangue periférico de objetos aos quais foram administradas células manipuladas geneticamente e determinar o número ou razão das células manipuladas geneticamente no sangue periférico. As abordagens para selecionar e/ou isolar células podem incluir o uso de anticorpos específicos de receptores de antígeno quiméricos (CAR) (por exemplo, Brentjens et al., Sci. Transl. Med. 2013 mar; 5 (177): 177ra38) Proteína L (Zheng et al., J. Transl. Med. Fev. de 2012; 10:29), marcadores de epítopo, tal como sequências Strep-Tag, introduzidos diretamente em sítios específicos no CAR, por meio dos quais os reagentes de ligação para

Strep-Tag são usados para avaliar diretamente o CAR (Liu et al. (2016) Nature Biotechnology, 34: 430; Pub. De pedido de patente internacional No. WO2015095895) e anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a um polipeptídeo CAR (vide Pub. De pedido de patente internacional No. WO2014190273). Genes marcadores extrínsecos podem, em alguns casos, ser utilizados em conexão com terapias celulares modificadas para permitir a detecção ou seleção de células e, em alguns casos, também para promover o suicídio celular. Um receptor de fator de crescimento epidérmico truncado (EGFRt) em alguns casos pode ser coexpresso com um transgene de interesse (um CAR ou TCR) em células transduzidas (vide, por exemplo, a Patente U.S. No. 8.802.374). EGFRt pode conter um epítopo reconhecido pelo anticorpo cetuximab (Erbitux®) ou outro anticorpo terapêutico anti-EGFR ou molécula de ligação, que pode ser usado para identificar ou selecionar células que foram manipuladas geneticamente com o construto EGFRt e outro receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou para eliminar ou separar células que expressam o receptor. Vide Patente U.S. No. 8.802.374 e Liu et al., Nature Biotech. Abril de 2016; 34 (4): 430-434).

[00420] Em algumas modalidades, o número de células T CAR^+ em uma amostra biológica obtida do paciente, por exemplo, sangue, pode ser determinado em um período de tempo após a administração da terapia celular, por exemplo, para determinar a farmacocinética das células. Em algumas modalidades, o número de células T CAR^+, opcionalmente células T CAR^+ $CD8^+$ e/ou células T CAR^+ $CD4^+$, detectáveis no sangue do objeto, ou na maioria dos objetos tratados pelo método, é maior que 1 célula por µL, superior a 5 células por µL ou superior a 10 células por µL.

3. Avaliação de Toxicidade

[00421] Em alguns aspectos, os métodos envolvem a determinação

da associação ou relação entre a dose de células com um fenótipo celular particular, por exemplo, células CCR7$^+$ e resultado de toxicidade, por exemplo, desenvolvimento da síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou neurotoxicidade (NT) em objetos administrados com tais doses de células.

[00422] Em alguns aspectos, o resultado tóxico é ou está associado ou é indicativo de síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou CRS grave (sCRS). CRS, por exemplo, sCRS, pode ocorrer em alguns casos após a terapia e administração de células T adotivas a objetos de outros produtos biológicos. Vide Davila et al., Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013); Grupp et al., N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); e Kochenderfer et al., Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78.

[00423] Normalmente, CRS é causada por uma resposta imune sistêmica exagerada mediada por, por exemplo, células T, células B, células NK, monócitos e/ou macrófagos. Tais células podem liberar uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. As citocinas podem desencadear uma resposta inflamatória aguda e/ou induzir danos aos órgãos endoteliais, que podem resultar em vazamento microvascular, insuficiência cardíaca ou morte. CRS grave e com risco de vida pode levar a infiltração pulmonar e lesão pulmonar, insuficiência renal ou coagulação intravascular disseminada. Outras toxicidades graves e com risco de vida podem incluir toxicidade cardíaca, dificuldade respiratória, toxicidade neurológica e/ou insuficiência hepática. Em alguns aspectos, febre, especialmente febre alta (≥ 38,5 ºC ou ≥ 101,3 ºF), está associada à CRS. Em alguns casos, características ou sintomas da CRS imitam a infecção. Em algumas modalidades, a infecção também é considerada em objetos que apresentam sintomas de CRS, e o monitoramento por culturas e antibioticote-

rapia empírica pode ser administrado. Outros sintomas associados à CRS podem incluir disfunção cardíaca, síndrome do desconforto respiratório do adulto, insuficiência renal e/ou hepática, coagulopatias, coagulação intravascular disseminada e síndrome do vazamento capilar.

[00424] CRS pode ser tratada usando terapia anti-inflamatória, como uma terapia anti-IL-6, por exemplo, anticorpo anti-IL-6, por exemplo, tocilizumab ou antibióticos ou outros agentes, conforme descrito. Resultados, sinais e sintomas da CRS são conhecidos e incluem os aqui descritos. Em algumas modalidades, onde um regime de dosagem ou administração particular afeta ou não afeta um dado resultado, sinal ou sintoma associado à CRS, resultados, sinais e sintomas particulares e/ou quantidades ou graus dos mesmos podem ser especificados.

[00425] No contexto de administrar células que expressam CAR, CRS geralmente ocorre 6 a 20 dias após a infusão de células que expressam um CAR. Vide Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78. Em alguns casos, a CRS ocorre menos de 6 dias ou mais de 20 dias após a infusão de células T CAR. A incidência e o tempo de CRS podem estar relacionados aos níveis basais de citocinas ou carga tumoral no momento da infusão. Comumente, CRS envolve níveis séricos elevados de interferon (IFN)-γ, fator de necrose tumoral (TNF)-α e/ou interleucina (IL)-2. Outras citocinas que podem ser rapidamente induzidas na CRS são IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10.

[00426] Resultados exemplares associados à CRS incluem febre, rigidez, calafrios, hipotensão, dispneia, síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), encefalopatia, elevação de ALT/AST, insuficiência renal, distúrbios cardíacos, hipóxia, distúrbios neurológicos e morte. As complicações neurológicas incluem delírio, atividade convulsiva, confusão, dificuldade em encontrar palavras, afasia e/ou obturação. Outros resultados relacionados à CRS incluem fadiga, náusea,

dor de cabeça, convulsão, taquicardia, mialgias, erupção cutânea, síndrome do vazamento vascular agudo, comprometimento da função hepática e insuficiência renal. Em alguns aspectos, a CRS está associada a um aumento de um ou mais fatores como ferritina sérica, dímero d, aminotransferases, lactato desidrogenase e triglicerídeos, ou hipofibrinogenemia ou hepatoesplenomegalia.

[00427] Em algumas modalidades, os resultados associados à CRS incluem um ou mais dos seguintes: febre persistente, por exemplo, febre de uma temperatura especificada, por exemplo, maior que em ou cerca de 38 graus Celsius, por dois ou mais, por exemplo, três ou mais, por exemplo, quatro ou mais dias ou por pelo menos três dias consecutivos; febre maior ou igual a 38 graus Celsius; elevação de citocinas, como uma alteração máxima de desdobramento, por exemplo, de pelo menos cerca de 75, em comparação com os níveis de pré-tratamento de pelo menos duas citocinas (por exemplo, pelo menos dois do grupo que consiste em interferon gama (IFNγ), GM -CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalkine e IL-5 e/ou fator alfa de necrose tumoral (TNFα)) ou uma alteração máxima de desdobramento, por exemplo, de pelo menos em ou cerca de 250 pelo menos uma de tais citocinas; e/ou pelo menos um sinal clínico de toxicidade, como hipotensão (por exemplo, conforme medido por pelo menos um vasoconstritor intravenoso); níveis de hipóxia (por exemplo, níveis plasmáticos de oxigênio (PO_2) inferiores a cerca de 90%); e/ou um ou mais distúrbios neurológicos (incluindo alterações do estado mental, obtundação e convulsões). Em algumas modalidades, a neurotoxicidade (NT) pode ser observada simultaneamente com CRS.

[00428] Resultados exemplares relacionados à CRS incluem níveis séricos aumentados ou altos de um ou mais fatores, incluindo citocinas e quimiocinas e outros fatores associados à CRS. Resultados exemplares incluem adicionalmente aumentos na síntese ou secreção de

um ou mais desses fatores. Essa síntese ou secreção pode ser pela célula T ou uma célula que interage com a célula T, como uma célula imune inata ou célula B.

[00429] Em algumas modalidades, os fatores séricos associados à CRS ou resultados relacionados à CRS incluem citocinas inflamatórias e/ou quimiocinas, incluindo interferon gama (IFN-γ), TNF-a, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (PIM)-1, fator alfa de necrose tumoral (TNFα), IL -6 e IL-10, IL-1β, IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, fracktalkine e/ou IL-5. Em algumas modalidades, o fator ou resultado inclui a proteína C reativa (PCR). Além de ser um fator de risco precoce e facilmente mensurável para a CRS, PCR também é um marcador para a expansão celular. Em algumas modalidades, os objetos que são medidos para ter altos níveis de PCR, como ≥ 15 mg/dL, têm CRS. Em algumas modalidades, os objetos que são medidos para ter altos níveis de PCR não têm CRS. Em algumas modalidades, uma medida de CRS inclui uma medida de PCR e outro fator indicativo de CRS.

[00430] Em algumas modalidades, uma ou mais citocinas ou quimiocinas inflamatórias são monitoradas antes, durante ou após o tratamento com CAR. Em alguns aspectos, as uma ou mais citocinas ou quimiocinas incluem IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Rα, fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF) ou proteína inflamatória de macrófagos (PIM). Em algumas modalidades, IFN-γ, TNF-α e IL-6 são monitorados.

[00431] Critérios de CRS que parecem correlacionarem-se com o início da CRS para prever quais pacientes têm maior risco de desenvolver sCRS (vide Davilla et al. Science translational medicine. 2014; 6 (224): 224ra25) têm sido desenvolvidos. Os fatores incluem febre, hipóxia, hipotensão, alterações neurológicas, níveis séricos elevados de

citocinas inflamatórias, como um conjunto de sete citocinas (IFNγ, IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalkine e GM-CSF) cuja elevação induzida pelo tratamento pode se correlacionar bem com a carga tumoral pré-tratamento e com os sintomas de sCRS. Outras diretrizes sobre o diagnóstico e tratamento da CRS são conhecidas (vide, por exemplo, Lee et al, Blood. 2014; 124 (2): 188-95). Em algumas modalidades, os critérios que refletem o grau de CRS são os detalhados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 2: Classificação Exemplar de Critérios para CRS

Grau	**Descrição de Sintomas**
1 Leve	Não tem risco de vida, requer apenas tratamento sintomático, tais como antipiréticos e antieméticos (por exemplo, febre, náusea, fadiga, dor de cabeça, mialgias, mal-estar)
2 Moderado	Requer e responde a intervenções moderadas: • Exigência de oxigênio < 40%, ou • Hipotensão responsiva a fluidos ou baixa dose de um único vasoconstritor, ou • Toxicidade para órgãos de grau 2 (por CTCAE v4.0)
3 Severo	Requer e responde a intervenções agressivas: • Exigência de oxigênio ≥ 40%, ou • Hipotensão que requer alta dose de um vasoconstritor único (por exemplo, norepinefrina ≥ 20 µg/kg/min, dopamina ≥ 10 µg/kg/min, fenilefrina ≥ 200 µg/kg/min ou epinefrina ≥ 10 µg/kg/min), ou • Hipotensão que requer múltiplos vasoconstritores (por exemplo, vasopressina^{+} um dos agentes acima, ou vasoconstritores combinados equivalentes a ≥ 20 µg/kg/min de norepinefrina), ou

Tabela 2: Classificação Exemplar de Critérios para CRS	
Grau	**Descrição de Sintomas**
	Toxicidade para órgãos de grau 3 ou transaminite de grau 4 (por CTCAE v4.0)
4 Risco de vida	Risco de vida: • Exigência de suporte de ventilador, ou • Toxicidade para órgãos de grau 4 (excluindo transaminite)
5 Fatal	Morte

[00432] Em alguns aspectos, um critério que reflete o grau de CRS é o detalhado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Classificação Exemplar de Critérios para CRS				
Sintomas/Sinais	**Grau 1 (leve)**	**Grau 2 (moderado)**	**Grau 3 (severo)**	**Grau 4 (risco de vida)**
		Grau de CRS é definido pelo sintoma mais severo (excluindo febre)		
Temperatura ≥ 38.5°C/101.3°F	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Qualquer
Pressão sanguínea sistólica ≤ 90 mm Hg	N/A	Responde a fluido ou vasoconstritor de baixa dose única	Necessita de alta dose ou múltiplas de vasoconstritor	Risco de vida
Necessita oxigênio para alcançar SaO_2 > 90%	N/A	FiO2 < 40%	FiO_2 ≥ 40%	Needs ventilator support
Toxicidade de órgão	N/A	Grau 2	Grau 3 oo transaminite	Grau 4 (excluindo transaminite)

[00433] Em algumas modalidades, um objeto é considerado como desenvolvendo "CRS grave" ("sCRS") em resposta a ou secundário à

administração de uma terapia celular ou dose de células da mesma, se, após a administração, o objeto exibir: (1) febre de pelo menos 38 graus Celsius por pelo menos três dias; (2) elevação de citocinas que inclui (a) uma alteração de desdobramento máxima de pelo menos 75 por pelo menos dois dos sete grupos seguintes de sete citocinas em comparação com o nível imediatamente após a administração: interferon gama (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalkine e IL-5 e/ou (b) uma alteração de desdobramento máxima de pelo menos 250 para pelo menos um dos sete grupos de sete citocinas a seguir ao nível imediatamente após a administração: interferon gama (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalkine e IL-5; e (c) pelo menos um sinal clínico de toxicidade, como hipotensão (exigindo pelo menos um vasoconstritor intravenoso) ou hipóxia (PO_2 < 90%) ou um ou mais distúrbios neurológicos (incluindo alterações do estado mental, obtundação e/convulsões). Em algumas modalidades, a CRS grave inclui uma CRS com grau 3 ou superior, como estabelecido na Tabela 2 ou na Tabela 3.

[00434] Em algumas modalidades, os resultados associados à CRS grave ou CRS de grau 3 ou superior, como o grau 4 ou superior, incluem um ou mais dos seguintes: febre persistente, por exemplo, febre de uma temperatura especificada, por exemplo, maior que em ou cerca de 38 graus Celsius, por dois ou mais, por exemplo, três ou mais, por exemplo, quatro ou mais dias ou por pelo menos três dias consecutivos; febre maior ou cerca de 38 graus Celsius; elevação de citocinas, como uma alteração máxima de desdobramento, por exemplo, de pelo menos cerca de 75, em comparação com os níveis de pré-tratamento de pelo menos duas citocinas (por exemplo, pelo menos dois do grupo que consiste em interferon gama (IFNγ), GM -CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fracktalkine e IL-5 e/ou fator alfa de necrose tumoral (TNFα)) ou uma alteração máxima de desdobramento, por exemplo, de pelo menos em

ou cerca de 250 pelo menos uma de tais citocinas; e/ou pelo menos um sinal clínico de toxicidade, como hipotensão (por exemplo, conforme medido por pelo menos um vasoconstritor intravenoso); níveis de hipóxia (por exemplo, níveis plasmáticos de oxigênio (PO_2) inferiores a ou cerca de 90%); e/ou um ou mais distúrbios neurológicos (incluindo alterações do estado mental, obtundação e convulsões). Em algumas modalidades, a CRS grave inclui a CRS que requer gerenciamento ou cuidados na terapia intensiva unidade (UTI).

[00435] Em algumas modalidades, a CRS, como a CRS grave, abrange uma combinação de (1) febre persistente (febre de pelo menos 38 graus Celsius por pelo menos três dias) e (2) um nível sérico de PCR de pelo menos em ou cerca de 20 mg/dL. Em algumas modalidades, a CRS engloba hipotensão que requer o uso de dois ou mais vasoconstritores ou falha respiratória que requer ventilação mecânica. Em algumas modalidades, a dosagem de vasoconstritores é aumentada em uma segunda administração ou subsequente.

[00436] Em algumas modalidades, a CRS grave ou a CRS de grau 3 engloba um aumento na alanina aminotransferase, um aumento na aspartato aminotransferase, calafrios, neutropenia febril, dor de cabeça, disfunção ventricular esquerda, encefalopatia, hidrocefalia e/ou tremor.

[00437] O método de medir ou detectar os vários resultados pode ser especificado.

[00438] Em alguns aspectos, o resultado tóxico é ou está associado à neurotoxicidade. Em algumas modalidades, os sintomas associados a um risco clínico de neurotoxicidade incluem confusão, delírio, afasia expressiva, obtundação, mioclonia, letargia, estado mental alterado, convulsões, atividade de ataques epiléticos, ataques epiléticos (opcionalmente como confirmado pelo eletroencefalograma [EEG]), elevação níveis de beta amiloide (Aβ), níveis elevados de glutamato e níveis

elevados de radicais de oxigênio. Em algumas modalidades, a neurotoxicidade é classificada com base na gravidade (por exemplo, usando uma escala de grau 1-5 (vide, por exemplo, Guido Cavaletti e Paola Marmiroli *Nature Reviews Neurology* 6, 657-666 (dezembro de 2010); National Cancer Institute - Critérios comuns de toxicidade versão 4.03 (NCI-CTCAE v4.03).

[00439] Em alguns casos, os sintomas neurológicos podem ser os primeiros sintomas de sCRS. Em algumas modalidades, os sintomas neurológicos são vistos iniciando 5 a 7 dias após a infusão da terapia celular. Em algumas modalidades, a duração das alterações neurológicas pode variar de 3 a 19 dias. Em alguns casos, a recuperação das alterações neurológicas ocorre após a resolução de outros sintomas de sCRS. Em algumas modalidades, o tempo ou o grau de resolução das alterações neurológicas não é acelerado pelo tratamento com anti-IL-6 e/ou esteroide (s).

[00440] Em algumas modalidades, um objeto é considerado como desenvolvendo "neurotoxicidade grave" em resposta ou secundária à administração de uma terapia celular ou dose de células da mesma, se, após a administração, o objeto exibir sintomas que limitam o autocuidado (por exemplo, tomar banho, vestir e despir, alimentar, usar o banheiro, tomar medicamentos) dentre: 1) sintomas de neuropatia motora periférica, incluindo inflamação ou degeneração dos nervos motores periféricos; 2) sintomas de neuropatia sensorial periférica, incluindo inflamação ou degeneração dos nervos sensoriais periféricos, disestesia, tais como distorção da percepção sensorial, resultando em uma sensação anormal e desagradável, neuralgia, como intensa sensação dolorosa ao longo de um nervo ou grupo de nervos e/ou parestesia, como distúrbios funcionais dos neurônios sensoriais, resultando em sensações cutâneas anormais de formigamento, dormência, pressão, frio e calor na ausência de estímulo. Em algumas modalidades, a neu-

rotoxicidade grave inclui neurotoxicidade com um grau de 3 ou superior, como estabelecido na Tabela 4.

Tabela 4: Cristérios de Classificação Exemplar para neurotoxidade	
Grau	**Descrição de Sintomas**
1 Assintomático ou leve	Leve ou sintomas assintomáticos
2 Moderado	Presença de sintomas que limitam as atividades instrumentais da vida diária (ADL), tal como preparar refeições, fazer compras ou comprar roupas, usar o telefone, administrar dinheiro
3 Severo	Presença de sintomas que limitam ADL de autocuidado, tais como tomar banho, vestir-se e despir-se, alimentar-se, usar o banheiro, tomar medicamentos
4 Risco de Vida	Sintomas potencialmente fatais, que requerem intervenção urgente
5 Fatal	Morte

[00441] Em algumas modalidades, os métodos reduzem os sintomas associados à CRS ou neurotoxicidade em comparação com outros métodos. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos reduzem sintomas, resultados ou fatores associados à CRS, incluindo sintomas, resultados ou fatores associados à CRS grave ou CRS de grau 3 ou superior, em comparação com outros métodos. Por exemplo, os objetos tratados de acordo com os presentes métodos podem não ter sintomas detectáveis e/ou apresentar resultados ou fatores de CRS reduzidos, por exemplo. CRS grave ou CRS de grau 3 ou superior, como qualquer uma descrita, por exemplo, estabelecida na Tabela 1 ou Tabela 2. Em algumas modalidades, os objetos tratados de acordo com os presentes métodos podem ter sintomas reduzidos de neurotoxicidade, como fraqueza ou dormência nos membros, perda de memória, visão e/ou intelecto, comportamentos obsessivo incontrolável e/ou compulsivo, delírios, dor de cabeça, problemas cognitivos e compor-

tamentais, incluindo perda de controle motor, deterioração cognitiva e disfunção autonômica do sistema nervoso e disfunção sexual, em comparação com objetos tratados por outros métodos. Em algumas modalidades, os objetos tratados de acordo com os presentes métodos podem ter sintomas reduzidos associados à neuropatia motora periférica, neuropatia sensorial periférica, disetesia, neuralgia ou parestesia.

[00442] Em algumas modalidades, os métodos reduzem os resultados associados à neurotoxicidade, incluindo danos ao sistema nervoso e/ou cérebro, como a morte de neurônios. Em alguns aspectos, os métodos reduzem o nível de fatores associados à neurotoxicidade, como beta-amiloide (Aβ), glutamato e radicais de oxigênio.

[00443] Em algumas modalidades, o resultado da toxicidade é uma toxicidade limitadora de dose (DLT). Em algumas modalidades, o resultado tóxico é uma toxicidade limitadora de dose. Em algumas modalidades, o resultado tóxico é a ausência de uma toxicidade limitadora de dose. Em algumas modalidades, uma toxicidade limitadora de dose (DLT) é definida como qualquer toxicidade de grau 3 ou superior, avaliada por quaisquer diretrizes conhecidas ou publicadas para avaliar a toxicidade particular, como qualquer uma descrita acima e incluindo os Critérios de Terminologia Comum para Eventos Adversos do Instituto Nacional de Câncer (NCI) (CTCAE) versão 4.0.

[00444] Em algumas modalidades, a baixa taxa, risco ou probabilidade de desenvolver uma toxicidade, por exemplo CRS ou neurotoxicidade ou CRS grave ou neurotoxicidade, por exemplo, CRS ou neurotoxicidade de grau 3 ou superior, observada com a administração de uma dose de células T de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidas, permite a administração da terapia celular em nível ambulatorial. Em algumas modalidades, a administração da terapia celular, por exemplo, a dose

de células T (por exemplo, células T CAR+), de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidos, é realizada em nível ambulatorial ou não requer admissão do paciente no hospital, como admissão para o hospital que exige uma pernoite.

[00445] Em alguns aspectos, os objetos administrados com a terapia celular, por exemplo, dose de células T (por exemplo, células T CAR+) de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidos, incluindo objetos tratados em regime ambulatorial, não são administrados com intervenção para tratar qualquer toxicidade antes ou com administração da dose celular, a menos ou até que o objeto exiba um sinal ou sintoma de uma toxicidade, tal como uma neurotoxicidade ou CRS. Agentes exemplares para tratamento, atraso, atenuação ou melhoria de uma toxicidade são descritos aqui.

[00446] Em algumas modalidades, se um objeto administrado com a terapia celular, por exemplo, a dose de células T (por exemplo, células T CAR+), incluindo objetos tratados em regime ambulatorial, exibe febre que o objeto recebe ou é instruído a receber ou ser administrado com um tratamento para reduzir a febre. Em algumas modalidades, a febre no objeto é caracterizada como uma temperatura corporal do objeto que é (ou é medida em) a ou acima de um certo nível ou temperatura limite. Em alguns aspectos, a temperatura limite é aquela associada a pelo menos uma febre baixa, com pelo menos uma febre moderada e/ou com pelo menos uma febre de alto grau. Em algumas modalidades, a temperatura limite é uma temperatura ou faixa particular. Por exemplo, a temperatura limite pode ser em ou cerca de 38, 39, 40, 41 ou 42 graus Celsius, ou pelo menos, ou em ou cerca de 38 graus Celsius e/ou uma faixa de 38 graus Celsius a em ou cerca de 39 graus Celsius, uma faixa em ou cerca de 39 graus Celsius em ou cerca de

40 graus Celsius, uma faixa em ou cerca de 40 graus Celsius a em ou cerca de 41 graus ou cerca de 41 graus ou uma faixa em ou cerca de 41 graus Celsius a em ou cerca de 42 graus Celsius.

[00447] Em algumas modalidades, o tratamento projetado para reduzir a febre inclui tratamento com um antipirético. Um antipirético pode incluir qualquer agente, por exemplo, composto, composição ou ingrediente, que reduza a febre, como um dentre qualquer número de agentes conhecidos por ter efeitos antipiréticos, como NSAIDs (tal como ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno e nimesulida), salicilatos, tais como aspirina, salicilato de colina, salicilato de magnésio e salicilato de sódio, paracetamol, acetaminofeno, metamizol, nabumetona, fenaxona, antipirina, febrifugadores. Em algumas modalidades, o antipirético é acetaminofeno. Em algumas modalidades, o acetaminofeno pode ser administrado na dose de 12,5 mg/kg por via oral ou intravenosa até a cada quatro horas. Em algumas modalidades, é ou compreende ibuprofeno ou aspirina.

[00448] Em algumas modalidades, se a febre é uma febre sustentada, o objeto recebe um tratamento alternativo para o tratamento da toxicidade, como qualquer um descrito na Seção II abaixo. Para objetos tratados ambulatorialmente, o objeto é instruído a retornar ao hospital se o objeto tiver e/ou for determinado a ou tiver febre sustentada. Em algumas modalidades, o objeto tem, e/ou é determinado ou considerado como tendo uma febre sustentada se ele exibir uma febre igual ou acima da temperatura limite relevante e onde a febre ou a temperatura corporal do objeto não for reduzida, ou não for reduzida em ou em mais do que uma quantidade especificada (por exemplo, em mais de 1 ºC e geralmente não flutua em cerca de, ou não mais do que cerca de, 0,5 ºC, 0,4 ºC, 0,3 ºC ou 0,2 ºC), após um tratamento especificado, tal como um tratamento concebido para reduzir a febre, tal como o tratamento com um antipirético, por exemplo, NSAID ou salicilatos, por

exemplo, ibuprofeno, acetaminofeno ou aspirina. Por exemplo, um objeto é considerado como tendo uma febre sustentada se ele exibir ou for determinado a exibir uma febre de pelo menos em ou cerca de 38 ou 39 graus Celsius, que não é reduzida nem é reduzida por não mais do que em ou cerca de 0,5 ºC, 0,4 ºC, 0,3 ºC ou 0,2 ºC, ou em ou cerca de 1%, 2%, 3%, 4% ou 5%, durante um período de 6 horas, durante um período de 8 horas, ou durante um período de 12 horas, ou durante um período de 24 horas, mesmo após o tratamento com antipiréticos, como o acetaminofeno. Em algumas modalidades, a dosagem do antipirético é uma dosagem normalmente eficaz em objetos para reduzir a febre ou febre de um tipo particular, tal como febre associada a uma infecção bacteriana ou viral, por exemplo, uma infecção localizada ou sistêmica.

[00449] Em algumas modalidades, o objeto tem, e/ou é determinado ou considerado como tendo uma febre sustentada se ele exibir uma febre igual ou acima da temperatura limite relevante e onde a febre ou temperatura corporal do objeto não flutua por cerca de, ou mais de cerca de 1 ºC, e geralmente não flutua por cerca de, ou por mais de cerca de 0,5 ºC, 0,4 ºC, 0,3 ºC ou 0,2 ºC. Essa ausência de flutuação acima ou em determinada quantidade geralmente é medida durante um determinado período de tempo (como um período de 24 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 3 horas ou 1 de período de tempo, que pode ser medido a partir do primeiro sinal de febre ou da primeira temperatura acima do limite indicado). Por exemplo, em algumas modalidades, um objeto é considerado ou determinado como exibindo febre sustentada se ele exibir uma febre de pelo menos em ou cerca de, ou pelo menos em ou cerca de 38 ou 39 graus Celsius, que não flutua na temperatura por mais que em ou cerca de 0,5 ºC, 0,4 ºC, 0,3 ºC ou 0,2 ºC, durante um período de 6 horas, durante um período de 8 horas, ou durante um período de 12 horas ou durante um período de 24 horas.

[00450] Em algumas modalidades, a febre é uma febre sustentada; em alguns aspectos, o objeto é tratado no momento em que um objeto foi determinado como tendo uma febre sustentada, como dentro de uma, duas, três, quatro, cinco seis ou menos horas de tal determinação ou da primeira determinação após a terapia inicial com potencial para induzir a toxicidade, como a terapia celular, como a dose de células T, por exemplo, células T CAR^+.

[00451] Em algumas modalidades, uma ou mais intervenções ou agentes para o tratamento da toxicidade, tal como terapias de direcionamento de toxicidade, são administrados no momento em que ou imediatamente após o qual o objeto é determinado ou confirmado como (como é o primeiro determinado ou confirmado como) exibindo febre sustentada, por exemplo, conforme medido de acordo com qualquer uma das modalidades mencionadas acima. Em algumas modalidades, as uma ou mais terapias de direcionamento de toxicidade são administradas dentro de um certo período de tempo de tal confirmação ou determinação, como 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas ou 8 horas disso.

II MÉTODOS DE GERAÇÃO DE COMPOSIÇÕES DE CÉLULAS MANIPULADAS GENETICAMENTE

[00452] Entre as modalidades fornecidas, estão métodos para gerar ou produzir uma composição de célula que contém células geneticamente modificadas. Em algumas modalidades, os métodos produzem uma composição de célula de saída contendo células que expressam um receptor recombinante, como um CAR, que em alguns casos é uma composição de célula T terapêutica, como para uso de acordo com métodos para o tratamento de um objeto tendo uma doença ou condições. Em algumas modalidades, as características de uma ou mais etapas do processo para produzir uma composição de célula manipulada geneticamente podem resultar em composições de saída

enriquecidas para células com certas características ou fenótipos, conforme descrito, como enriquecido em comparação com a característica do fenótipo nas células de um material de partida usado para produzir as composições de células manipuladas geneticamente. Em algumas modalidades, composições de célula T manipuladas geneticamente ou terapêuticas, como composições de saída geradas ou produzidas por um método aqui fornecido, exibem fenótipo e atributos funcionais associados a um produto de célula T menos diferenciada ou a um produto enriquecido com subconjuntos de células T do tipo puras ou de memória central e/ou um produto de célula T mais funcionalmente ativas, que, em alguns casos, se correlacionam com propriedades ou respostas farmacocinéticas aperfeiçoadas, como durabilidade de resposta e/ou sobrevida livre de progressão, quando administradas a objetos. Também são fornecidas composições terapêuticas de células T, por exemplo, composições de saída, compreendendo células T que expressam um receptor recombinante no qual as células da composição são enriquecidas ou exibem uma certa porcentagem de células com um ou mais atributos fenotípicos ou funcionais, conforme descrito, incluindo atributos associados a um produto de célula T menos diferenciada ou um produto enriquecido em subconjuntos de células T do tipo puras ou de memória central e/ou um produto de células T funcionalmente ativas.

[00453] Em algumas modalidades, os métodos envolvem a geração ou produção de uma composição de célula (por exemplo, composição terapêutica de células T) por meio de um processo que inclui uma ou mais etapas de processamento ou processamento adicionais, como etapas para criopreservação, isolamento, separação, seleção, ativação ou estimulação, transdução, cultivo, expansão, lavagem, suspensão, diluição, concentração e/ou formulação das células. Em algumas modalidades, os métodos de geração ou produção de uma composição

de célula (por exemplo, composição terapêutica de células T) incluem isolar células de um objeto, preparar, processar, cultivar sob uma ou mais condições estimulantes. Em algumas modalidades, o método inclui etapas de processamento realizadas em uma ordem na qual: células, por exemplo células primárias (por exemplo, células T), são primeiro isoladas, tal como selecionadas ou separadas, de uma amostra biológica (por exemplo, amostra de sangue, amostra de aférese, amostra de leucaferese); as células selecionadas são incubadas com partículas de vetores virais para transdução, opcionalmente após uma etapa de estimular as células isoladas na presença de um reagente de estimulação; cultivar as células transduzidas, tal como expandir as células; formular as células transduzidas em uma composição e introduzir a composição em um recipiente fornecido. Em algumas modalidades, a composição de célula é administrada ao paciente, por exemplo, como uma dose unitária. Em algumas modalidades, a composição de célula compreendendo as células manipuladas geneticamente geradas é reintroduzida no mesmo objeto, antes ou após a criopreservação. Em algumas modalidades, as células durante uma ou mais etapas das etapas, incluindo antes e/ou após o isolamento, seleção, transdução e/ou cultivo, as células podem ser crioconservadas e subsequentemente descongeladas.

[00454] Em algumas modalidades, as uma ou mais etapas de processamento podem incluir uma ou mais de (a) lavagem de uma amostra biológica contendo células (por exemplo, uma amostra de sangue total, uma amostra de buffy coat, uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), uma amostra de células T não fracionada, uma amostra de linfócitos, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aférese ou um produto de leucaferese), (b) isolar, por exemplo selecionar, a partir da amostra, um subconjunto ou população desejada de células (por exemplo, células $CD4^+$ e/ou $CD8^+$), por exem-

plo, por incubação de células com um reagente de seleção ou imunoafinidade para separação baseada em imunoafinidade; c) incubar as células isoladas, como células selecionadas, com partículas de vetores virais, (d) crescer, cultivar ou expandir as células usando os métodos descritos e (e) formular as células transduzidas, como em um tampão farmaceuticamente aceitável, crioconservante ou outro meio adequado. Em algumas modalidades, os métodos podem adicionalmente incluir (e) células estimulantes, expondo as células a condições estimulantes, que podem ser realizadas antes, durante e/ou subsequentemente à incubação das células com partículas de vetores virais. Em algumas modalidades, uma ou mais etapas adicionais de lavagem ou suspensão, como diluição, concentração e/ou troca de tampão de células, também podem ser realizadas antes ou depois de qualquer uma das etapas acima. Em alguns aspectos, a composição de célula manipulada geneticamente resultante (por exemplo, composição terapêutica de células T) é introduzida em um ou mais recipientes. Em algumas modalidades, a composição de célula é administrada ao paciente, por exemplo como uma dose unitária.

[00455] Em alguns aspectos, os métodos podem ser empregados para gerar uma composição de célula com propriedades, características e/ou características particulares, como fenótipos celulares, por exemplo, a presença e/ou expressão de um marcador de superfície e/ou a ausência ou falta de expressão de um marcador de superfície, das células na composição para administração. Em alguns aspectos, as propriedades, recursos e/ou características particulares, por exemplo, fenótipos celulares, estão associadas a um resultado desejado na terapia, por exemplo, uma resposta ou resultado de segurança desejado e/ou exibem parâmetros farmacocinéticos desejados associados a esses resultados desejados. Em algumas modalidades, os métodos também incluem determinação e/ou geração de uma dose unitária, tal

como uma dose unitária da composição de célula gerada usando os métodos aqui descritos, por exemplo, para administração a um objeto. Em alguns aspectos, as composições celulares e/ou doses unitárias das mesmas, produzidas de acordo com os métodos aqui descritos, podem ser usadas para aplicações terapêuticas, por exemplo, para administração a um objeto para terapia baseada em células, por exemplo, incluindo quaisquer métodos de tratamento descritos aqui. Em alguns aspectos, as composições de células e/ou dose unitária descritas neste documento podem alcançar ou ser associadas a resultados de terapia desejados particulares, por exemplo, uma resposta desejada ou resultado de segurança e/ou exibir parâmetros farmacocinéticos desejados associados a esses resultados desejados. Em algumas modalidades, os métodos para gerar uma composição de célula incluem gerar ou produzir uma composição de entrada para uso nas etapas aqui descritas para gerar ou produzir uma composição de célula. Em alguns aspectos, os métodos envolvem gerar ou produzir uma composição de entrada. Em algumas modalidades, os um ou dois métodos para gerar uma composição de entrada são ou incluem etapas de processamento que podem incluir uma ou mais de (a) lavagem de uma amostra biológica contendo células (por exemplo, uma amostra de sangue total, uma amostra de buffy coat, um sangue periférico amostra de células mononucleares (PBMC), amostra de células T não fracionadas, amostra de linfócitos, amostra de glóbulos brancos, produto de aférese ou produto de leucaférese), (b) isolar, por exemplo selecionar, a partir da amostra, um subconjunto ou população desejada de células (por exemplo, células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$), por exemplo, por incubação de células com um reagente de seleção ou imunoafinidade para separação baseada em imunoafinidade. Em algumas modalidades, a composição de entrada é gerada através de um processo que inclui uma ou mais etapas de processamento, tal como etapas para o

isolamento, separação, seleção. Assim, em algumas modalidades, a composição de entrada é gerada nas primeiras etapas de um processo geral para gerar ou produzir uma composição de célula. Em alguns aspectos, as células para manipulação usando os métodos, tal como as células na composição de entrada, são quaisquer células descritas aqui, por exemplo, na Seção II.A. Em alguns aspectos, a composição de entrada é gerada com base em um número ou porcentagem alvo de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ obtidas a partir de um objeto para terapia, que expressam, por exemplo, expressam na superfície da célula, ou não expressam, um ou mais marcadores associados a certos fenótipos celulares, incluindo marcadores associados ou indicativos de um fenótipo celular menos diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula de memória. Em alguns aspectos, a composição de entrada contém uma porcentagem alvo de células T que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em algumas modalidades, a composição de entrada contém um número ou porcentagem alvo (por exemplo, em, pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais) de células T (por exemplo, células $CD4^+$ e $CD8^+$) que não expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3 ativada, Anexina V).

[00456] Em alguns aspectos, a composição de entrada está sujeita a manipulação genética, por exemplo, pela introdução de um ou mais agentes compreendendo um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante (por exemplo, um receptor de antígeno quimérico; CAR) ou uma porção do mesmo e/ou outras moléculas, tal como quaisquer polinucleotídeos ou ácidos nucleicos, ou um ou mais agentes contendo um polinucleotídeo aqui descrito, por exemplo, na Seção II.C.3. Em alguns aspectos, as células na composição de entrada são manipula-

das geneticamente através da introdução de um ou mais agentes e/ou polinucleotídeos, tal como os aqui descritos, por exemplo, na Seção II. C.3 Em algumas modalidades, a composição de entrada é estimulada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, incubando as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, a referida estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células. Em algumas modalidades, a estimulação pode ser realizada usando qualquer um dos métodos de estimulação aqui descritos, por exemplo, na Seção II.B. Em algumas modalidades, a composição de entrada é usada em qualquer uma das etapas de processamento ou processamento adicional para gerar ou produzir uma composição de célula.

[00457] Em alguns aspectos, os métodos produzem uma composição de saída compreendendo células geneticamente modificadas, por exemplo, células T manipuladas geneticamente que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em alguns aspectos, a composição de saída contém uma razão definida, frequência e/ou número de células manipuladas geneticamente que expressam, por exemplo, expressam na superfície da célula ou não expressam, um ou mais marcadores associados a determinados fenótipos celulares, incluindo marcadores associados ou indicativos de um fenótipo celular menos diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula de memória. Em alguns aspectos, a composição de saída contém uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante ($receptor^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T $receptor^+/CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T $receptor^+/CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T $receptor^+/CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

Em algumas modalidades, a composição de saída contém células T que não expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3, Anexina V). Em algumas modalidades, a composição de saída contém um número ou porcentagem alvo (por exemplo, em, pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais) de células T que não expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3, Anexina V). Em algumas modalidades, a composição de saída contém um número alvo ou porcentagem de células T que produzem citocinas após estimulação. Em alguma modalidade, a estimulação é específica do antígeno do receptor recombinante (por exemplo, CAR). Em algumas modalidades, a estimulação não é específica do antígeno do receptor recombinante (por exemplo, CAR), por exemplo, estimulação envolvendo PMA/ionomicina. Em algumas modalidades, as citocinas produzidas são ou incluem IL-2, TNFα e/ou IFNg. Em algumas modalidades, as citocinas produzidas são ou incluem IL-2 e/ou TNFα. Em alguns aspectos, uma composição de saída desejada, por exemplo, contendo uma razão definida de células com base em certas características e/ou fenótipos, pode ser gerada pelos métodos aqui descritos.

[00458] Em algumas modalidades, os métodos também envolvem, antes de gerar a composição de entrada, fornecer ou isolar, determinar o número, número por volume, número por peso e/ou porcentagem das células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam células T CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em algumas modalidades, o método inclui determinar o número, número por volume, número por peso e/ou porcentagem de células T (por exemplo, células T $CD4^+$, $CD8^+$) que não expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3, Anexina V)

[00459] Em modalidades particulares, a manipulação genética é ou

inclui a transfecção ou transdução de células da composição de entrada para introduzir um agente contendo um ácido nucleico, por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, por exemplo, um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em algumas modalidades, a geração de uma composição de célula de saída inclui uma ou mais etapas de ativação ou estimulação de células da composição de entrada; manipular geneticamente, transduzir ou transfectar as células da composição de entrada; e/ou expandir as células transfectadas; resultando assim na composição de célula de saída com uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/$CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição. Em algumas modalidades, as uma ou mais etapas resultam em uma composição de célula de saída contendo um número alvo ou porcentagem de células T que produzem citocinas após estimulação. Em algumas modalidades, as citocinas produzidas são ou incluem IL-2, TNFα e/ou IFNg. Em algumas modalidades, as citocinas produzidas são ou incluem IL-2 e/ou TNFα.

[00460] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos são realizados de modo que uma, mais ou todas as etapas na preparação de células para uso clínico, por exemplo, na terapia celular adotiva, sejam realizadas sem expor as células a condições não estéreis e sem a necessidade de usar uma sala ou armário estéril. Em algumas modalidades de tal processo, as células são isoladas, separadas ou selecionadas, transduzidas, lavadas, opcionalmente ativadas ou estimuladas e formuladas, tudo dentro de um sistema fechado. Em alguns aspectos

desse processo, as células são expressas a partir de um sistema fechado e introduzidas em um ou mais dos vasos biomateriais. Em algumas modalidades, os métodos são realizados de forma automatizada. Em algumas modalidades, uma ou mais das etapas são realizadas além do sistema ou dispositivo fechado.

[00461] Em algumas modalidades, um sistema fechado é usado para realizar uma ou mais das outras etapas de processamento de um método para fabricar, gerar ou produzir uma terapia celular. Em algumas modalidades, uma ou mais ou todas as etapas de processamento, por exemplo, isolamento, seleção e/ou enriquecimento, processamento, incubação em conexão com transdução e manipulação, e as etapas de formulação são realizadas usando um sistema, dispositivo ou aparelho em um sistema integrado ou independente e/ou de maneira automatizada ou programável. Em alguns aspectos, o sistema ou aparelho inclui um computador e/ou programa de computador em comunicação com o sistema ou aparelho, que permite ao usuário programar, controlar, avaliar o resultado e/ou ajustar vários aspectos do processamento, isolamento, etapas de manipulação e formulação. Em um exemplo, o sistema é um sistema conforme descrito no Pedido de Patente Internacional, Número de Publicação WO2009/072003, ou US 20110003380 A1. Em um exemplo, o sistema é um sistema conforme descrito no Número da Publicação Internacional WO2016/073602.

A. Isolamento ou Seleção de Células de Amostras

[00462] Em algumas modalidades, as etapas de processamento incluem isolamento de células ou composições das amostras biológicas, tal como aquelas obtidas ou derivadas de um objeto, como um tendo uma doença ou condição específica ou que precisa de uma terapia celular ou qual terapia celular será administrada. Em alguns aspectos, o objeto é um humano, tal como um paciente que necessita de uma intervenção terapêutica específica, tal como a terapia celular ado-

tiva para a qual as células estão sendo isoladas, processadas e/ou manipuladas geneticamente. Por conseguinte, as células em algumas modalidades são células primárias, por exemplo, células humanas primárias. Em algumas modalidades, as células compreendem células T $CD4^+$ e $CD8^+$. Em algumas modalidades, as células compreendem células T $CD4^+$ ou $CD8^+$. As amostras incluem tecido, fluido e outras amostras colhidas diretamente do objeto. As amostras incluem tecido, fluido e outras amostras colhidas diretamente do objeto, bem como amostras resultantes de uma ou mais etapas de processamento, como separação, centrifugação, manipulação genética (por exemplo, transdução com vetor viral), lavagem e/ou incubação. A amostra biológica pode ser uma amostra obtida diretamente de uma fonte biológica ou de uma amostra que é processada. As amostras biológicas incluem, entre outros, fluidos corporais, como sangue, plasma, soro, líquido cefalorraquidiano, líquido sinovial, urina e suor, amostras de tecidos e órgãos, incluindo amostras processadas derivadas destes.

[00463] Em alguns aspectos, a amostra da qual as células são derivadas ou isoladas é sangue ou uma amostra derivada de sangue, ou é ou é derivada de um produto de aférese ou leucaférese, também aqui referida como amostra de aférese ou leucaférese. Exemplos de amostras incluem sangue total, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), leucócitos, medula óssea, timo, biópsia de tecido, tumor, leucemia, linfoma, linfonodo, tecido linfoide associado ao intestino, tecido linfoide associado à mucosa, baço, outros tecidos linfoides, fígado pulmão, estômago, intestino, cólon, rim, pâncreas, mama, osso, próstata, colo do útero, testículos, ovários, amígdalas ou outro órgão e/ou células deles derivadas. As amostras incluem, no contexto da terapia celular, por exemplo, terapia celular adotiva, amostras de fontes autólogas e alogênicas.

[00464] Em algumas modalidades, as células são derivadas de li-

nhagens de células, por exemplo, linhagens de células T. As células em algumas modalidades são obtidas a partir de uma fonte xenogênica, por exemplo, de camundongo, rato, primata não humano e porco.

[00465] Em alguns exemplos, as células do sangue circulante de um objeto são obtidas, por exemplo, por aférese ou leucaférese. As amostras, em alguns aspectos, contêm linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos e/ou plaquetas e, em alguns aspectos, contêm outras células que não glóbulos vermelhos e plaquetas.

[00466] Em algumas modalidades, as células sanguíneas coletadas do objeto são lavadas, por exemplo, para remover a fração plasmática e colocar as células em um tampão ou meio apropriado para etapas de processamento subsequentes. Em algumas modalidades, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em algumas modalidades, a solução de lavagem carece de cálcio e/ou magnésio e/ou muitos ou todos os cátions divalentes. Em alguns aspectos, uma etapa de lavagem é realizada por uma centrífuga semiautomatizada de fluxo contínuo (por exemplo, o processador de células Cobe 2991, Baxter), de acordo com as instruções do fabricante. Em alguns aspectos, uma etapa de lavagem é realizada por filtração de fluxo tangencial (TFF) de acordo com as instruções do fabricante. Em algumas modalidades, as células são ressuspensas em uma variedade de tampões biocompatíveis após a lavagem, tal como, por exemplo, PBS livre de Ca++/Mg++. Em certas modalidades, os componentes de uma amostra de células sanguíneas são removidos e as células ressuspensas diretamente nos meios de cultura.

[00467] As células geralmente são células eucarióticas, como células de mamíferos, e normalmente são células humanas. Em algumas modalidades, as células são derivadas do sangue, medula óssea, linfa ou órgãos linfoides, são células do sistema imunológico, como células

da imunidade inata ou adaptativa, por exemplo, células mieloides ou linfoides, incluindo linfócitos, tipicamente células T e/ou células NK. Outras células exemplares incluem células tronco, tais como células tronco multipotentes e pluripotentes, incluindo células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). As células são tipicamente células primárias, como aquelas isoladas diretamente de um objeto e/ou isoladas de um objeto e congeladas. Em algumas modalidades, as células incluem um ou mais subconjuntos de células T ou outros tipos de células, como populações inteiras de células T, células $CD4^+$, células $CD8^+$ e subpopulações das mesmas, como as definidas por função, estado de ativação, maturidade, potencial para capacidades de diferenciação, expansão, recirculação, localização e/ou persistência, especificidade de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presença em um órgão ou compartimento específico, perfil de secreção de marcador ou citocina e/ou grau de diferenciação. Com referência ao objeto a ser tratado, as células podem ser alogênicas e/ou autólogas. Entre os métodos incluem métodos prontos para uso. Em alguns aspectos, como para tecnologias prontas para uso, as células são pluripotentes e/ou multipotentes, como células tronco, como células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Em algumas modalidades, os métodos incluem isolar células do objeto, preparar, processar, cultivar e/ou projetá-las e reintroduzi-las no mesmo objeto, antes ou depois da criopreservação.

[00468] Entre os subtipos e subpopulações de células T e/ou $CD4^+$ e/ou $CD8^+$, estão as células T (T_N) puras, células T efetoras (T_{EFF}), células T de memória e seus subtipos, tais como T de memória de células tronco (TSCM), T de memória central (T_{CM}), T de memória efetiva (T_{EM}) ou T de memória efetiva terminalmente diferenciada, linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), células T imaturas, células T maduras, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T invariantes associadas à mucosa (CIT), células T reguladoras adaptativas e que ocorrem na-

turalmente (Treg), células T auxiliares, tais como células TH1, células TH2, células TH3, células TH3, células TH17, células TH9, células TH22, células T foliculares auxiliares, células T alfa/beta e células T delta/gama.

[00469] Em algumas modalidades, as células são células assassinas natural (NK). Em algumas modalidades, as células são monócitos ou granulócitos, por exemplo, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos e/ou basófilos.

[00470] Em algumas modalidades, os métodos de isolamento incluem a separação de diferentes tipos de células com base na expressão ou presença na célula de uma ou mais moléculas específicas, como marcadores de superfície, por exemplo, proteínas de superfície, marcadores intracelulares ou ácido nucleico. Em algumas modalidades, qualquer método conhecido para separação com base em tais marcadores pode ser usado. Em algumas modalidades, a separação é uma separação baseada em afinidade ou imunoafinidade. Por exemplo, o isolamento em alguns aspectos inclui a separação de células e populações de células com base na expressão ou nível de expressão das células de um ou mais marcadores, tipicamente marcadores de superfície celular, por exemplo, por incubação com um anticorpo ou parceiro de ligação que se liga especificamente a tais marcadores, seguidos geralmente por etapas de lavagem e separação de células que se ligaram ao anticorpo ou parceiro de ligação, daquelas células que não se ligaram ao anticorpo ou parceiro de ligação.

[00471] Em algumas modalidades, o isolamento das células inclui uma ou mais etapas de preparação e/ou separação por células sem afinidade. Em alguns exemplos, as células são lavadas, centrifugadas e/ou incubadas na presença de um ou mais reagentes, por exemplo, para remover componentes indesejados, enriquecer para componentes desejados, lisar ou remover células sensíveis a reagentes particu-

lares. Em alguns exemplos, as células são separadas com base em uma ou mais propriedades, como densidade, propriedades aderentes, tamanho, sensibilidade e/ou resistência a componentes particulares. Em algumas modalidades, os métodos incluem métodos de separação de células com base na densidade, como a preparação de glóbulos brancos a partir de sangue periférico lisando os glóbulos vermelhos e centrifugando através de um gradiente de Percoll ou Ficoll.

[00472] Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da etapa de seleção inclui incubação de células com um reagente de seleção. A incubação com um reagente ou reagentes de seleção, por exemplo, como parte de métodos de seleção que podem ser realizados usando um ou mais reagentes de seleção para seleção de um ou mais tipos diferentes de células com base na expressão ou presença na ou na célula de um ou mais moléculas específicas, tais como marcadores de superfície, por exemplo, proteínas de superfície, marcadores intracelulares ou ácido nucleico. Em algumas modalidades, qualquer método conhecido usando um reagente de seleção ou reagentes para separação com base em tais marcadores pode ser usado. Em algumas modalidades, o reagente ou reagentes de seleção resultam em uma separação que é uma separação baseada em afinidade ou imunoafinidade. Por exemplo, a seleção em alguns aspectos inclui incubação com um reagente ou reagentes para separação de células e populações de células com base na expressão ou nível de expressão das células de um ou mais marcadores, tipicamente marcadores de superfície celular, por exemplo, por incubação com um anticorpo ou parceiro de ligação que se liga especificamente a esses marcadores, seguido geralmente por etapas de lavagem e separação de células que se ligaram ao anticorpo ou parceiro de ligação, daquelas células que não se ligaram ao anticorpo ou parceiro de ligação. Em algumas modalidades, a seleção e/ou outros aspectos do processo são como

descritos na Publicação do Pedido Internacional de Patente Número WO/2015/164675.

[00473] Em alguns aspectos de tais processos, um volume de células é misturado com uma quantidade de um reagente de seleção baseado em afinidade desejado. A seleção baseada em imunoafinidade pode ser realizada usando qualquer sistema ou método que resulte em uma interação energética favorável entre as células sendo separadas e a molécula se ligando especificamente ao marcador na célula, por exemplo, o anticorpo ou outro parceiro de ligação na superfície sólida, por exemplo partícula. Em algumas modalidades, os métodos são realizados usando partículas como contas, por exemplo, contas magnéticas, que são revestidas com um agente de seleção (por exemplo, anticorpo) específico para o marcador das células. As partículas (por exemplo, contas) podem ser incubadas ou misturadas com as células em um recipiente, como um tubo ou saco, enquanto agitam ou misturam, com uma razão constante de densidade celular/partícula (por exemplo, conta) para ajudar a promover energeticamente favorecidas interações. Em outros casos, os métodos incluem seleção de células nas quais toda ou uma parte da seleção é realizada na cavidade interna de uma câmara centrífuga, por exemplo, sob rotação centrífuga. Em algumas modalidades, a incubação de células com reagentes de seleção, como reagentes de seleção baseados em imunoafinidade, é realizada em uma câmara centrífuga. Em certas modalidades, o isolamento ou separação é realizado usando um sistema, dispositivo ou aparelho descrito no Pedido de Patente Internacional, Número da Publicação WO2009/072003 ou US 20110003380 A1. Em um exemplo, o sistema é um sistema conforme descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602.

[00474] Em algumas modalidades, ao realizar tais etapas de seleção ou porções das mesmas (por exemplo, incubação com partículas

revestidas de anticorpos, por exemplo, contas magnéticas) na cavidade de uma câmara centrífuga, o usuário é capaz de controlar certos parâmetros, como volume de várias soluções, adição de solução durante o processamento e tempo da mesma, o que pode fornecer vantagens em comparação com outros métodos disponíveis. Por exemplo, a capacidade de diminuir o volume de líquido na cavidade durante a incubação pode aumentar a concentração das partículas (por exemplo, reagente de conta) usadas na seleção e, portanto, o potencial químico da solução, sem afetar o número total de células na cavidade. Por sua vez, isso pode melhorar as interações aos pares entre as células que estão sendo processadas e as partículas usadas para seleção. Em algumas modalidades, a realização da etapa de incubação na câmara, por exemplo, quando associada aos sistemas, circuitos e controle descritos aqui, permite ao usuário efetuar a agitação da solução nos momentos desejados durante a incubação, os quais também pode melhorar a interação.

[00475] Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da etapa de seleção é realizada em uma câmara centrífuga, que inclui a incubação de células com um reagente de seleção. Em alguns aspectos de tais processos, um volume de células é misturado com uma quantidade de reagente de seleção baseado em afinidade desejada que é muito menor do que o normalmente empregado na realização de seleções semelhantes em um tubo ou recipiente para seleção do mesmo número de células e/ou volume de células de acordo com as instruções do fabricante. Em algumas modalidades, uma quantidade de reagente ou reagentes de seleção que é/não mais do que 5%, não mais do que 10%, não mais do que 15%, não mais do que 20%, não mais do que 25%, não mais do que 50%, não mais do que 60%, não mais do que 70% ou não mais do que 80% da quantidade do (s) mesmo (s) reagente (s) de seleção empregado (s) para a seleção de células em

um tubo ou incubação em recipiente para o mesmo número de células e/ou o mesmo volume de células de acordo com as instruções do fabricante.

[00476] Em algumas modalidades, para seleção, por exemplo, seleção baseada em imunoafinidade das células, as células são incubadas na cavidade da câmara em uma composição que também contém o tampão de seleção com um reagente de seleção, como uma molécula que especificamente liga-se a um marcador de superfície em uma célula que deseja enriquecer e/ou esgotar, mas não em outras células da composição, como um anticorpo, que opcionalmente é acoplado a um scaffold, como um polímero ou superfície, por exemplo, conta, por exemplo, contas magnéticas, tais como contas magnéticas acopladas a anticorpos monoclonais específicos para CD4 e CD8. Em algumas modalidades, como descrito, o reagente de seleção é adicionado às células na cavidade da câmara em uma quantidade substancialmente menor que (por exemplo, não mais do que 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70% ou 80% da quantidade) em comparação com a quantidade do reagente de seleção que é normalmente usada ou seria necessária para alcançar a mesma ou semelhante eficiência de seleção do mesmo número de células ou do mesmo volume de células quando a seleção é realizada em um tubo com agitação ou rotação. Em algumas modalidades, a incubação é realizada com a adição de um tampão de seleção para as células e reagente de seleção para alcançar um volume alvo com a incubação do reagente de, por exemplo, 10 mL a 200 mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL ou 200 mL. Em algumas modalidades, o tampão de seleção e o reagente de seleção são pré-misturados antes da adição às células. Em algumas modalidades, o tampão de seleção e o reagente de seleção são adicionados separadamente às células. Em al-

gumas modalidades, a incubação de seleção é realizada com uma condição de mistura suave periódica, que pode ajudar na promoção de interações energeticamente favorecidas e, assim, permitir o uso de menos reagente de seleção geral, enquanto se obtém uma alta eficiência de seleção.

[00477] Em algumas modalidades, a duração total da incubação com o reagente de seleção é de 5 minutos a 6 horas ou de cerca de 5 minutos a cerca de 6 horas, tal como 30 minutos a 3 horas, por exemplo, pelo menos ou cerca de pelo menos 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos ou 180 minutos.

[00478] Em algumas modalidades, a incubação geralmente é realizada sob condições de mistura, tais como na presença de centrifugação, geralmente com força ou velocidade relativamente baixas, tal como a velocidade mais baixa que a utilizada para granular as células, tal como de 600 rpm a 1700 rpm ou de 600 rpm a 1700 rpm (por exemplo, em ou cerca de ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm ou 1500 rpm ou 1700 rpm), tal como em um RCF na amostra ou parede da câmara ou outro recipiente de 80g a 100g ou de 80g a cerca de 100g (por exemplo, igual ou superior a 80 g, 85 g, 90 g, 95 g ou 100 g). Em algumas modalidades, a centrifugação é realizada usando intervalos repetidos de uma centrifugação a uma velocidade tão baixa seguida por um período de descanso, tal como uma centrifugação e/ou repouso por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 segundos, tal como uma centrifugação em aproximadamente 1 ou 2 segundos, seguido de um descanso por aproximadamente 5, 6, 7 ou 8 segundos.

[00479] Em algumas modalidades, esse processo é realizado dentro do sistema totalmente fechado ao qual a câmara é integral. Em algumas modalidades, esse processo (e em alguns aspectos também uma ou mais etapas adicionais, tal como uma etapa de lavagem anterior que lava uma amostra contendo as células, tal como uma amostra

de aférese) é realizado de maneira automatizada, de modo que as células, reagente e outros componentes são aspirados e empurrados para fora da câmara em momentos apropriados e a centrifugação é efetuada, de modo a concluir a etapa de lavagem e ligação em um único sistema fechado usando um programa automatizado.

[00480] Em algumas modalidades, após a incubação e/ou mistura das células e o reagente de seleção e/ou reagentes, as células incubadas são sujeitas a uma separação para selecionar células com base na presença ou ausência do reagente ou reagentes particulares. Em algumas modalidades, a separação é realizada no mesmo sistema fechado no qual a incubação de células com o reagente de seleção foi realizada. Em algumas modalidades, após a incubação com os reagentes de seleção, as células incubadas, incluindo as células às quais o reagente de seleção se ligou, são transferidas para um sistema de separação das células por imunoafinidade. Em algumas modalidades, o sistema para separação baseada em imunoafinidade é ou contém uma coluna de separação magnética.

[00481] Tais etapas de separação podem ser baseadas na seleção positiva, na qual as células que se ligaram aos reagentes, por exemplo, anticorpo ou parceiro de ligação, são retidas para uso adicional e/ou seleção negativa, na qual as células que não se ligaram ao reagente, por exemplo, anticorpo ou parceiro de ligação, são retidas. Em alguns exemplos, ambas as frações são retidas para uso adicional. Em alguns aspectos, a seleção negativa pode ser particularmente útil quando não há anticorpo disponível que identifique especificamente um tipo de célula em uma população heterogênea, de modo que a separação seja melhor realizada com base em marcadores expressos por células que não a população desejada.

[00482] Em algumas modalidades, as etapas do processo incluem adicionalmente a seleção negativa e/ou positiva das células e incuba-

das, tal como o uso de um sistema ou aparelho que pode executar uma seleção baseada em afinidade. Em algumas modalidades, o isolamento é realizado por enriquecimento para uma população celular específica por seleção positiva, ou depleção de uma população celular específica, por seleção negativa. Em algumas modalidades, a seleção positiva ou negativa é realizada incubando células com um ou mais anticorpos ou outro agente de ligação que se ligam especificamente a um ou mais marcadores de superfície expressos ou expressos (marcador+) em um nível relativamente mais alto (marcador^{alto}) nas células positiva ou negativamente selecionadas, respectivamente. Podem ser realizadas várias rodadas da mesma etapa de seleção, por exemplo, etapa de seleção positiva ou negativa. Em certas modalidades, a fração selecionada positiva ou negativamente sujeita ao processo de seleção, tal como repetindo uma etapa de seleção positiva ou negativa. Em algumas modalidades, a seleção é repetida duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, sete vezes, oito vezes, nove vezes ou mais de nove vezes. Em certas modalidades, a mesma seleção é realizada até cinco vezes. Em certas modalidades, a mesma etapa de seleção é realizada três vezes.

[00483] A separação não precisa resultar em 100% de enriquecimento ou remoção de uma população celular específica ou de células que expressam um marcador particular. Por exemplo, seleção positiva ou enriquecimento para células de um tipo específico, tal como aquelas que expressam um marcador, refere-se ao aumento do número ou porcentagem dessas células, mas não precisa resultar em uma ausência completa de células que não expressam o marcador. Da mesma forma, seleção negativa, remoção ou depleção de células de um tipo específico, tal como aquelas que expressam um marcador, refere-se à diminuição do número ou porcentagem dessas células, mas não precisa resultar na remoção completa de todas essas células.

[00484] Em alguns exemplos, várias rodadas de etapas de separação são realizadas, onde a fração positiva ou negativamente selecionada de uma etapa é sujeita a outra etapa de separação, tal como uma seleção positiva ou negativa subsequente. Em alguns exemplos, uma única etapa de separação pode esgotar as células que expressam vários marcadores simultaneamente, tal como incubando células com uma pluralidade de anticorpos ou parceiros de ligação, cada um específico para um marcador direcionado para seleção negativa. Da mesma forma, vários tipos de células podem ser simultaneamente selecionados positivamente incubando células com uma pluralidade de anticorpos ou parceiros de ligação expressos nos vários tipos de células. Em certas modalidades, uma ou mais etapas de separação são repetidas e/ou executadas mais de uma vez. Em algumas modalidades, a fração selecionada positiva ou negativamente resultante de uma etapa de separação é submetida à mesma etapa de separação, tal como repetindo a etapa de seleção positiva ou negativa. Em algumas modalidades, uma única etapa de separação é repetida e/ou realizada mais de uma vez, por exemplo, para aumentar o rendimento de células selecionadas positivamente, aumentar a pureza das células selecionadas negativamente e/ou remover adicionalmente as células selecionadas positivamente da fração selecionada negativamente. Em certas modalidades, uma ou mais etapas de separação são executadas e/ou repetidas duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, sete vezes, oito vezes, nove vezes, dez vezes ou mais de dez vezes. Em certas modalidades, as uma ou mais etapas de seleção são realizadas e/ou repetidas entre uma e dez vezes, entre uma e cinco vezes, ou entre três e cinco vezes. Em certas modalidades, uma ou mais etapas de seleção são repetidas três vezes.

[00485] Por exemplo, em alguns aspectos, subpopulações específicas de células T, tal como células positivas ou que expressam altos

níveis de um ou mais marcadores de superfície, por exemplo, células T CD28+, CD62L+, CCR7$^+$, CD27$^+$, CD127+, CD4$^+$, CD8$^+$, CD45RA+ e/ou CD45RO+, são isoladas por técnicas de seleção positiva ou negativa. Em algumas modalidades, tais células são selecionadas por incubação com um ou mais anticorpos ou parceiro de ligação que se liga especificamente a esses marcadores. Em algumas modalidades, o anticorpo ou parceiro de ligação pode ser conjugado, tal como direta ou indiretamente, a um suporte sólido ou matriz para efetuar a seleção, tal como uma conta magnética ou conta paramagnética. Por exemplo, as células T CD3$^+$, CD28+ podem ser selecionadas positivamente usando contas magnéticas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (por exemplo, Expansor de Células T DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 e/ou contas ExpACT®).

[00486] Em algumas modalidades, as células T são separadas de uma amostra de PBMC por seleção negativa de marcadores expressos em células não-T, tal como células B, monócitos ou outros glóbulos brancos, tal como CD14. Em alguns aspectos, uma etapa de seleção de CD4$^+$ ou CD8$^+$ é usada para separar as células T citotóxicas auxiliares CD4$^+$ e CD8$^+$. Tais populações CD4$^+$ e CD8$^+$ podem ser adicionalmente classificadas em subpopulações por seleção positiva ou negativa para marcadores expressos ou expressos em um grau relativamente mais alto em uma ou mais subpopulações de células T puras, de memória e/ou efetoras.

[00487] Em algumas modalidades, as células T CD8$^+$ são adicionalmente enriquecidas ou depletadas de células tronco puras, de memória central, de memória efetiva e/ou de células tronco da memória central, tal como por seleção positiva ou negativa com base em antígenos de superfície associados à respectiva subpopulação. Em algumas modalidades, o enriquecimento das células T de memória central (TCM) é realizado para aumentar a eficácia, tal como para melhorar a

sobrevivência de longo prazo, a expansão e/ou o enxerto após a administração, o que em alguns aspectos é particularmente robusto nessas subpopulações. Vide Terakura et al., (2012) Blood.1:72–82; Wang et al. (2012) J. Immunother. 35 (9): 689-701. Em algumas modalidades, a combinação de células T $CD8^+$ enriquecidas com TCM e células T $CD4^+$ aprimora adicionalmente a eficácia.

[00488] Em modalidades, as células T de memória estão presentes em ambos os subconjuntos CD62L+ e CD62L- dos linfócitos do sangue periférico $CD8^+$. PBMC pode ser enriquecido ou depletado das frações CD62L-$CD8^+$ e/ou CD62L+$CD8^+$, tal como o uso de anticorpos anti-CD8 e anti-CD62L.

[00489] Em algumas modalidades, o enriquecimento para células T de memória central (T_{CM}) é baseado na expressão de superfície positiva ou alta de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 e/ou CD127; em alguns aspectos, é baseado na seleção negativa para células que expressam ou altamente expressam CD45RA e/ou granzima B. Em alguns aspectos, o isolamento de uma população de $CD8^+$ enriquecida para células T_{CM} é realizado pela depleção de células que expressam CD4, CD14, CD45RA, e seleção positiva ou enriquecimento para células que expressam CD62L. Em um aspecto, o enriquecimento das células T de memória central (T_{CM}) é realizado começando com uma fração negativa de células selecionadas com base na expressão de CD4, que é submetida a uma seleção negativa com base na expressão de CD14 e CD45RA e uma seleção positiva com base em CD62L.

[00490] Tais seleções em alguns aspectos são realizadas simultaneamente e em outros aspectos são realizadas sequencialmente, em qualquer ordem. Em alguns aspectos, a mesma etapa de seleção baseada em expressão de CD4 usada na preparação da população ou subpopulação de células T $CD8^+$, também é usada para gerar a população ou subpopulação de células T $CD4^+$, de modo que ambas as fra-

ções positiva e negativa da separação baseada em CD4 são retidas e usadas nas etapas subsequentes dos métodos, opcionalmente após uma ou mais etapas de seleção positivas ou negativas. Em algumas modalidades, a seleção para a população de células T $CD4^+$ e a seleção para a população de células T $CD8^+$ são realizadas simultaneamente. Em algumas modalidades, a população de células T $CD4^+$ e a seleção para a população de células T $CD8^+$ são realizadas sequencialmente, em qualquer ordem. Em algumas modalidades, os métodos para selecionar células podem incluir os descritos no Pedido de Patente U.S. publicado No. US20170037369. Em algumas modalidades, a população de células T $CD4^+$ selecionada e a população de células T $CD8^+$ selecionada podem ser combinadas subsequentemente à seleção. Em alguns aspectos, a população de células T $CD4^+$ selecionada e a população de células T $CD8^+$ selecionada podem ser combinadas em um recipiente ou em uma bolsa, tal como uma bolsa de biorreator. Em algumas modalidades, a população de células T $CD4^+$ selecionada e a população de células T $CD8^+$ selecionada são processadas separadamente, pelo que a população de células T $CD4^+$ selecionada é enriquecida em células T $CD4^+$ e incubada com um reagente estimulatório (por exemplo, magnético anti-CD3/anti-CD28, transduzidas com um vetor viral que codifica uma proteína recombinante (por exemplo, CAR) e cultivadas sob condições para expandir as células T e a população de células T $CD8^+$ selecionada é enriquecida em células T $CD8^+$ e incubada com um reagente estimulatório (por exemplo, contas magnéticas anti-CD3/anti-CD28), transduzidas com um vetor viral que codifica uma proteína recombinante (por exemplo, CAR), a mesma proteína recombinante que para manipulação genética das células T $CD4^+$ do mesmo doador, e cultivada sob condições para expandir as células T, tal como de acordo com os métodos fornecidos.

[00491] Em modalidades particulares, uma amostra biológica, por

exemplo, uma amostra de PBMCs ou outros glóbulos brancos, é submetida à seleção de células T $CD4^+$, onde as frações negativa e positiva são mantidas. Em certas modalidades, as células T $CD8^+$ são selecionadas a partir da fração negativa. Em algumas modalidades, uma amostra biológica é submetida à seleção de células T $CD8^+$, onde as frações negativa e positiva são mantidas. Em certas modalidades, as células T $CD4^+$ são selecionadas a partir da fração negativa.

[00492] Em um exemplo particular, uma amostra de PBMCs ou outra amostra de glóbulos brancos é submetida à seleção de células T $CD4^+$, onde as frações negativa e positiva são mantidas. A fração negativa é então sujeita a seleção negativa com base na expressão de CD14 e CD45RA ou CD19, e seleção positiva com base em um marcador característico das células T de memória central, tal como CD62L ou CCR7, onde as seleções positiva e negativa são realizadas em ordem.

[00493] As células auxiliares T $CD4^+$ podem ser classificadas em células puras, de memória central e efetoras, identificando populações de células que têm antígenos de superfície celular. Os linfócitos $CD4^+$ podem ser obtidos por métodos padrão. Em algumas modalidades, os linfócitos T $CD4^+$ puros são células CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ ou $CD4^+$. Em algumas modalidades, as células T $CD4^+$ de memória central são CD62L+ e CD45RO+. Em algumas modalidades, as células T $CD4^+$ efetoras são CD62L- e CD45RO-.

[00494] Em um exemplo, para enriquecer células T $CD4^+$ por seleção negativa, um coquetel de anticorpos monoclonais normalmente inclui anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR e CD8. Em algumas modalidades, o anticorpo ou parceiro de ligação está ligado a um suporte ou matriz sólida, tal como uma conta magnética ou conta paramagnética, para permitir a separação de células para seleção positiva e/ou negativa. Por exemplo, em algumas modalidades, as

células e as populações de células são separadas ou isoladas usando técnicas de separação imunomagnética (ou afinidade magnética) (revisadas em Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Bahavior In Vitro and In Vivo, p, 17-25 Editado por: S.A. Brooks e U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[00495] Em alguns aspectos, a amostra ou composição de célula a ser separada é incubada com um reagente de seleção contendo material pequeno, magnetizável ou magneticamente responsivo, tal como partículas ou micropartículas com capacidade de resposta magnética, tal como contas paramagnéticas (por exemplo, contas Dynalbeads ou Contas MACS®). O material responsivo magneticamente, por exemplo, partícula, geralmente é direta ou indiretamente ligado a um parceiro de ligação, por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a uma molécula, por exemplo, marcador de superfície, presente na célula, células ou população de células que ele se deseja separar, por exemplo, que se deseja selecionar negativa ou positivamente.

[00496] Em algumas modalidades, a partícula ou conta magnética compreende um material responsivo magneticamente ligado a um membro de ligação específico, tal como um anticorpo ou outro parceiro de ligação. Existem muitos materiais responsivos magneticamente conhecidos para uso em métodos de separação magnética. Partículas magnéticas adequadas incluem as descritas em Molday, Pat. 4.452.773, e na Especificação de Patente Europeia EP 452342 B, que são aqui incorporado por referência. Partículas de tamanho coloidal, tal como as descritas na Owen U.S. Pat. 4.795.698, e Liberti et al., Pat. 5.200.084 são outro exemplo e também podem ser usados.

[00497] A incubação geralmente é realizada sob condições pelas quais os anticorpos ou parceiros de ligação, ou moléculas, tal como anticorpos secundários ou outros reagentes, que se ligam especificamente a esses anticorpos ou parceiros de ligação, que estão ligados à

partícula ou conta magnética, especificamente ligam-se às moléculas da superfície celular, se presentes nas células da amostra.

[00498] Em certas modalidades, as partículas magneticamente responsivas são revestidas em anticorpos primários ou outros parceiros de ligação, anticorpos secundários, lectinas, enzimas ou estreptavidina. Em certas modalidades, as partículas magnéticas são conectadas às células através de um revestimento de anticorpos primários específicos para um ou mais marcadores. Em certas modalidades, as células, em vez das contas, são marcadas com um anticorpo primário ou parceiro de ligação e, em seguida, partículas magnéticas revestidas com anticorpo secundário específico do tipo de célula ou outro parceiro de ligação (por exemplo, estreptavidina) são adicionadas. Em certas modalidades, partículas magnéticas revestidas com estreptavidina são usadas em conjunto com anticorpos primários ou secundários biotinilados.

[00499] Em alguns aspectos, a separação é alcançada em um procedimento no qual a amostra é colocada em um campo magnético, e as células que têm partículas magneticamente responsivas ou magnetizáveis ligadas a elas serão atraídas para o ímã e separadas das células não identificadas. Para seleção positiva, as células atraídas pelo ímã são retidas; para seleção negativa, as células que não são atraídas (células não marcadas) são retidas. Em alguns aspectos, uma combinação de seleção positiva e negativa é realizada durante a mesma etapa de seleção, em que as frações positiva e negativa são retidas e posteriormente processadas ou sujeitas a etapas de separação adicionais.

[00500] Em algumas modalidades, a seleção baseada em afinidade é via classificação celular ativada magneticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Classificação de Células Ativadas Magneticamente (MACS), por exemplo, sistemas CliniMACS são capazes de seleção

de alta pureza de células tendo partículas magnetizadas ligadas a elas. Em certas modalidades, MACS opera em um modo em que as espécies não alvo e alvo são sequencialmente eluídas após a aplicação do campo magnético externo. Ou seja, as células ligadas às partículas magnetizadas são mantidas no lugar enquanto as espécies não acopladas são eluídas. Então, após a conclusão desta primeira etapa de eluição, as espécies que foram capturadas no campo magnético e impedidas de serem eluídas são liberadas de alguma maneira tal que possam ser eluídas e recuperadas. Em certas modalidades, as células não alvo são marcadas e depletadas da população heterogênea de células.

[00501] Em algumas modalidades, as partículas responsivas magneticamente são deixadas anexadas às células que devem ser subsequentemente incubadas, cultivadas e/ou manipuladas geneticamente; em alguns aspectos, as partículas são deixadas anexadas às células para administração a um paciente. Em algumas modalidades, as partículas magnetizáveis ou magneticamente responsivas são removidas das células. Os métodos para remover partículas magnetizáveis das células são conhecidos e incluem, por exemplo, o uso de anticorpos não marcados concorrentes, partículas magnetizáveis ou anticorpos conjugados com ligantes cliváveis, etc. Em algumas modalidades, as partículas magnetizáveis são biodegradáveis.

[00502] Em certas modalidades, o isolamento ou separação é realizado usando um sistema, dispositivo ou aparelho que realiza uma ou mais das etapas de isolamento, preparação celular, separação, processamento, incubação, cultura e/ou formulação dos métodos. Em alguns aspectos, o sistema é usado para executar cada uma dessas etapas em um ambiente fechado ou estéril, por exemplo, para minimizar erros, manipulação do usuário e/ou contaminação. Em um exemplo, o sistema é um sistema conforme descrito no Pedido de Patente Internaci-

onal, Número de Publicação WO2009/072003 ou US 20110003380 A1.

[00503] Em algumas modalidades, o sistema ou aparelho executa uma ou mais, por exemplo, todas as etapas de isolamento, processamento, manipulação e formulação em um sistema integrado ou independente, e/ou de maneira automatizada ou programável. Em alguns aspectos, o sistema ou aparelho inclui um computador e/ou programa de computador em comunicação com o sistema ou aparelho, que permite ao usuário programar, controlar, avaliar o resultado e/ou ajustar vários aspectos das etapas de processamento, isolamento, manipulação e formulação.

[00504] Em alguns aspectos, a separação e/ou outras etapas são realizadas usando o sistema CliniMACS (Miltenyi Biotic), por exemplo, para separação automatizada de células em nível de escala clínica em um sistema fechado e estéril. Os componentes podem incluir um microcomputador integrado, unidade de separação magnética, bomba peristáltica e várias válvulas de manga flexível. O computador integrado em alguns aspectos controla todos os componentes do instrumento e direciona o sistema a executar procedimentos repetidos em uma sequência padronizada. A unidade de separação magnética em alguns aspectos inclui um ímã permanente móvel e um suporte para a coluna de seleção. A bomba peristáltica controla a vazão em todo o conjunto de tubulação e, juntamente com as válvulas de manga flexível, garante o fluxo controlado de tampão através do sistema e a suspensão contínua das células.

[00505] O sistema CliniMACS em alguns aspectos usa partículas magnetizáveis acopladas a anticorpos que são fornecidas em uma solução estéril e não pirogênica. Em algumas modalidades, após a marcação das células com partículas magnéticas, as células são lavadas para remover o excesso de partículas. Uma bolsa de preparação de

células é então conectada ao conjunto de tubos, que por sua vez é conectado a uma bolsa contendo tampão e uma bolsa de coleta de células. O conjunto de tubos consiste em tubos estéreis pré-montados, incluindo uma pré-coluna e uma coluna de separação, e são apenas para uso único. Após o início do programa de separação, o sistema aplica automaticamente a amostra de células na coluna de separação. As células marcadas são retidas na coluna, enquanto as células não marcadas são removidas por uma série de etapas de lavagem. Em algumas modalidades, as populações de células para uso com os métodos aqui descritos não são marcadas e não são retidas na coluna. Em algumas modalidades, as populações de células para uso com os métodos aqui descritos são marcadas e retidas na coluna. Em algumas modalidades, as populações de células para uso com os métodos aqui descritos são eluídas da coluna após a remoção do campo magnético e são coletadas dentro da bolsa de coleta de células.

[00506] Em certas modalidades, separação e/ou outras etapas são realizadas usando o sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). O sistema CliniMACS Prodigy, em alguns aspectos, é equipado com uma unidade de processamento celular que permite a lavagem e o fracionamento automatizados de células por centrifugação. O sistema CliniMACS Prodigy também pode incluir uma câmera integrada e um software de reconhecimento de imagem que determina o objetivo final ideal de fracionamento da célula, discernindo as camadas macroscópicas do produto da célula de origem. Por exemplo, o sangue periférico é automaticamente separado em eritrócitos, glóbulos brancos e camadas plasmáticas. O sistema CliniMACS Prodigy também pode incluir uma câmara de cultivo celular integrada que realiza protocolos de cultura de células como, por exemplo, diferenciação e expansão celular, carregamento de antígeno, e cultura celular de longo prazo. As portas de entrada podem permitir a remoção estéril e a reposição de

meios e as células podem ser monitoradas usando um microscópio integrado. Vide, por exemplo, Klebanoff et al. (2012) *J. Immunother*. 35 (9): 651–660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72–82, e Wang et al. (2012) *J. Immunother*. 35 (9): 689-701.

[00507] Em algumas modalidades, uma população de células aqui descrita é coletada e enriquecida (ou depletada) por citometria de fluxo, na qual as células coradas para vários marcadores de superfície celular são transportadas em uma corrente fluídica. Em algumas modalidades, uma população de células aqui descrita é coletada e enriquecida (ou depletada) por meio de classificação em escala preparativa (FACS). Em certas modalidades, uma população de células aqui descrita é coletada e enriquecida (ou depletada) pelo uso de chips de sistemas microeletromecânicos (MEMS) em combinação com um sistema de detecção baseado em FACS (vide, por exemplo, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; e Godin et al. (2008) J. Biophoton. 1 (5): 355–376. Nos dois casos, as células podem ser marcadas com vários marcadores, permitindo o isolamento de subconjuntos de células T bem definidos em alta pureza.

[00508] Em algumas modalidades, os anticorpos ou parceiros de ligação são marcados com um ou mais marcadores detectáveis, para facilitar a separação para seleção positiva e/ou negativa. Por exemplo, a separação pode ser baseada na ligação a anticorpos marcados com fluorescência. Em alguns exemplos, a separação de células com base na ligação de anticorpos ou outros parceiros de ligação específicos para um ou mais marcadores de superfície celular é realizada em uma corrente fluídica, tal como por classificação celular ativada por fluorescência (FACS), incluindo escala preparativa (FACS) e/ou chips de sistemas microeletromecânicos (MEMS), por exemplo, em combinação com um sistema de detecção citométrica de fluxo. Tais métodos permitem a seleção positiva e negativa com base em múltiplos marcadores

simultaneamente.

[00509] Em algumas modalidades, os métodos de preparação incluem etapas para congelamento, por exemplo, criopreservação, das células, antes ou depois da seleção, isolamento, incubação e/ou manipulação. Em algumas modalidades, os métodos incluem etapas para congelamento, por exemplo, preservação das células, antes ou depois do isolamento ou enriquecimento da seleção. Em algumas modalidades, a etapa de congelamento e descongelamento subsequente remove granulócitos e, até certo ponto, monócitos na população celular. Em algumas modalidades, as células são suspensas em uma solução de congelamento, por exemplo, após uma etapa de lavagem para remover o plasma e as plaquetas. Qualquer uma de uma variedade de soluções de congelamento conhecidas e parâmetros em alguns aspectos podem ser usados. Um exemplo envolve o uso de PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina sérica humana (HSA) ou outro meio de congelamento celular adequado. Este é então diluído 1:1 com meio, de modo que a concentração final de DMSO e HSA seja 10% e 4%, respectivamente. As células são geralmente congeladas a -80 ºC a uma taxa de 1° por minuto e armazenadas na fase de vapor de um tanque de armazenamento de nitrogênio líquido. Em algumas modalidades, as células são encerradas em uma bolsa adequada para criopreservação (por exemplo, CryoMacs® Freezing Bags, Miltenyi Biotec). Em algumas modalidades, as células são colocadas em um frasco adequado para criopreservação (por exemplo, CellSeal® Vials, Cook Regentec). Em algumas modalidades, as etapas e/ou reagentes para congelamento são ou incluem qualquer uma das etapas e/ou reagentes para congelamento aqui descritos.

[00510] Em algumas modalidades dos métodos aqui descritos, é benéfico criopreservar uma amostra (por exemplo, produto de aférese ou leucaférese) antes de seleção, isolamento, incubação e/ou manipu-

lação, a fim de reduzir, minimizar ou impedir a morte celular. Métodos de crioproteção não limitativos para reduzir, minimizar ou impedir a morte celular e preservar a viabilidade celular são descritos abaixo. Em algumas modalidades, a amostra que contém células (por exemplo, uma amostra de sangue total, uma amostra de buffy coat, uma amostra de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), uma amostra de células T não fracionada, uma amostra de linfócitos, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aférese, ou um produto de leucaférese) é crioconservada e/ou crioprotegida (por exemplo, congelada) e depois descongelada antes de qualquer etapa de isolamento, seleção, ativação, estímulo, manipulação, transdução, transfecção, incubação, cultura, colheita, formulação de uma população das células e/ou administração da população celular formulada a um objeto. Em modalidades particulares, um produto de aférese ou um produto de leucaférese é criopreservado e/ou crioprotegido (por exemplo, congelado) e depois descongelado antes de ser objeto a uma etapa de seleção ou isolamento de células (por exemplo, uma etapa de seleção ou isolamento de células T) como descrito acima. Em algumas modalidades, depois que um produto de aférese criopreservado e/ou crioprotegido ou produto de leucaférese é submetido a uma etapa de seleção ou isolamento de célula (por exemplo, célula T), nenhuma etapa adicional de criopreservação e/ou crioproteção é realizada durante ou entre qualquer uma das etapas subsequentes, tal como as etapas de ativação, estímulo, manipulação, transdução, transfecção, incubação, cultura, colheita, formulação de uma população de células e/ou administração da população de células formuladas a um objeto. Por exemplo, as células T selecionadas a partir de um produto de aférese criopreservado e/ou crioprotegido ou de produto de leucaférese não são novamente crioconservadas e/ou crioprotegidas antes de serem descongeladas para um processo a jusante, tal como ativação/estimulação ou trans-

dução de células T. Em algumas modalidades, depois que um produto de aférese criopreservado e/ou crioprotegido ou produto de leucaférese é submetido a uma etapa de seleção ou isolamento de célula (por exemplo, célula T), uma etapa de criopreservação e/ou crioproteção adicional é realizada durante ou entre qualquer uma das etapas subsequentes, tal como as etapas de ativação, estímulo, manipulação, transdução, transfecção, incubação, cultura, colheita, formulação de uma população de células e/ou administração da população de células formuladas para um objeto. Por exemplo, as células T selecionadas a partir de um produto de aférese ou produto de leucaférese criopreservado e/ou crioprotegido são novamente crioconservadas e/ou crioprotegidas antes de serem descongeladas para um processo a jusante, tal como ativação/estimulação ou transdução de células T.

[00511] Em modalidades particulares, o produto de aférese ou produto de leucaférese criopreservado e/ou crioprotegido é depositado (por exemplo, sem seleção de células T antes de congelar a amostra), o que, em alguns aspectos, pode permitir mais flexibilidade para as etapas de processamento subsequentes. Em um aspecto, empilhar células antes da seleção aumenta o rendimento das células para um processo a jusante, e empilhar células precocemente pode significar que isto é mais saudável e pode ser mais fácil de atender aos critérios de sucesso de fabricação. Em algumas modalidades, as células depositadas são mais robustas em etapas de processamento adicionais, tal como em uma etapa ou etapa adicional para gerar ou produzir uma composição de célula em comparação com células que não foram depositadas. Em outro aspecto, uma vez descongelado, o produto de aférese ou produto de leucaférese criopreservado e/ou crioprotegido pode ser submetido a um ou mais métodos de seleção diferentes. As vantagens dessa abordagem são, entre outras coisas, melhorar a disponibilidade, eficácia e/ou outros aspectos das células de uma terapia

celular para o tratamento de uma doença ou condição de um objeto, tal como no doador da amostra e/ou outro destinatário.

[00512] Em algumas modalidades, a criopreservação da amostra de sangue, amostra de aférese ou amostra de leucaférese ocorre dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 24, 30, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 horas de descanso após a obtenção do objeto. Em modalidades, a criopreservação da amostra de sangue, amostra de aférese ou amostra de leucaférese ocorre dentro de 1 dia, 2 dias ou 3 dias após a obtenção do objeto.

[00513] Em algumas modalidades, a amostra contendo células (por exemplo, amostra de sangue, produto de aférese ou produto de leucaférese) é lavada para remover um ou mais anticoagulantes, tal como heparina, adicionados durante a aférese ou leucaférese. Em algumas modalidades, a amostra (por exemplo, amostra de sangue, amostra de aférese, amostra de leucaférese) sofre seleção, isolamento e/ou enriquecimento e as células selecionadas, isoladas e/ou enriquecidas são crioconservadas. Em algumas modalidades, as células isoladas, selecionadas e/ou enriquecidas são células T, tal como qualquer célula T aqui descrita. Em algumas modalidades, as composições de célula T enriquecidas são congeladas, por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, após isolamento, seleção e/ou enriquecimento. Em modalidades particulares, uma composição de célula T $CD4^+$ enriquecidas é congelada, por exemplo, crioconservada e/ou criocongelada, após isolamento, seleção e/ou enriquecimento. Em certas modalidades, uma composição de célula T $CD8^+$ enriquecida é congelada, por exemplo, crioconservada e/ou criocongelada, após isolamento, seleção e/ou enriquecimento. Em algumas modalidades, as células T enriquecidas são congeladas, por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, antes de quaisquer etapas de incubação, ativação, estímulo, manipulação, transdução, transfecção, cultivo, expansão, colheita e/ou formulação

da composição de célula. Em modalidades particulares, uma composição de célula T $CD4^+$ enriquecida é congelada, por exemplo, crioconservada e/ou criocongelada, antes de quaisquer etapas de incubação, ativação, estímulo, manipulação, transdução, transfecção, transfecção, transfecção, cultivo, expansão, colheita e/ou formulação da composição de célula. Em algumas modalidades, uma composição de célula T $CD8^+$ enriquecida é congelada, por exemplo, crioconservada e/ou criocongelada, antes de quaisquer etapas de incubação, ativação, estímulo, manipulação, transdução, transfecção, transfecção, transfecção, cultivo, expansão, colheita e/ou formulação da composição de célula. Em modalidades particulares, as uma ou mais composições de entrada criocongeladas são armazenadas, por exemplo, a ou até cerca de -80 ºC, entre 12 horas e 7 dias, entre 24 horas e 120 horas, ou entre 2 dias e 5 dias. Em modalidades particulares, as uma ou mais composições de entrada criocongeladas são armazenadas a ou até cerca de -80 ºC, por um período de tempo inferior a 10 dias, 9 dias, 8 dias, 7 dias, 6 dias ou 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias ou 1 dia. Em algumas modalidades, as uma ou mais composições de entrada criocongeladas são armazenadas a ou até cera de -80 ºC, por ou por cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias ou 6 dias.

[00514] Em algumas modalidades, a amostra (por exemplo, amostra de aférese ou leucaférese) é coletada e crioconservada e/ou crioprotegida antes ou sem seleção prévia de células (por exemplo, sem seleção prévia de células T, tal como seleção por cromatografia), por vez após o doador ser diagnosticado com uma doença ou condição. Em alguns aspectos, o tempo de criopreservação também é antes do doador receber um ou mais dos seguintes procedimentos: qualquer tratamento inicial para a doença ou condição, qualquer tratamento direcionado ou qualquer tratamento rotulado para tratamento da doença ou condição, ou qualquer outro tratamento do que radiação e/ou qui-

mioterapia. Em algumas modalidades, a amostra é coletada após uma primeira recaída de uma doença seguinte ao tratamento inicial para a doença e antes do doador ou objeto receber tratamento subsequente para a doença. Os tratamentos iniciais e/ou subsequentes podem ser uma terapia diferente da terapia celular. Em algumas modalidades, as células coletadas podem ser usadas em uma terapia celular após tratamentos iniciais e/ou subsequentes. Em um aspecto, a amostra crioconservada e/ou crioprotegida sem seleção prévia de células pode ajudar a reduzir os custos iniciais, tal como aqueles associados a pacientes sem tratamento em um ensaio clínico randomizado que pode se cruzar e necessitar de tratamento posteriormente.

[00515] Em algumas modalidades, a amostra (por exemplo, amostra de aférese ou leucaférese) é coletada e crioconservada e/ou crioprotegida antes ou sem a seleção prévia de células (por exemplo, sem seleção prévia de células T, tal como seleção por cromatografia), por vez após uma segunda recaída de uma doença seguinte a uma segunda linha de tratamento para a doença e antes do doador ou objeto receber tratamento subsequente para a doença. Em algumas modalidades, os pacientes são identificados como prováveis de terem recaídas após uma segunda linha de tratamento, por exemplo, avaliando certos fatores de risco. Em algumas modalidades, os fatores de risco são baseados no tipo de doença e/ou genética, tal como linfoma de duplo golpe, câncer refratário primário ou linfoma de células B ativadas. Em algumas modalidades, os fatores de risco são baseados na apresentação clínica, tal como recaída precoce após o tratamento de primeira linha ou outros indicadores prognósticos ruins após o tratamento (por exemplo, IPI (Índice de Prognóstico Internacional) > 2)

[00516] Em algumas modalidades, a amostra (por exemplo, amostra de aférese ou leucaférese) é coletada e crioconservada e/ou crioprotegida antes ou sem seleção prévia de células (por exemplo, sem

seleção prévia de células T, tal como seleção por cromatografia), por vez antes que o doador ou objeto seja diagnosticado com uma doença. Em alguns aspectos, o doador ou objeto pode estar determinado a estar em risco de desenvolver uma doença. Em alguns aspectos, o doador ou objeto pode ser um objeto saudável. Em certos casos, o doador ou objeto pode optar por empilhar ou armazenar células sem ser considerado em risco de desenvolver uma doença ou ser diagnosticado com uma doença no caso de a terapia celular ser necessária em um estágio posterior da vida. Em algumas modalidades, um doador ou objeto pode ser considerado em risco de desenvolver uma doença com base em fatores como mutações genéticas, anormalidades genéticas, rupturas genéticas, histórico familiar, anormalidades proteicas (como deficiências na produção e/ou processamento de proteínas) e escolhas de estilo de vida que podem aumentar o risco de desenvolver uma doença. Em algumas modalidades, as células são coletadas como profiláticas.

[00517] Ao permitir que os doadores armazenem suas células em um estágio em que os doadores e, portanto, suas células, não foram submetidos a tratamento extensivo para uma doença e/ou antes de contrair uma doença ou condição ou diagnóstico da mesma, essas células podem ter certas vantagens para uso em terapia celular em comparação com células colhidas após uma ou após várias rodadas de tratamento. Por exemplo, as células colhidas antes de uma ou mais rodadas de tratamento podem ser mais saudáveis, podem exibir níveis mais altos de certas atividades celulares, podem crescer mais rapidamente e/ou podem ser mais receptivas à manipulação genética do que as células submetidas a várias rodadas de tratamento. Outro exemplo de uma vantagem de acordo com modalidades descritas neste documento pode incluir conveniência. Por exemplo, coletando, opcionalmente processando e armazenando as células de um doador antes

que elas sejam necessárias para a terapia celular, as células estariam prontamente disponíveis se e quando um destinatário mais tarde precisar delas. Isso poderia aumentar a capacidade do laboratório de aférese, proporcionando aos técnicos maior flexibilidade para programar o processo de coleta de aférese.

[00518] Em algumas modalidades, as células crioconservadas (por exemplo, células selecionadas ou células em uma amostra (por exemplo, amostra de sangue, amostra de aférese, amostra de leucaférese)) podem ser armazenadas por um período de tempo inferior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 dias, ou um período de tempo inferior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas ou durante um período de tempo pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas ou por mais de 8 semanas. Em algumas modalidades, as células crioconservadas (por exemplo, células ou células selecionadas em uma amostra (por exemplo, amostra de sangue, amostra de aférese, amostra de leucaférese)) podem ser armazenadas por um período de tempo superior a ou em ou cerca de 1 mês, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 12 meses ou mais. Após o armazenamento, as células (por exemplo, células ou células selecionadas em uma amostra (por exemplo, amostra de sangue, amostra de aférese, amostra de leucaférese)) podem ser descongeladas e o processamento pode ser retomado a partir do mesmo ponto no processo. Em algumas modalidades, as células são crioprotegidas e armazenadas antes de processamento adicional, por exemplo, incubação sob condições estimulantes. Em modalidades particulares, as células de populações cultivadas e/ou formuladas são crioprotegidas e armazenadas antes de serem administradas a um objeto, por exemplo, tal como uma terapia celular autóloga.

[00519] Em modalidades particulares, as células são congeladas, por exemplo, após uma etapa de lavagem, por exemplo, para remover plasma e plaquetas. Em algumas modalidades, as células são conge-

ladas antes, subsequentemente e/ou durante qualquer uma das etapas associadas à fabricação e/ou geração de células, por exemplo, células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$, que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um CAR. Em certas modalidades, essas etapas podem incluir quaisquer etapas associadas à geração de células manipuladas geneticamente, incluindo, entre outras, seleção e/ou isolamento de um subconjunto de células, por exemplo, células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$, estimulação e/ou expansão de células, por exemplo células T ou um subconjunto das mesmas, ou transfecção ou transdução das células. Em algumas modalidades, as células são células de uma amostra de aférese coletada de um objeto, antes da seleção e/ou isolamento de células, da estimulação e/ou expansão de células, ou transfecção ou transdução de células. Em modalidades particulares, as células são congeladas após a conclusão de um processo de manipulação, por exemplo, após um processo que envolve uma ou mais etapas de isolamento, seleções, estimulação, ativação, transdução, transfecção e/ou expansão.

[00520] Em algumas modalidades, as células são suspensas em uma solução de congelamento, por exemplo, um crioprotetor e/ou uma solução contendo um crioprotetor. Qualquer uma de uma variedade de soluções e parâmetros de congelamento conhecidos em alguns aspectos pode ser usada, incluindo soluções de congelamento contendo meio de crioconservação ou vitrificação ou soluções contendo crioprotetor. Crioprotetores adequados incluem, mas não estão limitados a dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, glicol, propileno glicol, etileno glicol, propanodiol, polietileno glicol (PEG), 1,2-propanodiol (PROH) ou uma mistura dos mesmos. Em alguns exemplos, a solução de criopreservação pode conter um ou mais crioconservantes que não permeiam as células, incluindo, mas não se limitando a, polivinil pirrolidiona, um amido hidroxietil, um polissacarídeo, um monossacarídeo, um alginato,

trealose, rafmose, dextrano, albumina sérica humana, Ficoll, lipoproteínas, polivinilpirrolidona, hidroxietilamido, plasma autólogo ou uma mistura destes. Em algumas modalidades, as células são suspensas em uma solução de congelamento com uma concentração final de crioprotetor entre cerca de 1% e cerca de 20%, entre cerca de 3% e cerca de 9% ou entre cerca de 6% e cerca de 9% em volume, cada inclusive. Em certas modalidades, a concentração final de crioprotetor na solução de congelamento é de cerca de 3%, cerca de 4%, cerca de 5%, cerca de 5,5%, cerca de 6%, cerca de 6,5%, cerca de 7%, cerca de 7,5%, cerca de 8%, cerca de 8,5%, cerca de 9%, cerca de 9,5% ou cerca de 10% em volume.

[00521] Em algumas modalidades, as células, por exemplo, são congeladas em uma densidade celular específica, por exemplo, uma densidade celular conhecida ou controlada. Em certas modalidades, a densidade celular durante o processo de congelamento pode afetar a morte celular e/ou o dano celular que ocorre durante e/ou devido ao processo de congelamento. Por exemplo, em modalidades particulares, a densidade celular afeta o equilíbrio, por exemplo, o equilíbrio osmótico, com os arredores durante o processo de congelamento. Em algumas modalidades, esse equilíbrio é, inclui e/ou resulta em desidratação. Em certas modalidades, a desidratação é ou inclui a desidratação celular que ocorre com contato, combinação e/ou incubação com uma solução de congelamento, por exemplo, DMSO e/ou uma solução contendo DMSO. Em modalidades particulares, a desidratação é ou inclui a desidratação resultante da nucleação e ampliação de cristais de gelo no espaço extracelular, tal como por exemplo, reduzindo a concentração efetiva de água líquida exposta às células. Em algumas modalidades, as células são congeladas em uma densidade celular que resulta em desidratação mais lenta e/ou menos rápida do que as células que são congeladas em uma densidade celular diferente, por

exemplo, maior ou menor. Em algumas modalidades, as células são congeladas a uma densidade celular que resulta em cerca de, pelo menos, ou em 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80 %, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, desidratação 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 50 vezes ou 100 mais lenta que células congeladas a uma densidade celular diferente, por exemplo, superior ou inferior, nas mesmas condições ou em condições semelhantes.

[00522] Em algumas modalidades, o crioprotetor é DMSO. Em modalidades particulares, as células são suspensas em uma solução de congelamento com uma concentração final de DMSO entre cerca de 1% e cerca de 20%, entre cerca de 3% e cerca de 9% ou entre cerca de 6% e cerca de 9% em volume, cada inclusive. Em certas modalidades, a concentração final de DMSO na solução de congelamento é cerca de 3%, cerca de 4%, cerca de 5%, cerca de 5,5%, cerca de 6%, cerca de 6,5%, cerca de 7%, cerca de 7,5%, cerca de 8%, cerca de 8,5%, cerca de 9%, cerca de 9,5% ou cerca de 10% em volume.

[00523] Em modalidades particulares, as células são suspensas em uma solução de congelamento a uma densidade entre ou entre cerca de 0,1 × 10^6 células/mL e cerca de 5.000 × 10^6 células/mL, entre ou entre cerca de 1 × 10^6 células/mL e cerca de 500 × 10^6 células/mL, entre ou entre cerca de 5 × 10^6 células/mL e cerca de 150 × 10^6 células/mL, entre ou entre cerca de 10 × 10^6 células/mL e cerca de 70 × 10^6 células/mL, ou entre ou entre cerca de 15 × 10^6 células/mL e cerca de 60 × 10^6 células/mL, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, as células são células viáveis.

[00524] Em certas modalidades, as células são suspensas em uma solução de congelamento a uma densidade entre ou entre cerca de 1 × 10^6 células/mL e cerca de 1 × 10^8 células/mL, entre cerca de 1 × 10^6 células/mL e cerca de 2 × 10^7 células/mL, entre cerca de 1 × 10^7 célu-

las/mL e cerca de 5 × 107 células/mL, ou entre cerca de 1 × 10^7 células/mL e 5 × 10^7 células/mL, cada uma inclusive. Em certas modalidades, as células são suspensas na solução de congelamento a uma densidade de cerca de 1 × 106 células/mL, cerca de 2 × 10^6 células/mL, cerca de 5 × 10^6 células/mL, cerca de 1 × 10^7 células/mL, cerca de 1,5 × 10^7 células/mL, cerca de 2 × 10^7 células/mL, cerca de 2,5 × 10^7 células/mL, cerca de 2,5 × 10^7 células/mL, cerca de 2,5 × 10^7 células/mL, cerca de 3 × 10^7 células/mL, cerca de 3 × 10^7 células/mL, cerca de 3,5 × 10^7 células/mL, cerca de 4 × 10^7 células/mL, cerca de 4,5 × 10^7 células/mL ou cerca de 5 × 10^7 células/mL, cada uma inclusive. Em certas modalidades, as células são suspensas na solução de congelamento a uma densidade entre cerca de 1,5 × 10^7 células/mL e cerca de 6 × 10^7 células/mL, cada uma inclusive. Em certas modalidades, as células são suspensas em uma solução de congelamento a uma densidade de pelo menos cerca de 1 × 10^7 células/mL. Em modalidades particulares, as células são suspensas em uma solução de congelamento a uma densidade de pelo menos cerca de 1,5 x 10^7 células/mL. Em algumas modalidades, as células são células viáveis.

[00525] Em algumas modalidades, as células são congeladas em um recipiente. Em certas modalidades, o recipiente é um recipiente de congelamento e/ou um recipiente crioprotetor. Recipientes adequados para congelamento criogênico incluem, mas não estão limitados a frascos, bolsas, por exemplo, bolsas plásticas e bastões. Em modalidades particulares, células, por exemplo, células da mesma composição de célula, tal como uma composição de célula contendo células que expressam CAR, são congeladas em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 ou mais de 10 recipientes separados. Por exemplo, em algumas modalidades, as células e/ou uma composição de célula são suspensas em um volume, por exemplo, tal como em uma solução, uma solução de congelamento e/ou um crioprotetor, e que é maior que um volume

adequado para um recipiente e, portanto, o volume é colocado em dois ou mais recipientes. Em algumas modalidades, o volume é, é de cerca de, ou menor do que 100 mL, 50 mL, 25 mL, 20 mL, 15 mL, 10 mL, 5 mL ou menor do que 5 mL, e as células são congeladas em dois, três, quatro, cinco seis, sete, oito, nove, dez ou mais de dez frascos separados. Em modalidades particulares, o mesmo volume de células é colocado em cada frasco. Em algumas modalidades, os frascos são frascos idênticos, por exemplo, frascos da mesma marca, modelo e/ou lote de fabricação. Em modalidades particulares, o volume é, é cerca de, ou maior do que 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 120 mL, 150 mL, 200 mL ou maior do que 200 mL e as células são congeladas em dois, três, quatro, cinco seis, sete, oito, nove, dez ou mais de dez bolsas separados. Em modalidades particulares, o mesmo volume de células é colocado em cada bolsa. Em algumas modalidades, as bolsas são bolsas idênticas, por exemplo, bolsas da mesma marca, modelo e/ou lote de fabricação.

[00526] Em algumas modalidades, o recipiente é um frasco. Em certas modalidades, o recipiente é um frasco com um volume de preenchimento de, de cerca de, ou de pelo menos 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 11 mL, 12 mL, 13 mL, 14 mL, 15 mL, 16 mL, 17 mL, 18 mL, 19 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, ou 50 mL. Em algumas modalidades, o frasco tem um volume de preenchimento dentre 1 mL e 120 mL, 1 mL e 20 mL, 1 mL e 5 mL, 1 mL e 10 mL, 1 mL e 40 mL ou 20 mL e 40 mL, cada um inclusive. Em algumas modalidades, o frasco é um frasco de congelamento, frasco crioprotetor e/ou um criofrasco. Os frascos adequados são conhecidos e incluem, sem limitação, os frascos CellSeal® (Cook Regentec) e os frascos descritos nas patentes U.S. Nos: US 8.936.905, US 9.565.854 e US 8.709.797, aqui incorpo-

radas por referência na sua totalidade.

[00527] Em modalidades particulares, o recipiente é uma bolsa. Em certas modalidades, o recipiente é uma bolsa com um volume de preenchimento de, de cerca de, ou pelo menos 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 11 mL, 12 mL, 13 mL, 14 mL, 15 mL, 16 mL, 17 mL, 18 mL, 19 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, ou 50 mL. Em algumas modalidades, a bolsa tem um volume de preenchimento entre 1 mL e 120 mL, 1 mL e 20 mL, 1 mL e 5 mL, 1 mL e 40 mL, 20 mL e 40 mL, 1 mL e 70 mL ou 50 mL e 70 mL, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, a bolsa é preenchida com um volume de, de cerca de, ou menos de 100 mL, 75 mL, 70 mL, 50 mL, 25 mL, 20 mL ou 10 mL. Bolsas adequadas são conhecidas e incluem, entre outras, as Bolsas de Congelamento CryoMacs® (Miltenyi Biotec). Em certas modalidades, o volume é o volume à temperatura ambiente. Em algumas modalidades, o volume é o volume entre 37 ºC e 4 ºC, 16 ºC e 27 ºC, cada uma inclusive, ou a, a cerca de, ou pelo menos a 16 ºC, 17 ºC, 18 ºC, 19 ºC, 20 ºC, 21 ºC, 22 ºC, 23 ºC, 24 ºC, 25 ºC, 26 ºC, 27 ºC, 28 ºC, 29 ºC, 30 ºC, 31 ºC, 32 ºC, 33 ºC, 34 ºC, 35 ºC, 36 ºC ou 37 ºC. Em algumas modalidades, o volume é o volume a 25 ºC.

[00528] Em algumas modalidades, células em um volume de meio ou solução, por exemplo, solução de congelamento, entre 1 mL e 20 mL são congeladas em um ou mais frascos, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, os um ou mais frascos têm um volume de preenchimento entre 1 mL e 5 mL, cada uma inclusive. Em certas modalidades, as células em um volume de meio ou solução, por exemplo, solução de congelamento, entre 20 mL e 120 mL, cada uma inclusive, são congeladas em uma ou mais bolsas. Em modalidades particulares, as uma ou mais bolsas têm um volume de preenchimento entre 20 mL e 40 mL, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, as células em

um volume de meio ou solução, por exemplo, solução de congelamento, de 120 mL ou mais, são congeladas em uma ou mais bolsas. Em certas modalidades, as uma ou mais bolsas têm um volume de preenchimento entre 50 mL e 70 mL, cada uma inclusive.

[00529] Em certas modalidades, as células são congeladas em solução, por exemplo, solução de congelamento, que é colocada em um recipiente, por exemplo, uma bolsa ou um frasco, em uma razão de área de superfície para volume. Em modalidades particulares, a razão da área de superfície para volume é de ou de cerca de 0,1 cm^{-1} a 100 cm^{-1}; 1 cm^{-1} a 50 cm^{-1}, 1 cm^{-1} a 20 cm^{-1}, 1 cm^{-1} a 10 cm^{-1}, 2 cm^{-1} a 10 cm^{-1}, 3 cm^{-1} a 7 cm^{-1}, ou 3 cm^{-1} a 6 cm^{-1}, cada uma inclusive. Em modalidades particulares, a razão de área de superfície para volume está entre ou entre cerca de 3 cm^{-1} e 6 cm^{-1}. Em algumas modalidades, a área da superfície em relação ao volume é, é em ou cerca de ou está em pelo menos 3 cm^{-1}, 4 cm^{-1}, 5 cm^{-1}, 6 cm^{-1} ou 7 cm^{-1}.

[00530] Em algumas modalidades, a transferência para o meio de criopreservação está associada a uma ou mais etapas de processamento que podem envolver a lavagem da amostra, por exemplo, composição de célula manipulada geneticamente, tal como remover o meio e/ou substituir as células em um tampão de criopreservação apropriado ou meio para congelamento subsequente. Em certas modalidades, a transferência para o meio de criopreservação é totalmente automatizada em nível de escala clínica em um sistema fechado e estéril. Em certas modalidades, a transferência para o meio de criopreservação realizada usando o sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec).

[00531] Em algumas modalidades, as células são descongeladas. Em modalidades particulares, as células são descongeladas rapidamente, por exemplo, o mais rápido possível, sem superaquecer as células ou expor as células a altas temperaturas, tal como acima de 37 ºC. Em algumas modalidades, o descongelamento rápido reduz e/ou

impede a exposição das células a altas concentrações de crioprotetor e/ou DMSO. Em modalidades particulares, a taxa na qual o descongelamento ocorre pode ser afetada pelas propriedades do recipiente, por exemplo, o frasco e/ou a bolsa, em que as células são congeladas e descongeladas. Em modalidades particulares, as células são descongeladas a uma temperatura de, em ou cerca de ou abaixo de 37 ºC, 35 ºC, 32 ºC, 30 ºC, 29 ºC, 28 ºC, 27 ºC, 26 ºC, 25 ºC, 24 ºC, 23 ºC, 22 ºC, 21 ºC, 20 ºC ou 15 ºC, ou entre 15 ºC e 30 ºC, entre 23 ºC e 28 ºC, ou entre 24 ºC e 26 ºC, cada uma inclusive. Em algumas modalidades, as células são descongeladas em um bloco de calor ou em um banho de água. Em certas modalidades, as células não são descongeladas em um bloco de calor ou banho de água. Em algumas modalidades, as células são descongeladas à temperatura ambiente. Em algumas modalidades, a espessura do recipiente, as paredes, afeta a taxa de descongelamento de células, como, por exemplo, células em recipientes com paredes espessas descongelam a uma taxa mais lenta do que em recipientes com paredes mais finas. Em algumas modalidades, os recipientes com uma baixa razão de área de superfície e volume têm uma taxa lenta e/ou desigual de descongelamento. Em algumas modalidades, as células crioconservadas são descongeladas rapidamente em um recipiente com uma razão de área de superfície para volume que é, é de em ou cerca de ou é pelo menos 1 cm^{-1}, 2 cm^{-1}, 3 cm^{-1}, 4 cm^{-1}, 5 cm -1, 6 cm^{-1} ou 7 cm^{-1}, 8 cm^{-1}, 9 cm^{-1} ou 10 cm^{-1}. Em modalidades particulares, as células são descongeladas em, ou cerca de, ou menos de 120 minutos, 90 minutos, 60 minutos, 45 minutos, 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos ou dez minutos. Em algumas modalidades, as células são descongeladas entre 10 minutos e 60 minutos, 15 minutos e 45 minutos ou 15 minutos e 25 minutos, cada uma inclusive. Em modalidades particulares, as células são descongeladas, em cerca de, ou em menos de 20 minutos.

[00532] Em certas modalidades, as células descongeladas são repousadas, por exemplo, incubadas ou cultivadas, antes da administração ou antes de quaisquer etapas subsequentes de manipulação e/ou processamento. Em algumas modalidades, as células são repousadas em quantidades baixas e/ou indetectáveis de crioprotetor, ou na ausência de crioprotetor, por exemplo, DMSO. Em modalidades particulares, as células descongeladas são repousadas após ou imediatamente após as etapas de lavagem, por exemplo, para remover o crioprotetor e/ou DMSO. Em algumas modalidades, o repouso é ou inclui cultura e/ou incubação a ou até cerca de 37 ºC. Em algumas modalidades, o repouso é realizado na ausência de quaisquer reagentes, por exemplo, reagentes estimulatórios, reagentes de contas ou citocinas recombinantes, usados com e/ou associados a qualquer etapa de processamento ou manipulação. Em algumas modalidades, as células são repousadas por, por cerca de, ou pelo menos 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas ou 24 horas. Em certas modalidades, as células são repousadas por, por cerca de, ou pelo menos 2 horas.

[00533] Em algumas modalidades, as células são congeladas, por exemplo, crioconservadas, antes, durante ou após os referidos métodos para processamento e/ou manipulação das células. Em algumas modalidades, a etapa de congelamento e descongelamento subsequente remove granulócitos e, até certo ponto, monócitos na população celular. As células são geralmente congeladas a -80 ºC a uma taxa de 1 ° por minuto e armazenadas na fase de vapor de um tanque de armazenamento de nitrogênio líquido. Em algumas modalidades, as células são resfriadas ativa e/ou efetivamente a uma taxa de ou de cerca de 1 ° por minuto usando um freezer de taxa controlada. Em algumas modalidades, as células podem ser congeladas com um freezer

de taxa controlada. Em alguns aspectos, os freezers de taxa controlada são usados para congelar células com perfis de resfriamento programados, por exemplo, perfis com múltiplas taxas de resfriamento e/ou aquecimento. Tais perfis de congelamento podem ser programados para controlar a nucleação, por exemplo, formação de gelo, por exemplo, para reduzir a formação de gelo intracelular.

[00534] Em algumas modalidades, características das células congeladas, incluindo qualquer uma das células e composições descritas, tal como composições de células em uma concentração ou densidade celular específica, congeladas na presença de um crioprotetor e/ou preenchidas em um recipiente em um volume particular ou relação superfície para volume, incluem expansão aperfeiçoada, aumentada e/ou mais rápida; aumento da sobrevivência celular aumentada e/ou aperfeiçoada e instâncias reduzidas de morte celular, por exemplo, necrose, morte celular programada e/ou apoptose; atividade melhorada, aperfeiçoada e/ou aumentada, por exemplo, atividade citolítica; e/ou ocorrência reduzida de senescência ou quiescência após o descongelamento do que as células congeladas por meios alternativos.

[00535] Em modalidades particulares, as células são congeladas em uma densidade celular e/ou uma razão de área de superfície para volume aqui fornecidas e têm morte celular reduzida, por exemplo, necrose e/ou apoptose, durante e/ou resultante do congelamento, criocongelamento e congelamento, e/ou criopreservação, em comparação com células congeladas em uma densidade celular diferente e/ou em uma razão área para superfície diferente em volume nas mesmas condições ou em condições semelhantes. Em modalidades particulares, as células são congeladas em uma densidade celular e/ou uma razão área de superfície para volume aqui fornecidas e reduziram a morte celular retardada, por exemplo, uma redução na quantidade de células que morrem, por exemplo, por necrose, morte celular progra-

mada ou apoptose, dentro de 48 horas após o congelamento, criocongelamento e/ou criopreservação, por exemplo após o descongelamento das células congeladas. Em certas modalidades, pelo menos ou cerca de 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 99% menos células morrem durante e/ou resultante de congelamento e/ou criopreservação, em comparação com células que são congeladas em uma densidade celular diferente e/ou em uma razão de área de superfície para volume diferente sob as mesmas condições ou condições semelhantes. Em certas modalidades, menos de 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1% ou 0,01% das células congeladas na densidade celular fornecida e/ou razão de área de superfície para volume morrem durante ou como resultado de congelamento, criocongelamento e/ou criopreservação.

[00536] Em algumas modalidades, as células são congeladas em uma densidade celular e/ou uma razão de área de superfície para volume aqui fornecidas e têm instâncias reduzidas de senescência ou quiescência devido a e/ou resultantes do congelamento, criocongelamento e/ou criopreservação, em comparação com as células congeladas em uma densidade celular diferente e/ou em uma razão de área de superfície para volume diferente nas mesmas condições ou em condições semelhantes. Em modalidades particulares, pelo menos ou cerca de 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 99% menos células são senescentes e/ou células inativas, em comparação com células congeladas em uma densidade celular diferente e/ou em uma razão de área de superfície para volume diferente sob as mesmas condições ou condições semelhantes. Em certas modalidades, as células são congeladas na densidade celular fornecida e/ou razão de área de superfície para volume e menor que 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, ou 0,01% das células se tornam senescentes e/ou quiescentes, tal como resultado do congelamento,

criocongelamento e/ou criopreservação.

[00537] Em certas modalidades, as células são congeladas, por exemplo, crioconservadas, em uma densidade de células e/ou razão de área de superfície para volume aqui fornecidas e têm expansão melhorada, mais rápida e/ou mais veloz, por exemplo, sob condições estimulantes, tal como por incubação com um reagente estimulatório aqui descrito, depois que as células são descongeladas, em comparação com células congeladas em uma densidade celular diferente e/ou razão de área de superfície para volume sob as mesmas condições ou condições semelhantes. Em modalidades particulares, as células se expandem a uma taxa que é mais rápida e/ou mais rápida em, em cerca de, ou pelo menos 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 1 vez, 1,5 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em comparação com as células congeladas a uma densidade celular diferente e/ou razão de área de superfície para volume diferente nas mesmas condições ou em condições semelhantes. Por exemplo, em algumas modalidades, as células descongeladas atingem uma expansão limite, por exemplo, um número de células predeterminado, densidade ou fator predeterminado, tal como uma expansão de duas vezes, em, em cerca de, ou em pelo menos 5% 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99%, menos tempo do que as células descongeladas que foram congeladas em uma densidade celular diferente e/ou razão de área de superfície para volume diferente sob as mesmas condições ou condições semelhantes.

[00538] Em algumas modalidades, as células são congeladas, por exemplo, crioconservadas, na densidade celular e têm atividade citolítica melhorada, aumentada e/ou mais, por exemplo, tal como medida por qualquer ensaio para medir a atividade citolítica aqui descrita, após as células serem descongeladas, em comparação com as células con-

geladas em uma densidade celular diferente, por exemplo, uma densidade maior ou menor, nas mesmas condições ou em condições semelhantes. Em modalidades particulares, a atividade citolítica é aumentada em, em cerca de, ou em pelo menos 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 1 vez, 1,5 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em comparação com células congeladas em uma densidade diferente sob as mesmas condições ou semelhantes. Métodos e sistemas exemplares para armazenamento e processamento criogênico de células de uma amostra, tal como uma amostra de aférese, podem incluir os descritos no pedido internacional publicado No. WO2018170188. Em algumas modalidades, o método e sistemas envolvem a coleta de aférese antes que o paciente precise de terapia celular e, em seguida, sujeitando a amostra de aférese à criopreservação para uso posterior em um processo de manipulação das células, por exemplo, células T, com um receptor recombinante (por exemplo, CAR). Em alguns casos, esses processos podem incluir os aqui descritos. Em algumas modalidades, uma amostra de aférese é coletada de um objeto e crioconservada antes da seleção subsequente de células T, ativação, estimulação, manipulação, transdução, transfecção, incubação, cultura, colheita, formulação de uma população de células e/ou administração de a população celular formulada a um objeto. Em tais exemplos, a amostra de aférese crioconservada é descongelada antes de submeter a amostra a uma ou mais etapas de seleção, tal como qualquer uma descrita aqui.

[00539] Em algumas modalidades, a amostra de células crioconservada e/ou crioprotegida (por exemplo, amostra de aférese ou leucaférese), tal como uma amostra de células que não foi submetida a uma seleção anterior de células (por exemplo, sem seleção prévia de células T, tal como como seleção por cromatografia) é descongelada antes de seu uso em processos a jusante para a fabricação de uma popula-

ção de células para terapia celular, por exemplo, uma população de células T contendo células T CAR^+. Em algumas modalidades, uma amostra de células crioconservada e/ou crioprotegida (por exemplo, amostra de aférese ou leucaférese) é usada em conexão com o processo aqui fornecido para manipulação de uma terapia de células T, tal como uma terapia de células T CAR^+. Em exemplos particulares, nenhuma etapa adicional de criopreservação é realizada antes ou durante as etapas de colheita/formação.

1. Recursos de Composição de Entrada

[00540] Em algumas modalidades, a composição de entrada inclui células T isoladas ou selecionadas a partir de uma amostra biológica, por exemplo uma amostra de aférese, amostra de leucaférese. Em algumas modalidades, a composição de entrada pode ser crioconservada de acordo com qualquer um dos métodos aqui descritos. Em modalidades particulares, a composição de entrada compreende uma população de células T $CD3^+$ enriquecidas, por exemplo, células T $CD3^+$ viáveis. Em algumas modalidades, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9% ou em ou em cerca de 100% das células da composição de entrada são células T $CD3^+$, por exemplo, células T $CD3^+$ viáveis. Em algumas modalidades, a composição de entrada consiste essencialmente em células T $CD3^+$, por exemplo, células T $CD3^+$ viáveis. Em algumas modalidades, a composição de entrada é enriquecida em células $CD4^+$ e/ou é enriquecida em células $CD8^+$.

[00541] Em certas modalidades, a composição de entrada é uma população de células enriquecidas para células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$ enriquecidas, por exemplo, células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$. Em modalidades particulares, a composição de entrada é ou inclui pelo

menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9% ou em ou em cerca de 100% células que são células T $CD4^+$ ou $CD8^+$. Em algumas modalidades, a composição de entrada consiste essencialmente em células T $CD4^+$ e $CD8^+$.

[00542] Em certas modalidades, a composição de entrada é uma população de células T $CD4^+$ enriquecidas. Em modalidades particulares, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9% ou em ou em cerca de 100% das células da composição de entrada são células T $CD4^+$. Em algumas modalidades, a composição de entrada consiste essencialmente em células T $CD4^+$.

[00543] Em certas modalidades, a composição de entrada é uma população de células T $CD8^+$ enriquecidas. Em modalidades particulares, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9% ou em ou em cerca de 100% das células da composição de entrada são células T $CD8^+$. Em algumas modalidades, a composição de entrada consiste essencialmente em células T $CD8^+$.

[00544] Em algumas modalidades, as células de uma população de células T $CD4^+$ enriquecidas e as células de uma população de células T $CD8^+$ enriquecidas são misturadas, combinadas e/ou agrupadas para gerar uma composição de entrada contendo células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$. Em certas modalidades, as populações de células T $CD4^+$ enriquecidas e células T $CD8^+$ são agrupadas, misturadas e/ou combinadas antes das células estimulantes, por exemplo, cultivar as células sob condições estimulantes, tal como descrito na Seção II-B. Em cer-

tas modalidades, as populações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ enriquecidas são agrupadas, misturadas e/ou combinadas subsequentemente ao isolamento, enriquecimento e/ou seleção das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ a partir de uma amostra biológica. Em modalidades particulares, as populações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ enriquecidas são agrupadas, misturadas e/ou combinadas após o congelamento, por exemplo, criopreservação e descongelamento das populações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ enriquecidas.

[00545] Em certas modalidades, a composição de entrada é produzida, gerada ou feita misturando, agrupando e/ou combinando células de uma população de células $CD4^+$ enriquecidas com células de uma população de células $CD8^+$ enriquecidas. Em certas modalidades, a população de células T $CD4^+$ enriquecidas contém pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 95%, 98%, 99% ou 99,9% de células T $CD4^+$. Em modalidades particulares, a população de células T $CD4^+$ enriquecidas contém 100% de células T $CD4^+$ ou contém cerca de 100% de células T $CD4^+$. Em certas modalidades, a população de células T enriquecidas inclui ou contém menos de 20%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 1%, menos de 0,1% ou menos de 0,01% de células T $CD8^+$ e/ou não contém células T $CD8^+$ e/ou está livre ou substancialmente livre de células T $CD8^+$. Em algumas modalidades, as populações de células consistem essencialmente em células T $CD4^+$. Em certas modalidades, a população de células T $CD8^+$ enriquecidas contém pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou 99,9% de células T $CD8^+$, ou contém ou contém cerca de 100% $CD8^+$ Células T. Em certas modalidades, a população de células T $CD8^+$ enriquecidas inclui ou contém menos de 20%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 1%, menos de 0,1% ou menos de 0,01% de células T $CD4^+$ e/ou não contém células T $CD4^+$ e/ou está livre ou substancialmente livre de células T $CD4^+$. Em algumas modalidades,

as populações de células consistem essencialmente em células T $CD8^+$.

[00546] Em certas modalidades, as células T $CD4^+$ e as células T $CD8^+$ são agrupadas, misturadas e/ou combinadas em uma razão entre 1:10 e 10:1, entre 1:5 e 5:1, entre 4:1 e 1: 4, entre 1:3 e 3:1, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5: 1 e 1:1,5, entre 1,25:1 e 1:1,25, entre 1,2:1 e 1:1,2, entre 1,1:1 e 1:1,1, ou cerca de 1:1 ou 1:1 de células T $CD4^+$ para células T $CD8^+$. Em modalidades particulares, as células T $CD4^+$ viáveis e as células T $CD8^+$ viáveis são agrupadas, misturadas e/ou combinadas em uma razão entre 1:10 e 10:1, entre 1:5 e 5:1, entre 4:1 e 1:4, entre 1:3 e 3:1, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5: 1 e 1:1,5, entre 1,25:1 e 1:1,25, entre 1,2:1 e 1:1,2, entre 1,1:1 e 1:1,1, ou cerca de 1:1 ou 1:1 de células T $CD4^+$ para células T $CD8^+$.

[00547] Em modalidades particulares, a composição de entrada contém células (por exemplo, células T) que não são positivas para um marcador apoptótico. Em algumas modalidades, o marcador apoptótico é a Anexina V e/ou caspase ativada 3. Em algumas modalidades, as células contidas na composição de entrada incluem ou são anexina V−, anexina V−/$CD3^+$, anexina V−/$CD4^+$, anexina V−/$CD8^+$, anexina V−/$CD3^+$, caspase ativada 3−, caspase ativada 3−/$CD3^+$, caspase ativada 3−/$CD4^+$, caspase ativada 3−/$CD8^+$ ou uma combinação dos mesmos.

[00548] Em algumas modalidades, a composição de entrada contém um número ou porcentagem alvo (por exemplo, não mais do que 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 % ou 95%) de células T que não expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3, Anexina V). Em algumas modalidades, a composição de entrada contém um número alvo ou porcentagem de células T que produzem citocinas após estimulação. Em algumas modalidades, a estimulação não é específica do antígeno do receptor recombinante (por

exemplo, CAR), por exemplo, estimulação envolvendo PMA/ionomicina. Em algumas modalidades, as citocinas produzidas são ou incluem IL-2, TNFα e/ou IFNg. Em algumas modalidades, as citocinas produzidas são ou incluem IL-2 e/ou TNFα. Em algumas modalidades, o método envolve fornecer, produzir ou gerar uma composição de entrada. Em algumas modalidades, a composição de entrada compreendendo uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em algumas modalidades, a composição de entrada contém células T que não expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3, Anexina V).

[00549] Em alguns aspectos, a composição de entrada pode ser gerada fornecendo, a partir de uma amostra biológica de um objeto, uma composição de célula contendo uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em alguns aspectos, a composição de entrada pode ser gerada fornecendo, a partir de uma amostra biológica de um objeto, uma composição de célula contendo uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em alguns aspectos, a composição de entrada pode ser gerada após a determinação do número, número por volume, número por peso e/ou porcentagem de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou $CD4^+$ T células que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e seleção de um número, volume ou peso específico de células que, ao misturar com componentes adicionais, contém uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em alguns aspectos, a composição de

entrada pode ser gerada misturando uma composição de célula contendo células T $CD4^+$ e uma célula composição contendo células T $CD8^+$. Em algumas modalidades, a composição de entrada pode ser gerada após a determinação do número, número por volume, número por peso e/ou porcentagem das células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, anexina V) e/ou células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, anexina V) e seleção de um número, volume ou peso específico de células que, ao misturar com componentes adicionais, contém uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, anexina V) e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, Anexina V).

[00550] Em algumas modalidades, a composição de entrada pode ser gerada isolando, purificando, separando ou selecionando, a partir de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um número alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, gerando assim uma composição de entrada. Em algumas modalidades, a composição de entrada pode ser gerada isolando, purificando, separando ou selecionando, a partir de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, Anexina V) e/ou um número alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, anexina V), gerando assim uma compo-

sição de entrada. Em alguns aspectos, esses números-alvo de células podem ser combinados ou misturados para gerar uma composição de entrada que compreende uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em alguns aspectos, esses números-alvo de células podem ser combinados ou misturados para gerar uma composição de entrada que compreende uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo,, caspase 3, anexina V) e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27, CD45RA e/ou marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, anexina V).

[00551] Em alguns aspectos, a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de células $CD4^+/CCR7^+$, $CD4^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$, $CD8^+/CCR7^+$, $CD8^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$. Em alguns aspectos, a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de $CD4^+/CCR7^+$, $CD4^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$, $CD8^+/CCR7^+$, $CD8^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$ e células com marcador de apoptose negativo (por exemplo, Anexina V– ou Caspase 3-).

[00552] Em algumas modalidades, a composição de entrada contém células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$. Em certas modalidades, a composição de entrada um ou mais subtipos ou populações de células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$. Em certas modalidades, os um ou mais subtipos ou populações incluem células que expressam, por exemplo, expressam na superfície da célula, ou não expressam, um ou mais marcadores associados a determinados fenótipos celulares, incluindo marcadores

associados ou indicativos de uma menor fenótipo celular diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula da memória. Em modalidades particulares, a composição de entrada contém células T $CD4^+$ e pelo menos uma porção das células T $CD4^+$ expressa marcadores associados a um fenótipo menos diferenciado, tal como CCR7 e/ou CD27. Em algumas modalidades, a composição de entrada contém células T $CD8^+$ e pelo menos uma porção das células T $CD8^+$ expressa marcadores associados a um fenótipo menos diferenciado, tal como CCR7 e/ou CD27. Em modalidades particulares, a composição de entrada contém e/ou possui uma porcentagem ou razão fixa, preferida, alvo, definida e/ou controlada de células que exibem o fenótipo particular, por exemplo, uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

[00553] Em certas modalidades, os métodos incluem uma ou mais etapas de mistura ou combinação de células ou composições de células para gerar ou produzir uma composição de entrada. Em certas modalidades, as células ou composições de células foram selecionadas e/ou isoladas de uma amostra. Em algumas modalidades, as células da composição de entrada foram selecionadas e/ou isoladas de uma amostra. Em algumas modalidades, as células T $CD4^+$ e/ou uma composição de célula T $CD4^+$ são selecionadas ou isoladas de uma amostra. Em algumas modalidades, as células T $CD8^+$ e/ou uma composição de célula T $CD8^+$ são selecionadas ou isoladas de uma amostra. Em algumas modalidades, a amostra é uma amostra biológica, tal como amostra de sangue, amostra de aférese e/ou amostra de leucaférese. Em certas modalidades, a amostra é de um objeto, por exemplo, um objeto humano. Em modalidades particulares, a composição de célula T $CD4^+$ e a composição de célula T $CD8^+$ são isoladas e/ou

selecionadas da mesma amostra. Em certas modalidades, a composição de célula T $CD4^+$ e a composição de célula T $CD8^+$ são isoladas e/ou selecionadas a partir de amostras colhidas ou obtidas do mesmo objeto.

[00554] Em algumas modalidades, a geração ou produção de uma composição de entrada inclui uma ou mais etapas de avaliação, caracterização e/ou identificação de células. Em modalidades particulares, as células são avaliadas, caracterizadas e/ou identificadas em uma composição de célula T $CD4^+$. Em algumas modalidades, as células são avaliadas, caracterizadas e/ou identificadas em uma composição de célula T $CD8^+$. Em algumas modalidades, as células são positivas para um marcador que indica e/ou está associado a um fenótipo ou estado celular menos diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula de memória. Em certas modalidades, as células são negativas para um marcador que indica e/ou está associado a um estado mais diferenciado nas células T. Em modalidades particulares, as células das composições de célula T $CD4^+$ e $CD8^+$ são avaliadas, caracterizadas e/ou identificadas para determinar a quantidade, nível, porção e/ou porcentagem de células positivas para um ou mais marcadores associados a fenótipo de células menos diferenciados ou estado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula da memória e/ou são negativos para um ou mais marcadores associados a um estado mais diferenciado. Em certas modalidades, as células das composições de célula T $CD4^+$ e $CD8^+$ são avaliadas, caracterizadas e/ou identificadas para determinar a quantidade, nível, porção e/ou porcentagem de células que exibem os fenótipos particulares, por exemplo, expressão ou falta de expressão dos marcadores associados a um fenótipo ou estado celular menos diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula de memória.

[00555] Em algumas modalidades, os métodos incluem uma ou mais etapas de misturar ou combinar uma composição de célula contendo células T $CD4^+$ com uma composição de célula contendo células T $CD8^+$ para gerar ou produzir uma composição de célula, por exemplo, uma composição de entrada, com uma porcentagem alvo de células T que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em algumas modalidades, a geração ou produção da composição de entrada inclui uma ou mais etapas de: (i) isolar ou selecionar uma composição de célula T $CD4^+$ e/ou uma composição de célula T $CD8^+$ a partir de uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica; (ii) avaliar, caracterizar e/ou identificar a quantidade, nível, porção e/ou porcentagem de células positivas ou negativas para um ou mais marcadores associados a um fenótipo ou estado celular menos diferenciado e/ou marcadores associados a ou indicativo de um subtipo de célula da memória ou de um subtipo mais diferenciado, por exemplo, CCR7, CD27 e/ou CD45RA, na composição de célula T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$; e/ou (iii) misturar ou combinar células de uma composição de célula T $CD4^+$ com células de uma composição de célula T $CD8^+$ em uma porcentagem alvo, definida, fixa e/ou preferida de células T que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou porcentagem de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA na composição de entrada são diferentes da razão que está presente na amostra.

[00556] Em alguns aspectos, a porcentagem alvo de células $CD4^+/CCR7^+$, $CD4^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$, $CD8^+/CCR7^+$, $CD8^+$ $CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$ na composição de entrada incluem, pelo menos, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90 % do total de células na composição de entra-

da, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, do total células na composição de entrada sendo $CD4^+/CCR7^+$, $CD4^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/$ CD45RA+, $CD8^+/CCR7^+$, $CD8^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD8^+/CDR$ $+/CD45RA^-$ e/ou $CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$.

[00557] Em algumas modalidades, a porcentagem alvo de células $CCR7^+$, $CD27^+$ e/ou $CCR7^+/CD27^+$ na composição de entrada é de pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80 % ou 90% do total de células na composição de entrada, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células totais na composição de entrada sendo células $CCR7^+$, $CD27^+$ e/ou $CCR7^+/CD27^+$.

[00558] Em algumas modalidades, os métodos incluem uma ou mais etapas de manipulação genética das células da composição de entrada. Em algumas modalidades, a manipulação genética inclui uma ou mais etapas de incubar as células da composição de entrada sob condições que ativam e/ou simulam as células, entregar um ou mais agentes compreendendo uma molécula de ácido nucleico, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico recombinante e/ou heteróloga para as células, expandir as células por incubação das células em condições de ativação ou estimulação, colher as células e/ou armazenar as células por congelamento, por exemplo, criopreservação. Em algumas modalidades, as uma ou mais etapas da manipulação genética produzem uma composição de célula de saída contendo células manipuladas geneticamente. Em certas modalidades, as células manipuladas geneticamente da composição de saída têm uma razão fixa, definida e/ou alvo de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante ($receptor^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA em relação ao $receptor^+/CD4^+$ T células que expressam ou não ex-

pressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$ T que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

B. Ativação e Estimulação de Células

[00559] Em algumas modalidades, as uma ou mais etapas de processamento incluem uma etapa de estimular as células isoladas, tal como populações de células selecionadas. Em algumas modalidades, as células são incubadas e/ou cultivadas antes ou em conexão com a manipulação genética. A incubação pode ser anterior ou em conexão com a manipulação genética, tal como a manipulação genética resultante de modalidades do método de transdução descrito acima. Em algumas modalidades, a estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células, por exemplo, antes da transdução. As etapas de incubação podem incluir cultura, cultivo, estimulação, ativação e/ou propagação. A incubação e/ou manipulação pode ser realizada em um recipiente de cultura, tal como uma unidade, câmara, poço, coluna, tubo, conjunto de tubulação, válvula, frasco, prato de cultura, bolsa ou outro recipiente para cultivar ou crescer células. Em algumas modalidades, as composições ou células são incubadas na presença de condições estimulantes ou de um agente estimulatório. Tais condições incluem aquelas manipuladas geneticamente para induzir proliferação, expansão, ativação e/ou sobrevivência de células na população, para imitar a exposição ao antígeno e/ou iniciar as células para manipulação genética, tal como para a introdução de um receptor de antígeno recombinante.

[00560] Em algumas modalidades, as etapas de processamento incluem incubações de células, tal como células selecionadas, nas quais as etapas de incubação podem incluir cultura, cultivo, estimula-

ção, ativação e/ou propagação de células. Em algumas modalidades, as composições ou células são incubadas na presença de condições estimulantes ou de um agente estimulatório. Tais condições incluem aquelas manipuladas geneticamente para induzir a proliferação, ativação e/ou sobrevivência de células na população, para imitar a exposição ao antígeno e/ou preparar as células para manipulação genética, tal como para a introdução de um receptor de antígeno recombinante.

[00561] Em algumas modalidades, as condições para estimulação e/ou ativação podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, teor de oxigênio, teor de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons e/ou fatores estimulatórios, tal como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[00562] Em algumas modalidades, as condições ou agentes estimulantes incluem um ou mais agentes, por exemplo, ligando, que é capaz de estimular ou ativar um domínio de sinalização intracelular de um complexo TCR. Em alguns aspectos, o agente liga ou inicia a cascata de sinalização intracelular de TCR/CD3 em uma célula T. Tais agentes podem incluir agentes adequados para entregar um sinal primário, por exemplo, para iniciar a ativação de um sinal induzido por ITAM, tal como anticorpos, tal como os específicos para um TCR, por exemplo, anti-CD3. Em algumas modalidades, as condições estimulantes incluem um ou mais agentes, por exemplo, ligando, que é capaz de estimular um receptor coestimulatório, por exemplo, anti-CD28 ou anti-4-1BB. Em algumas modalidades, esses agentes e/ou ligandos podem estar ligados a um suporte sólido, tal como uma conta, e/ou uma ou mais citocinas. Entre os agentes estimulatórios estão as contas anti-CD3/anti-CD28 (por exemplo, Expansor de Células T DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 e/ou contas ExpACT®). Opcionalmente, o método

de expansão pode adicionalmente compreender a etapa de adição de anticorpo anti-CD3 e/ou anti-CD28 ao meio de cultura (por exemplo, a uma concentração de pelo menos cerca de 0,5 ng/ml). Em algumas modalidades, os agentes estimulantes incluem IL-2, IL-7 e/ou IL-15, por exemplo, uma concentração de IL-2 de pelo menos cerca de 10 unidades/mL, pelo menos cerca de 50 unidades/mL, pelo menos cerca de 100 unidades/mL ou pelo menos cerca de 200 unidades/mL.

[00563] Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes são capazes de ativar células T, células T $CD4^+$ e/ou células T $CD8^+$; são capazes de induzir um sinal através de um complexo TCR; e/ou são capazes de induzir a proliferação de células T, células T $CD4^+$ e/ou células T $CD8^+$. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes compreendem um agente primário que se liga a um membro de um complexo de TCR, opcionalmente que se liga especificamente a CD3. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes compreendem adicionalmente um agente secundário que se liga especificamente a uma molécula coestimulatória de célula T. Em algumas modalidades, a molécula coestimulatória é selecionada a partir do grupo que consiste em CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 ou ICOS. Em algumas modalidades, os agentes primário e secundário compreendem anticorpos, opcionalmente em que os um ou mais agentes estimulantes compreendem a incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes estão presentes na superfície de um suporte sólido, opcionalmente uma conta. Em algumas modalidades, os um ou mais agentes estimulantes são selecionados a partir do grupo que consiste em moléculas de ligação a CD3; moléculas de ligação a CD28; IL-2 recombinante; IL-15 recombinante; e IL-7 recombinante, uma vacina compreendendo um antígeno especificamente reconhecido pelo receptor de antígeno e um anticorpo anti-idiotipo que se liga

especificamente ao receptor de antígeno ou suas combinações.

[00564] As condições podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, teor de oxigênio, teor de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons e/ou fatores estimulantes, tal como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[00565] Em modalidades, as células T específicas do antígeno, tal como as células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$ específicas do antígeno, são obtidas estimulando linfócitos T puros ou específicos de antígeno com antígeno. Por exemplo, linhagens ou clones de células T específicas de antígeno podem ser geradas para antígenos do citomegalovírus, isolando células T de objetos infectados e estimulando as células in vitro com o mesmo antígeno.

[00566] Em alguns aspectos, a incubação é realizada de acordo com técnicas como as descritas na patente US 6.040.177 de Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 651–660, Terakura et al. (2012) Blood.1: 72–82, e/ou Wang et al. (2012) J. Immunother. 35 (9): 689-701.

[00567] Em algumas modalidades, as condições estimulantes incluem temperatura adequada para o crescimento de linfócitos T humanos, por exemplo, pelo menos cerca de 25 graus Celsius, geralmente pelo menos 30 graus e geralmente em ou cerca de 37 graus Celsius. Opcionalmente, a incubação pode adicionalmente compreender a adição de células linfoblastoides transformadas por EBV não divididas (LCL) como células alimentadoras. LCL pode ser irradiado com raios gama na faixa de cerca de 6000 a 10.000 rads. As células alimentadoras LCL em alguns aspectos são fornecidas em qualquer quantidade adequada, tal como uma razão de células alimentadoras LCL para linfócitos T iniciais de pelo menos cerca de 10:1.

[00568] Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da incubação na presença de uma ou mais condições estimulantes ou agentes estimulatórios é realizada na cavidade interna de uma câmara centrífuga, por exemplo, sob rotação centrífuga, tal como descrito em Publicação International Número WO2016/073602. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da incubação realizada em uma câmara centrífuga inclui mistura com um reagente ou reagentes para induzir estimulação e/ou ativação. Em algumas modalidades, células, tal como células selecionadas, são misturadas com uma condição estimulante ou agente estimulatório na câmara centrífuga. Em alguns aspectos de tais processos, um volume de células é misturado com uma quantidade de uma ou mais condições ou agentes estimulantes que é muito menor do que o normalmente empregado na realização de estímulos semelhantes em uma placa de cultura de células ou outro sistema.

[00569] Em algumas modalidades, o agente estimulatório é adicionado às células na cavidade da câmara em uma quantidade substancialmente menor que (por exemplo, não mais do que 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70% ou 80% da quantidade) em comparação com a quantidade do agente estimulante que é normalmente usado ou seria necessário para alcançar a mesma ou semelhante eficiência de seleção do mesmo número de células ou do mesmo volume de células quando a seleção é realizada sem mistura em uma câmara centrífuga, por exemplo em um tubo ou bolsa com agitação ou rotação periódica. Em algumas modalidades, a incubação é realizada com a adição de um tampão de incubação às células e ao agente estimulatório para alcançar um volume alvo com a incubação do reagente de, por exemplo, cerca de 10 mL a cerca de 200 mL ou cerca de 20 mL a cerca de 125 mL, tal como pelo menos ou em ou cerca de pelo menos ou cerca de 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL,

100 mL, 10^5 mL, 110 mL, 115 ml, 120 ml, 125 ml, 130 ml, 135 ml, 140 ml, 145 ml, 150 ml, 160 ml, 170 ml, 180 ml, 190 ml ou 200 ml. Em algumas modalidades, o tampão de incubação e o agente estimulante são pré-misturados antes da adição às células. Em algumas modalidades, o tampão de incubação e um agente estimulante são adicionados separadamente às células. Em algumas modalidades, a incubação estimulante é realizada com uma condição de mistura suave periódica, que pode auxiliar na promoção de interações energeticamente favorecidas e, assim, permitir o uso de um agente estimulante menos geral, enquanto se consegue estimular e ativar as células.

[00570] Em algumas modalidades, a incubação geralmente é realizada sob condições de mistura, tal como na presença de centrifugação, geralmente em força ou velocidade relativamente baixa, tal como velocidade mais baixa que a usada para granular as células, tal como 600 rpm a 1700 rpm ou de cerca de 600 rpm a cerca de 1700 rpm (por exemplo, em ou ou cerca de ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm ou 1500 rpm ou 1700 rpm), tal como em um RCF na amostra ou parede da câmara ou outro recipiente de 80g a 100g ou de cerca de 80g a cerca de 100g (por exemplo, em ou cerca de ou pelo menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g ou 100 g). Em algumas modalidades, a centrifugação é realizada usando intervalos repetidos de uma centrifugação a uma velocidade tão baixa seguida por um período de descanso, tal como uma centrifugação e/ou repouso por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 segundos, tal como uma centrifugação por aproximadamente 1 ou 2 segundos, seguido de um descanso por aproximadamente 5, 6, 7 ou 8 segundos.

[00571] Em algumas modalidades, a duração total da incubação, por exemplo com o agente estimulante, está entre 1 hora e 96 horas, 1 hora e 72 horas, 1 hora e 48 horas, 4 horas e 36 horas, 8 horas e 30 horas, 18 horas e 30 horas ou 12 horas e 24 horas, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de 6 horas, 12 horas, 18 horas,

24 horas, 36 horas ou 72 horas. Em algumas modalidades, a incubação adicional é por um tempo entre ou cerca dentre 1 hora e 48 horas, 4 horas e 36 horas, 8 horas e 30 horas ou 12 horas e 24 horas, cada uma inclusive.

C. Manipulação Genética

[00572] Em algumas modalidades, as etapas de processamento incluem a introdução de uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína recombinante. Em algumas modalidades, as células, por exemplo, células T, são geneticamente modificadas para expressar um receptor recombinante. Entre essas proteínas recombinantes estão os receptores recombinantes, tal como os descritos na Seção III. Em algumas modalidades, a manipulação é realizada através da introdução de polinucleotídeos que codificam o receptor recombinante. Também são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor recombinante e vetores ou construtos contendo esses ácidos nucleicos e/ou polinucleotídeos. A introdução das moléculas de ácido nucleico que codificam a proteína recombinante, tal como o receptor recombinante, na célula pode ser realizada usando qualquer um de vários vetores conhecidos. Tais vetores incluem sistemas virais e não virais, incluindo sistemas lentivirais e gama-retrovirais, bem como sistemas baseados em transposons, tal como sistemas de transferência de genes baseados em PiggyBac ou Sleeping Beauty. Métodos exemplares incluem aqueles para transferência de ácidos nucleicos que codificam os receptores, incluindo via viral, por exemplo, retroviral ou lentiviral, transdução, transposons e eletroporação.

[00573] Em algumas modalidades, a preparação das células manipuladas geneticamente inclui uma ou mais etapas de cultura e/ou preparação. As células para introdução do ácido nucleico que codifica o receptor transgênico, tal como o CAR, podem ser isoladas de uma amostra, tal como uma amostra biológica, por exemplo, uma obtida ou

derivada de um objeto. Em algumas modalidades, o objeto do qual a célula é isolada é aquele que tem a doença ou condição ou precisa de uma terapia celular ou ao qual a terapia celular será administrada. O objeto em algumas modalidades é um ser humano que precisa de uma intervenção terapêutica específica, tal como a terapia celular adotiva para a qual as células estão sendo isoladas, processadas e/ou manipuladas geneticamente.

[00574] Em certas modalidades, as composições de células são manipuladas geneticamente, por exemplo, transduzidas ou transfectadas, antes de cultivar as células, por exemplo, sob condições que promovem proliferação e/ou expansão. Em modalidades particulares, as composições de células são manipuladas geneticamente após as composições terem sido estimuladas, ativadas e/ou incubadas sob condições estimulantes. Em modalidades particulares, as composições são composições estimuladas. Em modalidades particulares, as composições estimuladas foram previamente crioconservadas e armazenadas, e são descongeladas antes da manipulação.

[00575] Em algumas modalidades, a transferência de genes é realizada primeiro estimulando a célula, tal como combinando-a com um estímulo que induz uma resposta como proliferação, sobrevivência e/ou ativação, por exemplo, conforme medido pela expressão de uma citocina ou marcador de ativação, seguido de transdução das células ativadas e expansão em cultura para números suficientes para aplicações clínicas.

[00576] Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células usando partículas de vírus infecciosos recombinantes, tal como, por exemplo, vetores derivados do vírus símio 40 (SV40), adenovírus, vírus adenoassociado (AAV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV).

[00577] Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinan-

tes são transformados nas células T por eletroporação (vide, por exemplo, Chicaybam et al., (2013) PLoS ONE 8 (3): e60298 e Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7 (16): 1431-1437). Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por transposição (vide, por exemplo, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21 (4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; e Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Outros métodos de introdução e expressão de material genético em células imunes incluem a transfecção de fosfato de cálcio (por exemplo, tal como descrito em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nova Iorque. Nova Iorque), fusão de protoplastos, transfecção mediada por lipossomas catiônicos; bombardeamento de micropartículas facilitado por partículas de tungstênio (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); e coprecipitação de DNA com fosfato de estrôncio (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

[00578] Outras abordagens e vetores para transferência dos ácidos nucléicos que codificam os produtos recombinantes são aqueles descritos, por exemplo, no pedido de patente internacional, Publicação No.: WO2014055668 e Patente US No. 7.446.190.

[00579] Em algumas modalidades, as células, por exemplo, células T, podem ser transfectadas durante ou após a expansão, por exemplo com um receptor de células T (TCR) ou um receptor de antígeno quimérico (CAR). Esta transfecção para a introdução do gene do receptor desejado pode ser realizada com qualquer vetor retroviral adequado, por exemplo. A população de células geneticamente modificadas pode então ser liberada do estímulo inicial (o estímulo CD3/CD28, por exemplo) e subsequentemente ser estimulada com um segundo tipo de estímulo (por exemplo, via um novo receptor introduzido). Esse segundo tipo de estímulo pode incluir um estímulo antigênico na forma de uma molécula de peptídeo/MHC, o ligando cognato (reticulação) do

receptor geneticamente introduzido (por exemplo, ligando natural de um CAR) ou qualquer ligando (tal como um anticorpo) que liga diretamente dentro da estrutura do novo receptor (por exemplo, ao reconhecer regiões constantes no receptor). Vide, por exemplo, Cheadle et al., "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 ou Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).

[00580] Em alguns casos, um vetor pode ser usado que não requer que as células, por exemplo, células T, sejam ativadas. Em alguns desses casos, as células podem ser selecionadas e/ou transduzidas antes da ativação. Assim, as células podem ser manipuladas geneticamente antes ou após a cultura das células e, em alguns casos, ao mesmo tempo que ou durante pelo menos uma porção da cultura.

[00581] Em alguns aspectos, as células são manipuladas geneticamente para promover a expressão de citocinas ou outros fatores. Entre ácidos nucleicos adicionais, por exemplo, genes para introdução são aqueles que melhoram a eficácia da terapia, tal como, por exemplo, promovendo a viabilidade e/ou a função das células transferidas; genes para fornecer um marcador genético para seleção e/ou avaliação das células, tal como para avaliar a sobrevivência ou localização in vivo; genes para melhorar a segurança, por exemplo, tornando a célula suscetível à seleção negativa in vivo, tal como descrito por Lupton S. D. et al., Mol. e Cell Biol., 11: 6 (1991); e Riddell et al., Human Gene Therapy 3: 319-338 (1992); vide também as publicações PCT/US91/08442 e PCT/US94/05601 de Lupton et al. Que descreve o uso de genes de fusão selecionáveis bifuncionais derivados da fusão de um marcador selecionável positivo dominante com um marcador selecionável negativo. Vide, por exemplo, Riddell et al., Patente US No. 6.040.177, nas colunas 14-17.

[00582] Em algumas modalidades, a introdução é realizada contatando uma ou mais células de uma composição com uma molécula de ácido nucleico que codifica a proteína recombinante, por exemplo, receptor recombinante. Em algumas modalidades, o contato pode ser efetuado com centrifugação, tal como spinoculação (por exemplo, inoculação centrífuga). Tais métodos incluem qualquer um dos descritos na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Câmaras centrífugas exemplares incluem aquelas produzidas e vendidas pela Biosafe SA, incluindo aquelas para uso com o sistema Sepax® e Sepax® 2, incluindo câmaras centrífugas A-200/F e A-200 e vários kits para uso com esses sistemas. Câmaras, sistemas e instrumentação de processamento e gabinetes exemplares são descritos, por exemplo, na Patente US No. 6.123.655, Patente US No. 6.733.433 e Pedido de Patente U.S. Publicado, Publicação No.: US 2008/0171951 e pedido internacional de patente publicado, publicação No. WO 00/38762, cujo conteúdo de cada um deles é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Kits exemplares para uso com esses sistemas incluem, entre outros, kits de uso único vendidos pela BioSafe SA sob os nomes de produtos CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 ou CS-900.2.

[00583] Em algumas modalidades, o sistema é incluído e/ou colocado em associação com outra instrumentação, incluindo instrumentação para operar, automatizar, controlar e/ou monitorar aspectos da etapa de transdução e uma ou mais várias outras etapas de processamento realizadas no sistema, por exemplo uma ou mais etapas de processamento que podem ser realizadas com ou em conexão com o sistema de câmara centrífuga, conforme descrito aqui ou na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Esta instrumentação em algumas modalidades está contida dentro de um gabinete. Em algumas modalidades, a instrumentação inclui um gabinete, que inclui um alojamento que contém circuitos de controle, uma centrífuga, uma

tampa, motores, bombas, sensores, displays e uma interface de usuário. Um dispositivo exemplar é descrito na Patente US No. 6.123.655, Patente US No. 6.733.433 e US 2008/0171951.

[00584] Em algumas modalidades, o sistema compreende uma série de recipientes, por exemplo, bolsas, tubos, torneiras, braçadeiras, conectores e uma câmara de centrífuga. Em algumas modalidades, os recipientes, tal como bolsas, incluem um ou mais recipientes, tal como bolsas, contendo as células a serem transduzidas e as partículas do vetor viral, no mesmo recipiente ou recipientes separados, tal como a mesma bolsa ou bolsas separadas. Em algumas modalidades, o sistema inclui adicionalmente um ou mais recipientes, tal como bolsas, contendo meio, tal como diluente e/ou solução de lavagem, que é puxado para dentro da câmara e/ou outros componentes para diluir, ressuspender e/ou lavar componentes e/ou composições durante os métodos. Os recipientes podem ser conectados em uma ou mais posições no sistema, tal como em uma posição correspondente a uma linha de entrada, linha de diluente, linha de lavagem, linha de resíduos e/ou linha de saída.

[00585] Em algumas modalidades, a câmara está associada a uma centrífuga, que é capaz de efetuar a rotação da câmara, tal como em torno de seu eixo de rotação. A rotação pode ocorrer antes, durante e/ou após a incubação em conexão com a transdução das células e/ou em uma ou mais das outras etapas de processamento. Assim, em algumas modalidades, uma ou mais das várias etapas de processamento são realizadas sob rotação, por exemplo, em uma força específica. A câmara é tipicamente capaz de rotação vertical ou geralmente vertical, de modo que a câmara fica na vertical durante a centrifugação e a parede lateral e o eixo são verticais ou geralmente verticais, com a (s) parede (s) de extremidade horizontal ou geralmente horizontal.

[00586] Em algumas modalidades, a composição contendo células,

partículas virais e reagente pode ser girada, geralmente em força ou velocidade relativamente baixa, tal como velocidade mais baixa que a usada para granular as células, tal como de 600 rpm a 1700 rpm ou de cerca de 600 rpm a cerca de 1700 rpm (por exemplo, em ou cerca de ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm ou 1500 rpm ou 1700 rpm). Em algumas modalidades, a rotação é realizada com uma força, por exemplo, uma força centrífuga relativa, de 100 g a 3200 g ou de cerca de 100 g a cerca de 3200 g (por exemplo, em ou cerca de ou pelo menos em ou cerca de 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g ou 3200 g), tal como medido por exemplo em uma parede interna ou externa da câmara ou cavidade. O termo "força centrífuga relativa" ou RCF é geralmente entendido como a força efetiva transmitida a um objeto ou substância (como uma célula, amostra ou pélete e/ou um ponto na câmara ou outro recipiente sendo girado), em relação a força gravitacional da Terra, em um ponto específico do espaço em comparação com o eixo de rotação. O valor pode ser determinado usando fórmulas conhecidas, levando em consideração a força gravitacional, a velocidade de rotação e o raio de rotação (distância do eixo de rotação e o objeto, substância ou partícula na qual o RCF está sendo medido).

[00587] Em algumas modalidades, durante pelo menos uma parte da manipulação genética, por exemplo transdução e/ou subsequente à manipulação genética, as células são transferidas para um recipiente, tal como uma bolsa, por exemplo, um conjunto de bolsas de biorreator, para cultura das células geneticamente modificadas, tal como para cultivo ou expansão das células, tal como descrito acima. Em algumas modalidades, o recipiente para cultivo ou expansão das células é uma bolsa de biorreator, tal como uma bolsa de perfusão.

1. Vetores e Métodos

[00588] Em algumas modalidades, as etapas de processamento

incluem a introdução de uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína recombinante, na célula, e pode ser realizada usando qualquer um de vários vetores conhecidos. Em algumas modalidades, o vetor contém o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante. Em modalidades particulares, o vetor é um vetor viral, um vetor não viral. Em alguns casos, o vetor é um vetor viral, tal como um vetor retroviral, por exemplo, um vetor lentiviral ou um vetor gama-retroviral.

[00589] Em alguns casos, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante, por exemplo, receptor de antígeno quimérico (CAR) contém uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal. Exemplos não limitativos de peptídeos de sinal incluem, por exemplo, o peptídeo de sinal da cadeia alfa GMCSFR, o peptídeo de sinal alfa CD8 ou o peptídeo de sinal CD33.

[00590] Em algumas modalidades, os vetores incluem vetores virais, por exemplo, retroviral ou lentiviral, vetores ou transposons não virais, por exemplo, Sistema de transposons da Bela Adormecida, vetores derivados do vírus símio 40 (SV40), adenovírus, vírus adenoassociado (AAV), vetores lentivirais ou vetores retrovirais, tal como vetores gama-retrovirais, vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMLV), vírus do sarcoma mieloproliferativo (MPSV), vírus das células tronco embrionárias murinas (MESV), vírus das células tronco murinas (MSCV), vírus formadores de foco no baço (SFFV) ou vírus adenoassociado (AAV).

[00591] Em algumas modalidades, o vetor viral ou o DNA não viral contém um ácido nucleico que codifica uma proteína recombinante heteróloga. Em algumas modalidades, a molécula recombinante heteróloga é ou inclui um receptor recombinante, por exemplo, um receptor de antígeno, transposons SB, por exemplo, para silenciamento de genes, transposons fechados por capsídeo, ácido nucleico de cadeia dupla homólogos, por exemplo, para recombinação genômica ou genes

repórter (por exemplo, proteínas fluorescentes, tal como GFP) ou luciferase).

2. Preparação de Partículas de Vetor Viral para Transdução

[00592] Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células usando partículas de vírus infecciosas recombinantes, como, por exemplo, vetores derivados do vírus símio 40 (SV40), adenovírus, vírus adenoassociado (AAV). Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T usando vetores lentivirais recombinantes ou vetores retrovirais, tal como vetores gama-retrovirais (vide, por exemplo, Koste et al. (2014) Gene Therapy 3 de abril de 2014. doi: 10.1038/gt. 2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28 (10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 29 de novembro (11)): 550-557.

[00593] Em algumas modalidades, o vetor retroviral possui uma longa sequência de repetição terminal (LTR), por exemplo, um vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMLV), vírus do sarcoma mieloproliferativo (MPSV), vírus da célula-tronco embrionária murina (MESV), vírus da célula-tronco murina (MSCV) ou vírus formadores de foco no baço (SFFV). Em algumas modalidades, os retrovírus incluem aqueles derivados de qualquer fonte de células aviária ou de mamífero. Os retrovírus são tipicamente anfotrópicos, o que significa que são capazes de infectar células hospedeiras de várias espécies, incluindo seres humanos. Em uma modalidade, o gene a ser expresso substitui as sequências retrovirais de gag, pol e/ou env. Um número de sistemas retrovirais ilustrativos foi descrito (por exemplo, Patentes U.S. No. 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller e Rosman (1989) BioTechniques 7: 980-990; Miller, AD (1990) Human Gene Therapy 1: 5-14 Scarpa et al. (1991) Virology 180: 849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-8037; e Boris-Lawrie e

Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop.3:102-109.

[00594] [São conhecidos métodos de transdução lentiviral. Métodos exemplares são descritos em, por exemplo, Wang et al. (2012) *J. Immunother*. 35 (9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; e Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102 (2): 497-505.

[00595] Em algumas modalidades, as partículas de vetor viral contêm um genoma derivado de um vetor baseado em genoma retroviral, tal como derivado de um vetor baseado em genoma lentiviral. Em alguns aspectos dos vetores virais fornecidos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um receptor recombinante, tal como um CAR, está contido e/ou localizado entre as sequências 5 'LTR e 3' LTR do genoma do vetor.

[00596] Em algumas modalidades, o genoma do vetor viral é um genoma de lentivírus, tal como um genoma do HIV-1 ou um genoma do SIV. Por exemplo, os vetores lentivirais foram gerados pela multiplicação de genes de virulência atenuantes, por exemplo, os genes env, vif, vpu e nef podem ser excluídos, tornando o vetor mais seguro para fins terapêuticos. Os vetores lentivirais são conhecidos. Vide Naldini et al., (1996 e 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, Pat. 6.013.516; e 5.994.136). Em algumas modalidades, esses vetores virais são baseados em plasmídeo ou em vírus e são configurados para transportar as sequências essenciais para incorporar ácido nucleico estranho, para seleção e para transferência do ácido nucleico para uma célula hospedeira. Os lentivírus conhecidos podem ser facilmente obtidos em depósitos ou coleções, tal como a American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), ou isolados de fontes conhecidas, usando técnicas geralmente disponíveis.

[00597] Exemplos não limitativos de vetores lentivirais incluem

aqueles derivados de um lentivírus, tal como o Vírus de imunodeficiência humana 1 (HIV-1), HIV-2, um vírus de imunodeficiência símia (SIV), o vírus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1), HTLV-2 ou vírus da anemia por infecção equina (E1AV). Por exemplo, os vetores lentivirais foram gerados pela atenuação múltipla dos genes de virulência do HIV, por exemplo, os genes env, vif, vpr, vpu e nef são excluídos, tornando o vetor mais seguro para fins terapêuticos. Os vetores lentivirais são conhecidos na técnica, vide Naldini et al., (1996 e 1998); Zufferey et al., (1997); Dull e t al., 1998, Pat. 6.013.516; e 5.994.136). Em algumas modalidades, esses vetores virais são baseados em plasmídeo ou em vírus e são configurados para transportar as sequências essenciais para incorporar ácido nucleico estranho, para seleção e para transferência do ácido nucleico para uma célula hospedeira. Os lentivírus conhecidos podem ser facilmente obtidos em depósitos ou coleções, tal como a American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), ou isolados de fontes conhecidas, usando técnicas geralmente disponíveis.

[00598] O genoma do vetor viral é tipicamente construído em uma forma de plasmídeo que pode ser transfectado para uma linhagem celular de empacotamento ou produtora. Em qualquer um desses exemplos, o ácido nucleico que codifica uma proteína recombinante, tal como um receptor recombinante, é inserido ou localizado em uma região do vetor viral, tal como geralmente em uma região não essencial do genoma viral. Em algumas modalidades, o ácido nucleico é inserido no genoma viral no lugar de certas sequências virais para produzir um vírus com defeito de replicação.

[00599] Qualquer um dos vários métodos conhecidos pode ser usado para produzir partículas retrovirais cujo genoma contém uma cópia de RNA do genoma do vetor viral. Em algumas modalidades, pelo menos dois componentes estão envolvidos na fabricação de um sistema

de entrega de genes baseado em vírus: primeiro, empacotando plasmídeos, englobando as proteínas estruturais, bem como as enzimas necessárias para gerar uma partícula de vetor viral, e segundo, o próprio vetor viral, ou seja, o material genético a ser transferido. As salvaguardas de biossegurança podem ser introduzidas no projeto de um ou de ambos os componentes.

[00600] Em algumas modalidades, o plasmídeo de embalagem pode conter todas as proteínas retrovirais, tal como HIV-1, que não sejam proteínas de envelope (Naldini et al., 1998). Em outras modalidades, os vetores virais podem não ter genes virais adicionais, tal como aqueles que estão associados à virulência, por exemplo, vpr, vif, vpu e nef, e/ou Tat, um transativador primário do HIV. Em algumas modalidades, os vetores lentivirais, tal como os vetores lentivirais baseados em HIV, compreendem apenas três genes do vírus parental: gag, pol e rev, o que reduz ou elimina a possibilidade de reconstituição de um vírus do tipo selvagem por meio de recombinação.

[00601] Em algumas modalidades, o genoma do vetor viral é introduzido em uma linhagem de células de empacotamento que contém todos os componentes necessários para empacotar o RNA genômico viral, transcrito do genoma do vetor viral, em partículas virais. Alternativamente, o genoma do vetor viral pode compreender um ou mais genes que codificam componentes virais, além de uma ou mais sequências, por exemplo, ácidos nucleicos recombinantes de interesse. Em alguns aspectos, para impedir a replicação do genoma na célula-alvo, no entanto, os genes virais endógenos necessários para a replicação são removidos e fornecidos separadamente na linhagem de células de empacotamento.

[00602] Em algumas modalidades, uma linhagem de células de empacotamento é transfectada com um ou mais vetores de plasmídeo contendo os componentes necessários para gerar as partículas. Em

algumas modalidades, uma linhagem de células de empacotamento é transfectada com um plasmídeo contendo o genoma do vetor viral, incluindo as LTRs, a sequência de empacotamento de ação cis e a sequência de interesse, isto é, um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno, tal como um CAR; e um ou mais plasmídeos auxiliares que codificam os componentes enzimáticos e/ou estruturais do vírus, tais como Gag, pol e/ou rev. Em algumas modalidades, vários vetores são utilizados para separar os vários componentes genéticos que geram as partículas do vetor retroviral. Em algumas dessas modalidades, o fornecimento de vetores separados para a célula de empacotamento reduz a chance de eventos de recombinação que poderiam gerar vírus competentes para replicação. Em algumas modalidades, um único vetor de plasmídeo com todos os componentes retrovirais pode ser usado.

[00603] Em algumas modalidades, a partícula de vetor retroviral, tal como partícula de vetor lentiviral, é pseudotipada para aumentar a eficiência de transdução das células hospedeiras. Por exemplo, uma partícula de vetor retroviral, tal como uma partícula de vetor lentiviral, em algumas modalidades é pseudotipada com uma glicoproteína VSV-G, que fornece uma ampla gama de hospedeiros celulares que estende os tipos de células que podem ser transduzidos. Em algumas modalidades, uma linhagem de células de empacotamento é transfectada com um plasmídeo ou polinucleotídeo que codifica uma glicoproteína de envelope não nativa, tal como incluindo envelopes xenotrópicos, politrópicos ou anfotrópicos, tal como envelope do vírus Sindbis, GALV ou VSV-G.

[00604] Em algumas modalidades, a linhagem de células de empacotamento fornece os componentes, incluindo proteínas reguladoras e estruturais virais, necessárias em trans para o empacotamento do RNA genômico viral em partículas de vetor lentiviral. Em algumas mo-

dalidades, a linhagem de células de empacotamento pode ser qualquer linhagem de células que seja capaz de expressar proteínas lentivirais e produzir partículas funcionais do vetor lentiviral. Em alguns aspectos, as linhagens de células de embalagem adequadas incluem 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BH Células K (ATCC CCL-10) e Cf2Th (ATCC CRL 1430).

[00605] Em algumas modalidades, a linhagem de células de empacotamento expressa de forma estável a (s) proteína (s) viral (s). Por exemplo, em alguns aspectos, pode ser construída uma linhagem de células de empacotamento contendo os genes gag, pol, rev e/ou outros genes estruturais, mas sem a LTR e os componentes de empacotamento. Em algumas modalidades, uma linhagem de células de empacotamento pode ser transientemente transfectada com moléculas de ácido nucleico que codificam uma ou mais proteínas virais junto com o genoma do vetor viral contendo uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína heteróloga e/ou um ácido nucleico que codifica uma glicoproteína de envelope.

[00606] Em algumas modalidades, os vetores virais e os plasmídeos de empacotamento e/ou auxiliares são introduzidos via transfecção ou infecção na linhagem de células de empacotamento. A linhagem de células de empacotamento produz partículas de vetor viral que contêm o genoma do vetor viral. Os métodos para transfecção ou infecção são bem conhecidos. Exemplos não limitativos incluem métodos de fosfato de cálcio, DEAE-dextrano e lipofecção, eletroporação e microinjeção.

[00607] Quando um plasmídeo recombinante e a LTR retroviral e sequências de empacotamento são introduzidos em uma linhagem celular especial (por exemplo, por precipitação com fosfato de cálcio, por exemplo), as sequências de empacotamento podem permitir que o

transcrito de RNA do plasmídeo recombinante seja empacotado em partículas virais, que podem ser secretados nos meios de cultura. O meio contendo os retrovírus recombinantes em algumas modalidades é então coletado, opcionalmente concentrado e utilizado para transferência de genes. Por exemplo, em alguns aspectos, após cotransfecção dos plasmídeos de empacotamento e do vetor de transferência para a linhagem de células de empacotamento, as partículas do vetor viral são recuperadas do meio de cultura e tituladas por métodos padrão usados pelos especialistas na técnica.

[00608] Em algumas modalidades, um vetor retroviral, tal como um vetor lentiviral, pode ser produzido em uma linhagem de células de empacotamento, tal como uma linhagem celular exemplar HEK 293T, através da introdução de plasmídeos para permitir a geração de partículas lentivirais. Em algumas modalidades, uma célula de empacotamento é transfectada e/ou contém um polinucleotídeo que codifica gag e pol, e um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno, por exemplo, um CAR. Em algumas modalidades, a linhagem de células de empacotamento é opcional e/ou adicionalmente transfectada com e/ou contém um polinucleotídeo que codifica uma proteína rev. Em algumas modalidades, a linhagem de células de empacotamento é opcional e/ou adicionalmente transfectada com e/ou contém um polinucleotídeo que codifica uma glicoproteína de envelope não nativa, tal como VSV-G. Em algumas de tais modalidades, aproximadamente dois dias após a transfecção das células, por exemplo, as células HEK 293T, o sobrenadante celular contém vetores lentivirais recombinantes, que podem ser recuperados e titulados.

[00609] Partículas de vetores retrovirais recuperados e/ou produzidos podem ser usados para transduzir as células-alvo usando os métodos como descritos. Uma vez nas células-alvo, o RNA viral é trans-

crito reversamente, importado para o núcleo e integrado de maneira estável no genoma do hospedeiro. Um ou dois dias após a integração do RNA viral, a expressão da proteína recombinante, por exemplo, receptor de antígeno, tal como o CAR, pode ser detectado.

3. Ácidos Nucleicos

[00610] Em algumas modalidades, os ácidos nucléicos são heterólogos, ou seja, normalmente não estão presentes em uma célula ou amostra obtida da célula, tal como uma obtida de outro organismo ou célula, que por exemplo, normalmente não é encontrado na célula sendo manipulação e/ou um organismo do qual essa célula é derivada. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos não ocorrem naturalmente, tal como um ácido nucleico não encontrado na natureza, incluindo um que compreende combinações quiméricas de ácidos nucleicos que codificam vários domínios de vários tipos celulares diferentes.

[00611] Em algumas modalidades, as células incluem um ou mais ácidos nucleicos introduzidos por manipulação genética e, assim, expressam produtos recombinantes ou geneticamente modificados por esses ácidos nucleicos.

[00612] Em alguns casos, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante contém uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal. Em alguns aspectos, a sequência de sinal pode codificar um peptídeo de sinal derivado de um polipeptídeo nativo. Em outros aspectos, a sequência de sinal pode codificar um peptídeo de sinal heterólogo ou não nativo, tal como o peptídeo de sinal exemplar da cadeia alfa GMCSFR estabelecido em SEQ ID NO: 25 e codificado pela sequência de nucleotídeos apresentada em SEQ ID NO: 24 Em alguns casos, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante, por exemplo, receptor de antígeno quimérico (CAR) contém uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal. Exemplos exemplares não limitativos de peptídeos de sinal in-

cluem, por exemplo, o peptídeo de sinal da cadeia alfa GMCSFR estabelecido em SEQ ID NO: 25 e codificado pela sequência de nucleotídeos estabelecida em SEQ ID NO: 24, ou o peptídeo de sinal alfa CD8 estabelecido em SEQ ID NO: 26.

[00613] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante contém pelo menos um promotor que está operacionalmente ligado para controlar a expressão do receptor recombinante. Em alguns exemplos, o polinucleotídeo contém dois, três ou mais promotores operacionalmente ligados para controlar a expressão do receptor recombinante.

[00614] Em certos casos em que moléculas de ácido nucleico codificam duas ou mais cadeias polipeptídicas diferentes, por exemplo, um receptor recombinante e um marcador, cada uma das cadeias polipeptídicas pode ser codificada por uma molécula de ácido nucleico separada. Por exemplo, são fornecidos dois ácidos nucleicos separados, e cada um pode ser transferido ou introduzido individualmente na célula para expressão na célula. Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante e o ácido nucleico que codifica o marcador estão operacionalmente ligados ao mesmo promotor e são opcionalmente separados por um sítio interno de entrada ribossomal (IRES) ou um ácido nucleico que codifica um peptídeo de autoclivagem ou um peptídeo que causa o salto do ribossoma, que opcionalmente é um T2A, um P2A, um E2A ou um F2A. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos que codificam o marcador e o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante estão operacionalmente ligados a dois promotores diferentes. Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o marcador e o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante estão presentes ou inseridos em diferentes sítios dentro do genoma da célula. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante é introduzido em uma com-

posição contendo células cultivadas, tal como por transdução, transfecção ou transformação retroviral.

[00615] Em algumas modalidades, tal como aquelas em que o polinucleotídeo contém uma primeira e segunda sequência de ácido nucleico, as sequências de codificação que codificam cada uma das diferentes cadeias polipeptídicas podem ser operacionalmente ligadas a um promotor, que pode ser o mesmo ou diferente. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico pode conter um promotor que aciona a expressão de duas ou mais cadeias polipeptídicas diferentes. Em algumas modalidades, essas moléculas de ácido nucleico podem ser multicistrônicas (bicistrônicas ou tricistrônicas, vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.060.273). Em algumas modalidades, as unidades de transcrição podem ser manipuladas geneticamente como uma unidade bicistrônica contendo um IRES (sítio interno de entrada ribossomal), que permite a coexpressão de produtos gênicos (por exemplo, codificando o marcador e codificando o receptor recombinante) por uma mensagem de um único promotor.

[00616] Alternativamente, em alguns casos, um único promotor pode direcionar a expressão de um RNA que contém, em um único quadro de leitura aberto (ORF), dois ou três genes (por exemplo, codificando o marcador e codificando o receptor recombinante) separados um do outro por sequências que codificam um peptídeo de autoclivagem (por exemplo, sequências 2A) ou um sítio de reconhecimento de protease (por exemplo, furina). O ORF codifica assim um único polipeptídeo, que, durante (no caso de 2A) ou após a tradução, é processado nas proteínas individuais. Em alguns casos, o peptídeo, tal como um T2A, pode fazer com que o ribossoma pule (síntese do ribossoma) uma ligação peptídica no C-terminal de um elemento 2A, levando à separação entre o final da sequência 2A e o próximo peptídeo a jusante (vide, por exemplo, de Felipe, Genetic Vaccines e Ther. 2:13 (2004)

e de Felipe et al. Traffic 5: 616-626 (2004)). Vários elementos 2A são conhecidos. Exemplos de sequências 2A que podem ser usadas nos métodos e sistemas aqui divulgados, sem limitação, sequências 2A do vírus da febre aftosa (F2A, por exemplo, SEQ ID NO: 21), vírus A da rinite equina (E2A, por exemplo, SEQ ID NO: 20), vírus Thosea asigna (T2A, por exemplo, SEQ ID NO: 6 ou 17) e teschovirus-1 porcino (P2A, por exemplo, SEQ ID NO: 18 ou 19), conforme descrito na publicação de patente U.S. 20070116690.

[00617] Qualquer um dos receptores recombinantes aqui descritos pode ser codificado por polinucleotídeos contendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam receptores recombinantes, em qualquer combinação ou arranjo. Por exemplo, um, dois, três ou mais polinucleotídeos podem codificar um, dois, três ou mais polipeptídeos diferentes, por exemplo, receptores recombinantes. Em algumas modalidades, um vetor ou construto contém um marcador de codificação de sequência de ácido nucleico e um vetor ou construto separado contém uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor recombinante, por exemplo, CAR. Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o marcador e o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante estão operacionalmente ligados a dois promotores diferentes. Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante está presente a jusante do ácido nucleico que codifica o marcador.

[00618] Em algumas modalidades, o esqueleto do vetor contém uma sequência de ácido nucleico que codifica um ou mais marcadores. Em algumas modalidades, os um ou mais marcadores é um marcador de transdução, marcador substituto e/ou um marcador de seleção.

[00619] Em algumas modalidades, o marcador é um marcador de transdução ou um marcador substituto. Um marcador de transdução

ou um marcador substituto pode ser usado para detectar células que foram introduzidas com o polinucleotídeo, por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante. Em algumas modalidades, o marcador de transdução pode indicar ou confirmar a modificação de uma célula. Em algumas modalidades, o marcador substituto é uma proteína que é feita para ser coexpressa na superfície celular com o receptor recombinante, por exemplo, CAR. Em modalidades particulares, esse marcador substituto é uma proteína de superfície que foi modificada para ter pouca ou nenhuma atividade. Em certas modalidades, o marcador substituto é codificado no mesmo polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante. Em algumas modalidades, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante está operacionalmente ligada a uma sequência de ácido nucleico que codifica um marcador, opcionalmente separado por um sítio interno de entrada ribossomal (IRES), ou um ácido nucleico que codifica um peptídeo ou um peptídeo de autoclivagem que faz com que o ribossoma salte, tal como uma sequência 2A, tal como T2A, P2A, E2A ou F2A. Genes marcadores extrínsecos podem, em alguns casos, ser utilizados em conexão com células manipuladas geneticamente para permitir a detecção ou seleção de células e, em alguns casos, também para promover o suicídio celular.

[00620] Marcadores substitutos exemplares podem incluir polipeptídeos de superfície celular truncados, tal como um receptor de fator de crescimento epidérmico humano truncado 2 (tHER2), um receptor de fator de crescimento epidérmico truncado (EGFRt, sequência EGFRt exemplar apresentada em SEQ ID NO: 7 ou 16) ou um antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) ou sua forma modificada. O EGFRt pode conter um epítopo reconhecido pelo anticorpo cetuximab (Erbitux®) ou outro anticorpo terapêutico anti-EGFR ou molécula de ligação, que pode ser usado para identificar ou selecionar células que

foram modificadas com o construto EGFRt e um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou para eliminar ou separar células que expressam o receptor. Vide Patente U.S. No. 8.802.374 e Liu et al., Nature Biotech. Abril de 2016; 34 (4): 430-434. Em alguns aspectos, o marcador, por exemplo, marcador substituto, inclui todo ou parte (por exemplo, forma truncada) de CD34, um NGFR, um CD19 ou um CD19 truncado, por exemplo, um CD19 não humano truncado ou receptor do fator de crescimento epidérmico (por exemplo, tEGFR). Em algumas modalidades, o ácido nucleico que codifica o marcador está operacionalmente ligado a um polinucleotídeo que codifica uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante clivável, por exemplo, T2A. Por exemplo, um marcador e, opcionalmente, uma sequência de ligação, pode ser qualquer um como divulgado na Pub. PCT WO2014031687. Por exemplo, o marcador pode ser um EGFR truncado (tEGFR) que é, opcionalmente, vinculado a uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante clivável em T2A. Um polipeptídeo exemplar para um EGFR truncado (por exemplo, tEGFR) compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 7 ou 16 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência de SEQ ID NO: 7 ou 16.

[00621] Em algumas modalidades, o marcador é ou compreende uma proteína fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde aperfeiçoada (EGFP), tal como GFP superdobrável, proteína fluorescente vermelha (RFP), tal como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed ou DsRed2, proteína fluorescente ciano (CFP), proteína fluorescente verde azul (BFP), proteína fluorescente azul aperfeiçoada (EBFP) e proteína fluorescente amarela (YFP) e variantes da mesma, incluindo variantes de espé-

cies, variantes monoméricas e variantes otimizadas por códon e/ou aperfeiçoadas das proteínas fluorescentes. Em algumas modalidades, o marcador é ou compreende uma enzima, tal como uma luciferase, o gene lacZ de E. coli, fosfatase alcalina, fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferase (CAT). Exemplos de genes repórteres emissores de luz incluem luciferase (luc), β-galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), β-glucuronidase (GUS) ou variantes dos mesmos.

[00622] Em algumas modalidades, o marcador é um marcador de seleção. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é ou compreende um polipeptídeo que confere resistência a agentes exógenos ou drogas. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é um gene de resistência a antibióticos. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é um gene de resistência a antibióticos que confere resistência a antibióticos a uma célula de mamífero. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é ou compreende um gene de resistência à Puromicina, um gene de resistência à Higromicina, um gene de resistência à Blasticidina, um gene de resistência à Neomicina, um gene de resistência à Geneticina ou um gene de resistência à Zeocina ou uma forma modificada do mesmo.

D. Cultivo e/ou Expansão de Células

[00623] Em algumas modalidades, as células que foram manipuladas geneticamente usando os métodos descritos neste documento podem sofrer uma ou mais etapas de cultivo, por exemplo, cultivar células sob condições que promovem proliferação e/ou expansão. Em algumas modalidades, as células manipuladas geneticamente são cultivadas sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão subsequentes a uma etapa de manipulação genética, por exemplo, a introdução de um polipeptídeo recombinante nas células por transdução ou transfecção. Em modalidades particulares, as células são culti-

vadas após as células terem sido incubadas sob condições estimulantes e transduzidas ou transfectadas com um polinucleotídeo recombinante, por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante. Em algumas modalidades, o cultivo produz uma ou mais composições cultivadas de células T enriquecidas. Em algumas modalidades, essas condições podem ser manipuladas geneticamente para induzir proliferação, expansão, ativação e/ou sobrevivência de células na população. Em modalidades particulares, as condições estimulantes podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, teor de oxigênio, teor de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons e/ou fatores estimulantes, tal como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para promover o crescimento, divisão e/ou expansão das células.

[00624] Em algumas modalidades, as células manipuladas geneticamente são cultivadas em um recipiente que pode ser preenchido, por exemplo, através da porta de alimentação, com meios celulares e/ou células para cultura das células adicionadas. As células podem ser de qualquer fonte celular para a qual a cultura das células é desejada, por exemplo, para expansão e/ou proliferação das células.

[00625] Em alguns aspectos, os meios de cultura são um meio de cultura adaptado que suporta esse crescimento, cultivo, expansão ou proliferação de células, tal como as células T. Em alguns aspectos, o meio pode ser um líquido contendo uma mistura de sais, aminoácidos, vitaminas, açúcares ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, os meios de cultura contêm adicionalmente uma ou mais condições ou agentes estimulantes, tais como estimular o cultivo, expansão ou proliferação de células durante a incubação. Em algumas modalidades, a condição estimulante é ou inclui uma ou mais citoci-

nas, tal como as selecionadas de IL-2, IL-7 ou IL-15. Em algumas modalidades, a citocina é uma citocina recombinante. Em modalidades particulares, as uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes humanas. Em certas modalidades, as uma ou mais citocinas se ligam e/ou são capazes de se ligar a receptores que são expressos por e/ou são endógenos às células T. Em modalidades particulares, as uma ou mais citocinas são ou incluem um membro da família de citocinas do grupo 4-alfa-helix. Em algumas modalidades, os membros da família de citocinas do grupo 4-alfa-hélice incluem, entre outros, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Em algumas modalidades, as uma ou mais citocinas são ou incluem IL-15. Em modalidades particulares, as uma ou mais citocinas são ou incluem IL-7. Em modalidades particulares, as uma ou mais citocinas são ou incluem IL-2 recombinante.

[00626] Em algumas modalidades, a concentração de uma ou mais citocinas nos meios de cultura durante a cultura ou incubação, independentemente, é de ou de cerca de 1 UI/mL a 1500 UI/mL, tal como de ou de cerca de 1 UI/mL a 100 UI/mL, 2 UI/mL a 50 UI/mL, 5 UI/mL a 10 UI/mL, 10 UI/mL a 500 UI/mL, 50 UI/mL a 250 UI/mL ou 100 UI/mL a 200 UI/mL, 50 UI/mL a 1500 UI/mL, 100 UI/mL a 1000 UI/mL ou 200 UI/mL a 600 UI/mL. Em algumas modalidades, a concentração de uma ou mais citocinas, independentemente, é pelo menos ou pelo menos cerca de 1 UI/mL, 5 UI/mL, 10 UI/mL, 50 UI/mL, 100 UI/mL, 200 UI/mL, 500 UI/mL, 1000 UI/mL ou 1500 UI/mL.

[00627] Em alguns aspectos, as células são incubadas por pelo menos uma parte do tempo após a transferência das células manipuladas geneticamente e do meio de cultura. Em algumas modalidades, as condições estimulantes geralmente incluem uma temperatura ade-

quada para o crescimento de células imunes primárias, tal como linfócitos T humanos, por exemplo, pelo menos cerca de 25 graus Celsius, geralmente pelo menos 30 graus e geralmente em ou cerca de 37 graus Celsius. Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas é incubada a uma temperatura de 25 a 38 ºC, tal como 30 a 37 ºC, por exemplo, a cerca de 37 ºC ± 2 ºC. Em algumas modalidades, a incubação é realizada por um período de tempo até a cultura, por exemplo, cultivo ou expansão, resulta em densidade, concentração, número ou dose desejada ou limite de células. Em algumas modalidades, a incubação é realizada por um período de tempo até a cultura, por exemplo, cultivo ou expansão, resulta em densidade ou concentração desejada, limite, número ou dose de células viáveis. Em algumas modalidades, a incubação é maior ou maior que maior que cerca 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias ou mais.

[00628] Em algumas modalidades, as células são incubadas sob condições para manter uma quantidade alvo de dióxido de carbono na cultura celular. Em alguns aspectos, isso garante o cultivo, a expansão e a proliferação ideais das células durante o crescimento. Em alguns aspectos, a quantidade de dióxido de carbono (CO_2) está entre 10% e 0% (v/v) do referido gás, tal como entre 8% e 2% (v/v) do referido gás, por exemplo, uma quantidade de ou cerca de 5% (v/v) CO_2.

[00629] Em modalidades particulares, o cultivo é realizado em um sistema fechado. Em certas modalidades, o cultivo é realizado em um sistema fechado sob condições estéreis. Em modalidades particulares, o cultivo é realizado no mesmo sistema fechado que uma ou mais etapas dos sistemas fornecidos. Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas é removida de um sistema fechado e colocada e/ou conectada a um biorreator para o cultivo. Exemplos de biorreatores adequados para o cultivo incluem, mas não estão limitados a,

GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, sistemas de biorreatores SmartRocker Finesse e sistemas de biorreatores Pall XRS. Em algumas modalidades, o biorreator é usado para perfundir e/ou misturar as células durante pelo menos uma porção da etapa de cultivo.

[00630] Em algumas modalidades, as células cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator sofrem expansão durante o cultivo mais rapidamente do que as células que são cultivadas sem um biorreator, por exemplo, células que são cultivadas sob condições estáticas, tal como sem mistura, balanço, movimento e/ou perfusão. Em algumas modalidades, as células cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator atingem ou alcançam um limite de expansão, contagem de células e/ou densidade em 14 dias, 10 dias, 9 dias, 8 dias, 7 dias, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias, 60 horas, 48 horas, 36 horas, 24 horas ou 12 horas. Em algumas modalidades, as células cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator atingem ou alcançam um limite de expansão, contagem de células e/ou densidade de pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 100%, pelo menos 150%, pelo menos 1 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes do que as células cultivadas em um processo exemplar e/ou alternativo, em que as células não são cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator.

[00631] Em algumas modalidades, a mistura é ou inclui balanço e/ou movimento. Em algumas modalidades, as células são incubadas usando recipientes, por exemplo, bolsas, que são usadas em conexão com um biorreator. Em alguns casos, o biorreator pode ser submetido a movimento ou balanço, o que, em alguns aspectos, pode aumentar a

transferência de oxigênio. A movimentação do biorreator pode incluir, mas não se limita a, girar ao longo de um eixo horizontal, girar ao longo de um eixo vertical, um movimento de balanço ao longo de um eixo horizontal enviesado ou inclinado do biorreator ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da incubação é realizada com balanço. A velocidade e o ângulo do balanço podem ser ajustados para alcançar a agitação desejada. Em algumas modalidades, o ângulo do balanço é ou é de cerca de 20 °, 19 °, 18 °, 17 °, 16 °, 15 °, 14 °, 13 °, 12 °, 11 °, 10 °, 9 °, 8 °, 7 °, 6 °, 5 °, 4 °, 3 °, 2 ° ou 1 °. Em certas modalidades, o ângulo do balanço está entre 6-16 °. Em outras modalidades, o ângulo do balanço está entre 7-16 °. Em outras modalidades, o ângulo do balanço está entre 8-12 °. Em algumas modalidades, a taxa de balanço é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 1 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 rpm. Em algumas modalidades, a taxa de balanço está entre 4 e 12 rpm, tal como entre 4 e 6 rpm, cada uma inclusive. Pelo menos uma parte da expansão da cultura de células é realizada com um movimento de balanço, tal como em um ângulo entre 5 ° e 10 °, tal como 6 °, a uma velocidade de balanço constante, tal como uma velocidade entre 5 e 15 RPM, tal como 6 RMP ou 10 RPM.

[00632] Em algumas modalidades, uma composição compreendendo células, tal como células T manipuladas geneticamente, por exemplo células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente ou células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente, ou células manipuladas geneticamente de qualquer fenótipo como aqui descrito, são cultivadas na presença de um tensoativo. Em modalidades particulares, o cultivo das células da composição reduz a quantidade de tensão de cisalhamento que pode ocorrer durante o cultivo, por exemplo, devido à mistura, balanço, movimento e/ou perfusão. Em modalidades particulares, a composição de

célula, tal como células T manipuladas geneticamente, por exemplo, células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente ou células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente, são cultivadas com o tensoativo e pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99% ou pelo menos 99,9% das células T sobrevivem, por exemplo, são viáveis e/ou não sofrem necrose, morte celular programada ou apoptose, durante ou pelo menos 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou mais de 7 dias após o término do cultivo. Em modalidades particulares, a composição de célula, tal como células T manipuladas geneticamente, por exemplo, células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente ou células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente, são cultivadas na presença de um tensoativo e menos que 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 25%, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos de 5%, menos de 1%, menos de 0,1% ou menos de 0,01% das células sofrem morte celular, por exemplo, morte celular programada, apoptose e/ou necrose, tal como devido ao cisalhamento ou estresse induzido pelo cisalhamento.

[00633] Em modalidades particulares, uma composição de célula, tal como células T manipuladas geneticamente, por exemplo células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente ou células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente, são cultivadas na presença entre 0,1 µl/ml e 10,0 µl/ml, entre 0,2 µl/ml e 2,5 µl/ml, entre 0,5 µl/ml e 5 µl/ml, entre 1 µl/ml e 3 µl/ml, ou entre 2 µl/ml e 4 µl/ml do tensoativo. Em algumas modalidades, a composição de célula, tal como células T manipuladas geneticamente, por exemplo, células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente ou células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente, são cultivadas na presença de, de cerca de, ou pelo menos 0,1 µl/ml, 0,2 µl/ml, 0,2 µl/ml, 0,4 µl/ml, 0,6 µl/ml, 0,8 µl/ml, 1 µl/ml, 1,5 µl/ml, 2,0 µl/ml, 2,5 µl/ml, 5,0 µl/ml, 10 µl/ml, 25 µl/ml ou 50 µl/ml do tensoativo. Em certas modali-

dades, a composição das células é cultivada na presença de ou de cerca de 2 µl/ml do tensoativo.

[00634] Em algumas modalidades, um tensoativo é ou inclui um agente que reduz a tensão superficial de líquidos e/ou sólidos. Por exemplo, um tensoativo inclui um álcool graxo (por exemplo, álcool esterílico), um éter de polioxietileno glicol de octilfenol (por exemplo, Triton X-100) ou um alquil éster de polioxietileno glicol sorbitano (por exemplo, polissorbato 20, 40, 60). Em certas modalidades, o tensoativo é selecionado a partir do grupo que consiste em Polisorbato 80 (PS80), polissorbato 20 (PS20), poloxâmero 188 (P188). Em uma modalidade exemplar, a concentração do tensoativo no meio de alimentação quimicamente definido é de cerca de 0,0025% a cerca de 0,25% (v/v) de PS80; cerca de 0,0025% a cerca de 0,25% (v/v) de PS20; ou cerca de 0,1% a cerca de 5,0% (p/v) de P188.

[00635] Em algumas modalidades, o tensoativo é ou inclui um tensoativo aniônico, um tensoativo catiônico, um tensoativo zwitteriônico ou um tensoativo não iônico adicionado a ele. Os tensoativos aniônicos adequados incluem, mas não estão limitados a, alquil sulfonatos, alquil fosfatos, alquil fosfonatos, laurato de potássio, estearato de trietanolamina, lauril sulfato de sódio, dodecilsulfato de sódio, alquil polioxietileno sulfatos, alginato de sódio, dioctil sulfossuccinato de sódio, fosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico e seus sais, carboximetilcelulose de sódio, ácido cólico e outros ácidos biliares (por exemplo, ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicodoxicólico) e seus sais (por exemplo, desoxicolato de sódio).

[00636] Em algumas modalidades, os tensoativos não iônicos adequados incluem: gliceril ésteres, éteres de álcool graxo de polioxietileno, ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano (polissorbatos), ésteres de ácidos graxos de polioxietileno, ésteres de sorbitano,

monoestearato de glicerol, polietileno glicóis, polipropileno glicóis, álcool cetílico, álcool cetoestearílico , álccol estearílico, álcoois de aril alquil poliéter, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno (poloxâmeros), poloxaminas, metilcelulose, hidroximetil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropilmetil celulose, celulose não cristalina, polissacarídeos incluindo amido e derivados de amido, tais como amido de hidroxietil, (HES) álcool polivinílico, e polivinilpirrolidona. Em certas modalidades, o tensoativo não iônico é um copolímero de polioxietileno e polioxipropileno e, de preferência, um copolímero em bloco de propileno glicol e etileno glicol. Esses polímeros são vendidos sob o nome comercial POLOXAMER, também conhecido como PLURONIC® F68 ou Kolliphor® P188. Entre os ésteres de ácidos graxos de polioxietileno estão incluídos aqueles com cadeias alquil curtas. Um exemplo desse tensoativo é o SOLUTOL® HS 15, polietileno-660-hidroxiestearato.

[00637] Em algumas modalidades, os tensoativos catiônicos adequados podem incluir, mas não estão limitados a, fosfolipídios naturais, fosfolipídios sintéticos, compostos de amônio quaternário, cloreto de benzalcônio, brometo de cetiltrimetil amônio, quitosanos, cloreto de lauril dimetil benzil amônio, cloridrocloridratos de acil carnitina, brometo de dimetil dioctadecil amônio (DDAB), propano de dioleoltrimetil amônio (DOTAP), propano de dimiristoil trimetil amônio (DMTAP), colesterol de dimetil amino etano carbamoil (DC-col), 1,2-diacilglicerol-3-(O-alquil) fosfocololina, O-alquilfosfatidilcolina, halogenetos de alquil piridínio ou alquil aminas de cadeia longa, tal como, por exemplo, n-octilamina e oleilamina.

[00638] Os tensoativos zwitteriônicos são eletricamente neutros, mas têm cargas locais positivas e negativas na mesma molécula. Os tensoativos zwitteriônicos adequados incluem, mas não estão limitados a, fosfolipídios zwitteriônicos. Fosfolipídios adequados incluem fosfatidil-

colina, fosfatidiletanolamina, diacil-glicero-fosfoetanolamina (tais como dimiristoil-glicero-fosfoetanolamina (DMPE), dipalmitoil-glicero-fosfoetanolamina (DPPE), distearoil-glicerol-fosfoetanolamina (DOPE)). Misturas de fosfolípidos que incluem fosfolípidos aniônicos e zwitteriônicos podem ser empregues nesta invenção. Tais misturas incluem, mas não estão limitadas a, lisofosfolípidos, fosfolípidos de ovo ou soja ou qualquer combinação dos mesmos. O fosfolípido, aniônico, zwitteriônico ou uma mistura de fosfolipídios, pode ser salinizado ou dessalinizado, hidrogenado ou parcialmente hidrogenado ou semissintético ou sintético natural.

[00639] Em certas modalidades, o tensoativo é poloxâmero, por exemplo, poloxâmero 188. Em algumas modalidades, uma composição de célula é cultivada na presença entre 0,1 µl/ml e 10,0 µl/ml, entre 0,2 µl/ml e 2,5 µl/ml, entre 0,5 µl/ml e 5 µl/ml, entre 1 µl/ml e 3 µl/ml, ou entre 2 µl/ml e 4 µl/ml de poloxâmero. Em algumas modalidades, a composição de célula é cultivada na presença de, de cerca de, ou pelo menos 0,1 µl/ml, 0,2 µl/ml, 0,4 µl/ml, 0,6 µl/ml, 0,8 µl/ml, 1 µl/ml, 1,5 µl/ml, 2,0 µl/ml, 2,5 µl/ml, 5,0 µl/ml, 10 µl/ml, 25 µl/ml ou 50 µl/ml do tensoativo. Em certas modalidades, a composição de célula é cultivada na presença de ou de cerca de 2 µl/ml de poloxâmero.

[00640] Em alguns aspectos, as células $CD4^+$ e $CD8^+$ são expandidas, em alguns casos cada uma separadamente expandida ou expandida em conjunto, até alcançarem uma quantidade limite ou densidade celular. Em modalidades particulares, o cultivo termina, tal como na colheita de células, quando as células atingem uma quantidade, concentração e/ou expansão limite. Em modalidades particulares, o cultivo termina quando a célula alcança ou alcança cerca de ou pelo menos uma expansão de 1,5 vez, uma expansão de 2 vezes, uma expansão de 2,5 vezes, uma expansão de 3 vezes, uma expansão de 3,5 vezes, uma expansão de 4 vezes, uma expansão de 4,5 vezes, uma expan-

são de 5 vezes, uma expansão de 6 vezes, uma expansão de 7 vezes, uma expansão de 8 vezes, uma expansão de 9 vezes, uma expansão de 10 vezes ou maior que uma expansão de 10 vezes, por exemplo, com respeito e/ou em relação à quantidade de densidade das células no início ou começo do cultivo. Em algumas modalidades, a expansão limite é uma expansão de 4 vezes, por exemplo, com respeito e/ou em relação à quantidade de densidade das células no início ou começo do cultivo. Em algumas modalidades, o cultivo termina, tal como através da colheita de células, quando as células atingem uma quantidade total limite de células, por exemplo, contagem limite de células. Em algumas modalidades, o cultivo termina quando as células atingem uma contagem limite total de células nucleadas (TNC). Em algumas modalidades, o cultivo termina quando as células atingem uma quantidade viável limite de células, por exemplo, contagem de células viável limite. Em algumas modalidades, a contagem de células limite é ou é cerca de ou é pelo menos 50 x 10^6 células, 100 x 10^6 células, 200 x 10^6 células, 300 x 10^6 células, 400 x 10^6 células, 600 x 10^6 células, 800 x 10^6 células, 1000 x 10^6 células, 1200 x 10^6 células, 1400 x 10^6 células, 1600 x 10^6 células, 1800 x 10^6 células, 2000 x 10^6 células, 2500 x 10^6 células, 3000 x 10^6 células, 4000 x 10^6 células, 5000 x 10^6 células, 10.000 x 10^6 células, 12.000 x 10^6 células, 15.000 x 10^6 células ou 20.000 x 10^6 células, ou qualquer um dos limites precedentes de células viáveis.

[00641] Em modalidades particulares, o cultivo termina quando as células atingem uma contagem limite de células. Em algumas modalidades, o cultivo termina em, em cerca de, ou dentro de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias ou mais, após a contagem limite de células ser alcançada. Em modalidades particulares, o cultivo é finalizado em ou cerca de 1 dia após a contagem de células limite ser alcançada. Em certas moda-

lidades, a densidade limite é, é cerca de 0,1 x 10^6 células/ml, 0,5 x 10^6 células/ml, 1 x 10^6 células/ml, 1,2 x 10^6 células/ml, 1,5 x 10^6 células/ml, 1,6 x 10^6 células/ml, 1,8 x 10^6 células/ml, 2,0 x 10^6 células/ml, 2,5 x 10^6 células/ml, 3,0 x 10^6 células/ml, 3,5 x 10^6 células/ml, 4,0 x 10^6 células/ml, 4,5 x 10^6 células/ml, 5,0 x 10^6 células/ml, 6 x 10^6 células/ml, 8 x 10^6 células/ml ou 10 x 10^6 células/ml ou qualquer um dos limites precedentes de células viáveis. Em modalidades particulares, o cultivo termina quando as células atingem uma densidade limite. Em algumas modalidades, o cultivo termina em, cerca de, ou dentro de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias ou mais, após a densidade limite ser alcançada. Em modalidades particulares, o cultivo é finalizado em ou cerca de 1 dia após a densidade limite ser alcançada.

[00642] Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da incubação é realizada sob condições estáticas. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da incubação é realizada com perfusão, tal como perfundir o meio gasto e perfundir em meio fresco durante a cultura. Em algumas modalidades, o método inclui uma etapa de perfusão de meio de cultura fresco na cultura de células, tal como através de uma porta de alimentação. Em algumas modalidades, o meio de cultura adicionado durante a perfusão contém os um ou mais agentes estimulantes, por exemplo, uma ou mais citocinas recombinantes, tal como IL-2, IL-7 e/ou IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura adicionado durante a perfusão é o mesmo meio de cultura usado durante uma incubação estática.

[00643] Em algumas modalidades, subsequente à incubação, o recipiente, por exemplo, bolsa, é reconectado a um sistema para executar uma ou mais outras etapas de processamento para fabricar, gerar ou produzir a terapia celular, tal como é reconectado ao sistema que contém a câmara centrífuga. Em alguns aspectos, as células cultiva-

das são transferidas da bolsa para a cavidade interna da câmara para a formulação das células cultivadas.

[00644] Em algumas modalidades, as células T são expandidas adicionando a células alimentadoras de composição iniciadora de cultura, tal como células mononucleares de sangue periférico (PBMC) não divididas (por exemplo, de modo que a população resultante de células contenha pelo menos cerca de 5, 10, 20 ou 40 ou mais células alimentadoras de PBMC para cada linfócito T na população inicial a ser expandida); e incubando a cultura (por exemplo, por um tempo suficiente para expandir o número de células T). Em alguns aspectos, as células alimentadoras que não se dividem podem compreender células alimentadoras de PBMC irradiadas com gama. Em algumas modalidades, o PBMC é irradiado com raios gama na faixa de cerca de 3000 a 3600 rads para impedir a divisão celular. Em alguns aspectos, as células alimentadoras são adicionadas ao meio de cultura antes da adição das populações de células T.

E. Composições e Formulações

[00645] Os métodos aqui fornecidos são capazes de produzir uma composição de saída de células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) com características fenotípicas e funcionais específicas. Em algumas modalidades, a composição de saída pode ser formulada, por exemplo, para ser uma composição ou formulação terapêutica ou farmacêutica. Assim, também são fornecidas composições (por exemplo, composições de saída) compreendendo qualquer uma das células e/ou doses de células, tal como composições em forma de dose unitária incluindo o número de células para administração em uma dada dose ou fração, incluindo composições e formulações farmacêuticas. As composições e formulações farmacêuticas geralmente incluem um ou mais veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável opcional. Em algumas modalidades, a dose de células com-

preendendo células manipuladas geneticamente com um receptor de antígeno recombinante, por exemplo, CAR ou TCR, é fornecida como uma composição ou formulação, tal como uma composição ou formulação farmacêutica. Tais composições podem ser usadas de acordo com os métodos fornecidos e/ou com os artigos de fabricação ou composições fornecidas, tais como na prevenção ou tratamento de doenças, condições e distúrbios, ou nos métodos de detecção, diagnóstico e prognóstico. Em algumas modalidades, também são fornecidas qualquer uma das doses unitárias aqui descritas e/ou composições compreendendo qualquer uma das doses unitárias de células aqui descritas. Em algumas modalidades, a composição é uma composição de saída.

[00646] Em algumas modalidades, a dose de células compreendendo células manipuladas geneticamente com um receptor de antígeno recombinante, por exemplo, CAR ou TCR, é fornecido como uma composição ou formulação, tal como uma composição ou formulação farmacêutica. Tais composições podem ser usadas de acordo com métodos de terapia celular adotiva, incluindo métodos para a prevenção ou tratamento de doenças, condições e distúrbios, ou em métodos de detecção, diagnóstico e prognóstico. Em algumas modalidades, essas composições ou formulações podem ser armazenadas, contidas ou transferidas nos recipientes de materiais biomédicos fornecidos e/ou como um componente dos artigos de fabricação fornecidos.

[00647] Em alguns casos, as células são processadas em uma ou mais etapas (por exemplo, realizadas na câmara centrífuga e/ou sistema fechado) para fabricar, gerar ou produzir uma terapia celular e/ou células manipuladas geneticamente podem incluir a formulação de células, tal como a formulação de células geneticamente modificadas resultantes das etapas de processamento de transdução fornecidas antes ou depois da cultura, por exemplo, cultivo e expansão e/ou uma ou

mais outras etapas de processamento, conforme descrito. Em alguns casos, as células podem ser formuladas em uma quantidade para administração de dosagem, tal como para uma administração de dose unitária única ou administração de dosagem múltipla. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos associados à formulação de células incluem o processamento de células transduzidas, tal como células transduzidas e/ou expandidas usando as etapas de processamento descritas acima, em um sistema fechado. Em algumas modalidades, as células formuladas podem ser transferidas ou introduzidas nos vasos de material biomédico, por exemplo, frascos, aqui fornecidos.

[00648] Em certas modalidades, uma ou mais composições de células (por exemplo, composição de saída), tal como células T manipuladas geneticamente e cultivadas, são formuladas. Em modalidades particulares, uma ou mais composições de células, tal como células T manipuladas geneticamente e cultivadas, são formuladas após a uma ou mais composições terem sido manipuladas geneticamente e/ou cultivadas.

[00649] Em algumas modalidades, são formuladas células T, tal como células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$, geradas por uma ou mais das etapas de processamento. Em alguns aspectos, uma pluralidade de composições é separadamente fabricada, produzida ou gerada, cada um contendo uma população diferente e/ou subtipos de células do objeto, tal como para administração separada ou independente, opcionalmente dentro de um determinado período de tempo. Por exemplo, formulações separadas de células manipuladas geneticamente contendo diferentes populações ou subtipos de células podem incluir células T $CD8^+$ e $CD4^+$, respectivamente, e/ou populações enriquecidas com $CD8^+$- e $CD4^+$-, respectivamente, por exemplo, células T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$ cada uma incluindo individualmente células geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, pelo

menos uma composição é formulada com células T $CD4^+$ geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, pelo menos uma composição é formulada com células T $CD8^+$ geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, a administração da dose compreende administrar uma primeira composição compreendendo uma dose de células T $CD8^+$ ou uma dose de células T $CD4^+$ e a administração de uma segunda composição compreendendo a outra da dose da célula T $CD4^+$ e as células T $CD8^+$. Em algumas modalidades, uma primeira composição compreendendo uma dose de células T $CD8^+$ ou uma dose de células T $CD4^+$ é administrada antes da segunda composição compreendendo a outra da dose de células T $CD4^+$ e as células T $CD8^+$. Em algumas modalidades, a administração da dose compreende administrar uma composição compreendendo uma dose de células T $CD8^+$ e uma dose de células T $CD4^+$.

[00650] Em algumas modalidades, as células (tal como células manipuladas geneticamente) são enriquecidas ou classificadas, por exemplo, no final ou próximo ao final do processo de produção antes da formulação com base na expressão da superfície de um ou mais marcadores do fenótipo desejado, tal como expressão de CCR7 ou CD27, por exemplo, para garantir pelo menos uma porcentagem particular (tal como pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%) ou o número de células (ou subconjunto das mesmas) na composição terapêutica administrada são positivos para esse marcador.

[00651] Em certas modalidades, a uma ou mais composições de células (por exemplo, composição de saída), tal como células T manipuladas geneticamente e cultivadas, são ou incluem duas composições separadas, por exemplo, composições separadas de manipulação e/ou cultivadas, de células. Em modalidades particulares, duas

composições separadas de células, por exemplo, duas composições separadas de células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$ selecionadas, isoladas e/ou enriquecidas a partir da mesma amostra biológica, geneticamente manipuladas separadamente e cultivadas separadamente, são formuladas separadamente. Em certas modalidades, as duas composições separadas incluem uma composição de célula T $CD4^+$, tal como uma composição de célula T $CD4^+$ manipuladas geneticamente e/ou cultivadas. Em modalidades particulares, as duas composições separadas incluem uma composição de célula T $CD8^+$, tal como uma composição de célula T $CD8^+$ manipuladas geneticamente e/ou cultivadas. Em algumas modalidades, duas composições separadas de células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$, tais como composições separadas de células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente e cultivadas e células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente e cultivadas, são formuladas separadamente. Em algumas modalidades, uma única composição de célula é formulada. Em certas modalidades, a composição única é uma composição de célula T $CD4^+$, tal como uma composição de célula T $CD4^+$ manipuladas geneticamente e/ou cultivadas. Em algumas modalidades, a composição única é uma composição de célula T $CD4^+$ e $CD8^+$ que foram combinadas a partir de composições separadas antes da formulação.

[00652] Em algumas modalidades, composições separadas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, tal como composições separadas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ manipuladas geneticamente e cultivadas (por exemplo, composições de saída) são combinadas em uma única composição e são formuladas. Em certas modalidades, composições formuladas separadas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ são combinadas em uma única composição após a formulação ter sido realizada e/ou concluída. Em modalidades particulares, composições separadas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, tal como composições separadas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ manipuladas geneticamente e cultivadas, são formuladas separada-

mente como composições separadas.

[00653] Em algumas modalidades, as células podem ser formuladas em um recipiente, tal como um frasco, tal como qualquer frasco nos vasos de materiais biomédicos aqui fornecidos. Em algumas modalidades, as células são formuladas entre 0 dias e 10 dias, entre 0 e 5 dias, entre 2 dias e 7 dias, entre 0,5 dias e 4 dias, ou entre 1 dia e 3 dias após as células após a contagem, densidade e/ou expansão de célula limite serem alcançadas durante o cultivo. Em certas modalidades, as células são formuladas em ou em ou cerca de ou dentro de 12 horas, 18 horas, 24 horas, 1 dia, 2 dias ou 3 dias após a contagem, densidade e/ou expansão limite de células ter sido alcançada durante o cultivo. Em algumas modalidades, as células são formuladas dentro ou dentro de cerca de 1 dia após a contagem, densidade e/ou a expansão de células limite ter sido alcançada durante cultivo.

[00654] Em algumas modalidades, as células são formuladas em um tampão farmaceuticamente aceitável, que pode, em alguns aspectos, incluir um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o processamento inclui a troca de um meio em um meio ou tampão de formulação que seja farmaceuticamente aceitável ou desejado para administração a um objeto. Em algumas modalidades, as etapas de processamento podem envolver a lavagem das células transduzidas e/ou expandidas para substituir as células em um tampão farmaceuticamente aceitável que pode incluir um ou mais veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis opcionais. Exemplos de tais formas farmacêuticas, incluindo veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis, podem ser descritos abaixo em conjunto com formas aceitáveis para administrar as células e composições a um objeto. A composição farmacêutica em algumas modalidades contém as células em quantidades eficazes para tratar ou prevenir a doença ou condição, tal como uma quantidade terapeuticamente eficaz

ou profilaticamente eficaz.

[00655] O termo "formulação farmacêutica" refere-se a uma preparação que está em tal forma a permitir que a atividade biológica de um ingrediente ativo nela contido seja eficaz e que não contenha componentes adicionais que sejam inaceitavelmente tóxicos para um objeto ao qual a formulação seria administrada.

[00656] Um "veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se a um ingrediente em uma formulação farmacêutica, que não seja um ingrediente ativo, que não seja tóxico para um objeto. Um veículo farmaceuticamente aceitável inclui, mas não está limitado a, um tampão, excipiente, estabilizador ou conservante.

[00657] Em alguns aspectos, a escolha do veículo é determinada em parte pela célula particular e/ou pelo método de administração. Por conseguinte, existe uma variedade de formulações adequadas. Por exemplo, a composição farmacêutica pode conter conservantes. Conservantes adequados podem incluir, por exemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sódio e cloreto de benzalcônio. Em alguns aspectos, uma mistura de dois ou mais conservantes é usada. O conservante ou suas misturas estão tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 2% em peso da composição total. Veículos são descritos, por exemplo, por Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980). Veículos farmaceuticamente aceitáveis são geralmente não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas e incluem, mas não estão limitados a: tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; álcool parabeno como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo

peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons formadores de sal, tal como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou tensoativos não iônicos, tal como polietilenoglicol (PEG).

[00658] Agentes tamponadores em alguns aspectos estão incluídos nas composições. Os agentes tamponadores adequados incluem, por exemplo, ácido cítrico, citrato de sódio, ácido fosfórico, fosfato de potássio e vários outros ácidos e sais. Em alguns aspectos, uma mistura de dois ou mais agentes tamponadores é usada. O agente tamponador ou suas misturas estão tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 4% em peso da composição total. São conhecidos métodos para preparar composições farmacêuticas administráveis. Métodos exemplares são descritos em mais detalhes, por exemplo, em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21º ed. (1 de maio de 2005).

[00659] As formulações podem incluir soluções aquosas. A formulação ou composição também pode conter mais de um ingrediente ativo útil para a indicação, doença ou condição particular sendo tratada com as células, preferivelmente aquelas com atividades complementares às células, onde as respectivas atividades não afetam adversamente uma à outra. Tais ingredientes ativos estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são efetivas para a finalidade pretendida. Assim, em algumas modalidades, a composição farmacêutica inclui adicionalmente outros agentes ou drogas farmaceuticamente ativas, tal como agentes quimioterapêuticos, por exem-

plo, asparaginase, bussulfano, carboplatina, cisplatina, daunorrubicina, doxorrubicina, fluorouracil, gemcitabina, hidroxiureia, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina e/ou vincristina. Em algumas modalidades, os agentes ou células são administrados na forma de um sal, por exemplo, um sal farmaceuticamente aceitável. Os sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem aqueles derivados de ácidos minerais, tal como ácidos clorídrico, bromídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico e sulfúrico e ácidos orgânicos, tais como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, lático, fumárico, benzóico, glicólico, glucônico, succínico e arilssulfônico, por exemplo, ácido p-toluenossulfônico.

[00660] As composições em algumas modalidades são fornecidas como preparações líquidas estéreis, por exemplo, soluções aquosas isotônicas, suspensões, emulsões, dispersões ou composições viscosas, que podem em alguns aspectos ser tamponadas para um pH selecionado. As composições líquidas podem compreender veículos, que podem ser um solvente ou meio dispersante contendo, por exemplo, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido) e suas misturas adequadas. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando as células em um solvente, tal como em mistura com um veículo, diluente ou excipiente adequado, tal como água estéril, solução salina fisiológica, glicose, dextrose ou similares. As composições podem conter substâncias auxiliares, tal como agentes umectantes, dispersantes ou emulsificantes (por exemplo, metilcelulose), agentes tamponadores de pH, aditivos que melhoram a gelificação ou viscosidade, conservantes, agentes aromatizantes e/ou corantes, dependendo da via de administração e preparação desejada. Em alguns aspectos, os textos-padrão podem ser consultados para preparar as preparações adequadas.

[00661] Vários aditivos que melhoram a estabilidade e esterilidade das composições, incluindo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e tampões, podem ser adicionados. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser assegurada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol e ácido sórbico. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pelo uso de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00662] Em algumas modalidades, o tampão de formulação contém um crioconservante. Em algumas modalidades, a célula é formulada com uma solução crioconservante que contém 1,0% a 30% de solução DMSO, tal como uma solução de 5% a 20% de DMSO ou uma solução de 5% a 10% de DMSO. Em algumas modalidades, a solução de criopreservação é ou contém, por exemplo, PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina de soro humano (HSA) ou outros meios de congelamento de células adequados. Em algumas modalidades, a solução crioconservante é ou contém, por exemplo, pelo menos ou cerca de 7,5% de DMSO. Em algumas modalidades, as etapas de processamento podem envolver a lavagem das células transduzidas e/ou expandidas para substituir as células em uma solução crioconservante. Em algumas modalidades, as células são congeladas, por exemplo, crioconservadas ou crioprotegidas, em meios e/ou solução com uma concentração final de ou de cerca de 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9. 0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% ou 5,0% de DMSO ou entre 1% e 15%, entre 6% e 12%, entre 5% e 10% ou entre 6% e 8% de DMSO. Em modalidades particulares, as células são congeladas, por exemplo, crioconservadas ou crioprotegidas, em meios e/ou solução com uma concentração final de cerca de 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%,

0,75%, 0,5% ou 0,25% de HSA, ou entre 0,1% e 5%, entre 0,25% e 4%, entre 0,5% e 2%, ou entre 1% e 2% de HSA.

[00663] Em modalidades particulares, a composição de células T enriquecidas, por exemplo, células T que foram estimuladas, manipuladas geneticamente e/ou cultivadas, são formuladas, crioconservadas e, em seguida, armazenadas por um período de tempo, por exemplo, no vaso de materiais biomédicos fornecido. Em certas modalidades, as células crioconservadas formuladas são armazenadas até que as células sejam liberadas para infusão. Em modalidades particulares, as células crioconservadas formuladas são armazenadas entre 1 dia e 6 meses, entre 1 mês e 3 meses, entre 1 dia e 14 dias, entre 1 dia e 7 dias, entre 1 dia e 7 dias, entre 3 dias e 6 dias, entre 6 meses e 12 meses ou mais de 12 meses. Em algumas modalidades, as células são crioconservadas e armazenadas por, por cerca de, ou por menos de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias. Em certas modalidades, as células são descongeladas e administradas a um objeto após o armazenamento. Em certas modalidades, as células são armazenadas por ou por cerca de 5 dias.

[00664] Em algumas modalidades, a formulação é realizada usando uma ou mais etapas de processamento, incluindo lavagem, diluição ou concentração das células, tal como as células cultivadas ou expandidas. Em algumas modalidades, o processamento pode incluir diluição ou concentração das células até uma concentração ou número desejado, tal como composições de forma de dose unitária incluindo o número de células para administração em uma dada dose ou fração da mesma. Em algumas modalidades, as etapas de processamento podem incluir uma redução de volume para aumentar assim a concentração de células, conforme desejado. Em algumas modalidades, as etapas de processamento podem incluir uma adição de volume para diminuir assim a concentração de células, conforme desejado. Em al-

gumas modalidades, o processamento inclui adicionar um volume de um tampão de formulação a células transduzidas e/ou expandidas. Em algumas modalidades, o volume do tampão de formulação é de 10 mL a 1000 mL ou de cerca de 10 mL a cerca de 1000 mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL ou 1000 mL.

[00665] Em algumas modalidades, as células são cultivadas, tal como manipuladas geneticamente e/ou cultivadas estimuladas em um recipiente, por exemplo, bolsa ou câmara centrífuga. Em alguns aspectos, o recipiente é um primeiro recipiente e as células cultivadas são expressas ou transferidas do primeiro recipiente, por exemplo, bolsa ou câmara centrífuga, para um segundo recipiente, tal como vasos de material biomédico, que está operacionalmente ligado ao primeiro recipiente. Em algumas modalidades, os vasos de material biomédico são configurados para integração e/ou conexão operacional e/ou são integrados ou operacionalmente conectados ao primeiro recipiente, por exemplo, bolsa ou câmara centrífuga, usada para uma ou mais das etapas de processamento anteriores. Em algumas modalidades, o vaso de material biomédico é conectado ao primeiro recipiente, por exemplo, bolsa ou câmara centrífuga, em uma linha ou posição de saída. Em alguns casos, o primeiro recipiente, por exemplo, bolsa ou câmara centrífuga, é conectado ao frasco do vaso de material biomédico no tubo de entrada.

[00666] Em algumas modalidades, essas etapas de processamento para formular uma composição de célula são realizadas em um sistema fechado. Exemplos de tais etapas de processamento podem ser executados usando uma câmara centrífuga em conjunto com um ou mais sistemas ou kits associados a um sistema de processamento celular, tal como uma câmara centrífuga produzida e vendida pela Biosa-

fe SA, incluindo aquelas para uso com os sistemas de processamento de células Sepax® ou Sepax 2®. Um sistema e processo exemplar é descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Em algumas modalidades, o método inclui efetuar expressão ou transferência da cavidade interna da câmara centrífuga para uma composição formulada, que é a composição resultante de células formuladas em um tampão de formulação, tal como um tampão farmaceuticamente aceitável, em qualquer uma das modalidades acima, tal como descrito. Em algumas modalidades, a expressão ou transferência da composição formulada é para um recipiente, tal como frascos dos vasos de material biomédico aqui descritos, que está operacionalmente ligado como parte de um sistema fechado com a câmara centrífuga. Em algumas modalidades, os vasos de material biomédico são configurados para integração e/ou conexão operacional e/ou são integrados ou conectados operacionalmente, a um sistema ou dispositivo fechado que executa uma ou mais etapas de processamento. Em algumas modalidades, o vaso de material biomédico é conectado a um sistema em uma linha de saída ou posição de saída. Em alguns casos, o sistema fechado é conectado ao frasco do vaso de material biomédico no tubo de entrada. Exemplos de sistemas fechados para uso com os vasos de material biomédico aqui descritos incluem o sistema Sepax® e Sepax® 2.

[00667] Em algumas modalidades, a composição pode ser transferida do primeiro recipiente, tal como uma câmara centrífuga ou sistema de processamento de células, para os vasos de material biomédico fornecidos através de um kit de saída de várias portas contendo um coletor de tubos de multivia associado a cada extremidade de uma linha de tubulação com uma porta a qual um ou vários recipientes, por exemplo, vasos de material biomédico, podem ser conectados para expressão da composição formulada. Em alguns aspectos, um número

ou pluralidade desejada de tais frascos, pode ser esterilmente conectado a um ou mais, geralmente duas ou mais, tal como pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais das portas da saída de multiporta. Por exemplo, em algumas modalidades, um ou mais recipientes, por exemplo, vasos de material biomédico, podem ser conectados às portas, ou a algumas do que todas as portas. Assim, em algumas modalidades, o sistema pode efetuar a expressão da composição de saída em uma pluralidade de frascos dos vasos de material biomédico.

[00668] Em alguns aspectos, as células podem ser expressas ou transferidas para um ou mais da pluralidade de recipientes de saída, por exemplo, frascos dos vasos de material biomédico, em uma quantidade para administração de dosagem, tal como para uma administração de dose unitária única ou administração de doses múltiplas. Por exemplo, em algumas modalidades, os frascos dos vasos de material biomédico, podem conter cada, o número de células para administração em uma dada dose ou fração. Assim, cada frasco, em alguns aspectos, pode conter uma dose unitária única para administração ou pode conter uma fração de uma dose desejada tal que mais da pluralidade de frascos, tal como dois dos frascos, ou 3 dos frascos, juntos constituem uma dose para administração.

[00669] Assim, os frascos nos vasos de materiais biomédicos aqui descritos, geralmente contêm as células a serem administradas, por exemplo, uma ou mais doses unitárias das mesmas. A dose unitária pode ser uma quantidade ou número de células a serem administradas ao objeto ou duas vezes o número (ou mais) de células a serem administradas. Pode ser a dose mais baixa ou a menor possível das células que seriam administradas ao objeto.

[00670] Em algumas modalidades, cada um dos frascos compreende individualmente uma dose unitária das células. Assim, em algumas modalidades, cada um dos recipientes compreende o mesmo ou apro-

ximadamente ou substancialmente o mesmo número de células. Em algumas modalidades, cada dose unitária contém pelo menos ou cerca de 1 x 10^6, 2 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 2,5 x 10^8 ou 5 x 10^8 células manipuladas geneticamente, células totais, células T ou PBMCs. Em algumas modalidades, cada dose unitária contém pelo menos em ou cerca de 2,5 x 10^7, em ou cerca de 5,0 x 10^7, em ou cerca de 1,5 x 10^8, em ou cerca de 3,0 x 10^8, em ou cerca de 3,0 x 10^8, em ou cerca de 4,5 x 10^8, ou em ou cerca de 8,0 x 10^8 ou a cerca de 1,2 x 109 células manipuladas geneticamente, células totais, células T ou PBMCs. Em algumas modalidades, cada dose unitária não contém mais que 2,5 x 10^7, em ou cerca de 5,0 x 10^7, em ou cerca de 1,5 x 10^8, em ou cerca de 3,0 x 10^8, em ou cerca de 3,0 x 10^8, em ou cerca de 4,5 x 10^8, ou em ou cerca de 8,0 x 10^8 ou em ou cerca de 1,2 x 109 células manipuladas geneticamente, células totais, células T ou PBMCs. Em alguns aspectos, doses exemplares de células que podem estar contidas nos frascos incluem quaisquer doses aqui descritas, por exemplo, na Seção IV. Em alguns aspectos, doses exemplares de células que podem ser administradas a um objeto incluem quaisquer doses aqui descritas, por exemplo, na Seção IV.

[00671] Em algumas modalidades, o volume da composição de célula formulada em cada recipiente é de 10 mL a 100 mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL ou 100 mL. Em algumas modalidades, as células nos frascos podem ser crioconservadas. Em algumas modalidades, os frascos podem ser armazenados em nitrogênio líquido até uso posterior.

[00672] Em algumas modalidades, tais células produzidas pelo método, ou uma composição compreendendo essas células, são administradas a um objeto para o tratamento de uma doença ou condição. A composição farmacêutica em algumas modalidades contém agentes

ou células em quantidades eficazes para tratar ou prevenir a doença ou condição, tal como uma quantidade terapeuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz. A eficácia terapêutica ou profilática em algumas modalidades é monitorada por avaliação periódica dos objetos tratados. Para administrações repetidas por vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até ocorrer a supressão desejada dos sintomas da doença. No entanto, outros regimes posológicos podem ser úteis e podem ser determinados. A dosagem desejada pode ser administrada por uma única administração em bolus da composição, por múltiplas administrações em bolus da composição ou por administração de infusão contínua da composição.

[00673] Os agentes ou células podem ser administrados por qualquer meio adequado, por exemplo, por infusão em bolus, por injeção, por exemplo, injeções intravenosas ou subcutâneas, injeção intraocular, injeção periocular, injeção sub-retiniana, injeção intravítrea, injeção trans-septal, injeção subcleral, injeção intracoroidal, injeção intracameral, injeção subconjuntival, injeção subconjuntival, injeção sub Tenon, injeção retrobulbar, injeção peribulbar ou entrega justascleral posterior. Em algumas modalidades, eles são administrados por administração parentérica, intrapulmonar e intranasal e, se desejado para o tratamento local, administração intralesional. As infusões parentéricas incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Em algumas modalidades, uma dada dose é administrada por uma única administração em bolus das células ou agente. Em algumas modalidades, é administrado por múltiplas administrações em bolus das células ou agente, por exemplo, durante um período não mais do que 3 dias, ou por administração de infusão contínua das células ou agente.

[00674] Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada pode depender do tipo de doença a ser tratada, do tipo de

agente ou agentes, do tipo de células ou receptores recombinantes, da gravidade e do curso da doença, se a agente ou células são administradas para fins preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, histórico clínico do paciente e resposta ao agente ou às células, e a critério do médico assistente. As composições estão em algumas modalidades adequadamente administradas ao objeto ao mesmo tempo ou durante uma série de tratamentos.

[00675] As células ou agentes podem ser administrados usando técnicas de administração padrão, formulações e/ou dispositivos. São fornecidas formulações e dispositivos, tal como seringas e frascos, para armazenamento e administração das composições. No que diz respeito às células, a administração pode ser autóloga ou heteróloga. Por exemplo, células imunorresponsivas ou progenitoras podem ser obtidas de um objeto e administradas ao mesmo objeto ou a um objeto compatível e diferente. As células imunorresponsivas derivadas de sangue periférico ou sua progênie (por exemplo, derivada in vivo, ex vivo ou in vitro) podem ser administradas por injeção localizada, incluindo administração de cateter, injeção sistêmica, injeção localizada, injeção intravenosa ou administração parentérica. Ao administrar uma composição terapêutica (por exemplo, uma composição farmacêutica contendo uma célula imunorresposta geneticamente modificada ou um agente que trata ou melhora os sintomas de neurotoxicidade), ela geralmente é formulada em uma forma injetável de dosagem unitária (solução, suspensão, emulsão).

[00676] As formulações incluem aquelas para administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual ou supositória. Em algumas modalidades, as populações de agentes ou células são administradas parentericamente. O termo "parenteral", tal como aqui utilizado, inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, retal, vaginal e

intraperitoneal. Em algumas modalidades, as populações de agentes ou células são administradas a um objeto usando administração sistêmica periférica por injeção intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea.

[00677] As composições em algumas modalidades são fornecidas como preparações líquidas estéreis, por exemplo, soluções aquosas isotônicas, suspensões, emulsões, dispersões ou composições viscosas, que podem em alguns aspectos ser tamponadas para um pH selecionado. As preparações líquidas são normalmente mais fáceis de preparar do que os géis, outras composições viscosas e composições sólidas. Além disso, as composições líquidas são um pouco mais convenientes para administrar, especialmente por injeção. As composições viscosas, por outro lado, podem ser formuladas dentro da faixa de viscosidade apropriada para proporcionar períodos de contato mais longos com tecidos específicos. As composições líquidas ou viscosas podem compreender veículos, que podem ser um solvente ou meio dispersante contendo, por exemplo, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido) e suas misturas adequadas.

[00678] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o agente ou células em um solvente, tal como em mistura com um veículo, diluente ou excipiente adequado, tal como água estéril, solução salina fisiológica, glicose, dextrose ou similares.

[00679] As formulações a serem usadas para administração in vivo são geralmente estéreis. A esterilidade pode ser facilmente alcançada, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis.

1. Características da Composição de Saída

[00680] Entre as modalidades fornecidas, estão métodos de produção de uma composição de célula que contém células geneticamente modificadas, tal como uma composição de saída. Em alguns aspectos,

a composição de saída pode ser gerada mediante manipulação genética de uma composição de entrada, tal como qualquer uma descrita aqui. Em certas modalidades, os métodos aqui fornecidos incluem uma ou mais etapas para a manipulação genética de células a partir de uma composição de entrada para gerar uma composição de célula de saída que contém células manipuladas geneticamente que têm propriedades, recursos e/ou características particulares, tal como fenótipos celulares, por exemplo, presença e/ou expressão de um marcador de superfície e/ou a ausência ou falta de expressão de um marcador de superfície, das células na composição para administração. Em alguns aspectos, as células na composição de saída incluem células que expressam, por exemplo, expressam na superfície da célula, ou não expressam, um ou mais marcadores associados a determinados fenótipos celulares, incluindo marcadores associados ou indicativos de um fenótipo celular menos diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula de memória. Em alguns aspectos, as células na composição de saída incluem células que produzem, por exemplo, resposta à estimulação, conforme descrito aqui, uma ou mais citocinas, incluindo citocinas associadas ou indicativas de um fenótipo celular menos diferenciado e/ou citocinas associadas ou indicativas de um subtipo de célula de memória. Em algumas modalidades, os métodos aqui fornecidos geram uma composição de saída útil para o tratamento da doença. Em algumas modalidades, a composição de saída, ou formulação, composição terapêutica ou composição farmacêutica formulada, está correlacionada com a sobrevivência livre de progressão e/ou resposta durável. Em algumas modalidades, a composição de saída, ou formulação, composição terapêutica ou composição farmacêutica formulada, está correlacionada com a sobrevivência livre de progressão e/ou resposta durável em pacientes com alta e/ou baixa carga de doença, tal como aqui descrito.

[00681] Em certas modalidades, os métodos aqui fornecidos incluem uma ou mais etapas para a manipulação genética de células a partir de uma composição inicial e/ou de entrada para gerar uma composição de célula resultante e/ou de saída com uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante ($receptor^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T $receptor^+/CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T $receptor^+/CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células $receptor^+/CD4^+$ T que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[00682] Em certas modalidades, os métodos aqui fornecidos incluem uma ou mais etapas para a manipulação genética de células a partir de uma composição de partida e/ou entrada para gerar uma composição de célula resultante e/ou saída com uma porcentagem de células, por exemplo, células $CD4^+$, que produzem IL-2, TNF-alfa ou IFN-gama.

[00683] Em modalidades particulares, o conteúdo, formação e/ou constituição da composição de entrada correlaciona, controla, corresponde e/ou associa-se ao conteúdo, formação e/ou constituição da composição da célula de saída. Em certas modalidades, a quantidade, porção, porcentagem, número, número por volume, número por peso e/ou razão de células que expressam um ou mais marcadores associados a certos fenótipos celulares, incluindo marcadores associados ou indicativos de um fenótipo celular menos diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula da memória, em uma composição de entrada correlacionam, controlam, correspondem e/ou associam-se ao conteúdo, formação e/ou constituição da composição da célula de saída. Em modalidades particulares, a quantidade, porção, número, número por volume, número por peso e/ou razão de

células T $CD4^+$ e/ou células T $CD8^+$ que expressam um ou mais marcadores associados a determinados fenótipos celulares, incluindo marcadores associados ou indicativos de um fenótipo de célula menos diferenciado e/ou marcadores associados ou indicativos de um subtipo de célula de memória em uma composição de entrada correlaciona, controla, corresponde e/ou associa-se ao conteúdo, formação e/ou constituição da célula de saída composição. Em alguns aspectos, a expressão ou ausência de expressão de uma ou mais CCR7, CD27 e/ou CD45RA de células na composição de entrada está correlacionada com a expressão ou ausência de expressão de um ou mais CCR7, CD27 e/ou CD45RA de células na composição de saída, por exemplo, após manipulação genética para expressar o receptor recombinante. Assim, em alguns aspectos, o número, frequência e/ou porcentagem de células na composição de entrada que expressam ou não expressam um ou mais CCR7, CD27 e/ou CD45RA estão associados, correlacionados e/ou indicativos de, número, frequência e/ou porcentagem de células manipuladas geneticamente que expressam receptores recombinantes na composição de saída que expressam ou não expressam um ou mais de CCR7, CD27 e/ou CD45RA. Em alguns aspectos, a ausência de expressão de um marcador apoptótico (por exemplo, caspase ativada 3 ou Anexina V) nas células da composição de entrada está correlacionada com a sobrevivência livre de progressão e/ou resposta durável após a administração da composição de saída (por exemplo, formulação, composição terapêutica, composição farmacêutica, tal como administrada em uma ou mais doses unitárias, tal como descrito aqui). Assim, em alguns aspectos, o número, frequência e/ou porcentagem de células na composição de entrada que não expressam um marcador apoptótico (por exemplo, caspase ativada 3, Anexina V) está associado, correlacionado com uma composição de saída útil no tratamento de doenças.

[00684] Em alguns aspectos, a composição de saída inclui uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante ($receptor^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T $receptor^+/CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T $receptor^+/CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T $receptor^+/CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[00685] Em algumas modalidades, a composição de saída compreende uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$, para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$; ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$ e/ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$ para outro subconjunto de células na composição. Em algumas modalidades, a composição de saída compreende células que não expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, Anexina V).

[00686] Em algumas modalidades, a razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$, para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$ inclui aproximadamente 1:1 ou aproximadamente entre 1:3 e 3:1 ou aproximadamente entre 1:2 e 2:1 ou

aproximadamente entre 1:2 e 2:1, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$: receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$; receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$: receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$; receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$: receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$; receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$: receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+: receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+. Em algumas modalidades, a razão de definição de células não compreende células que expressam marcadores de apoptose (por exemplo, caspase 3, Anexina V).

[00687] Em algumas modalidades, a razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+ células para outro subconjunto de células na composição inclui pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% do total de células na composição de entrada, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células totais que expressam receptores (células receptor$^+$) na composição de saída sendo receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+ células e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+. Em algumas modalidades, a razão definida de receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição inclui pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% do total de células na composição de entrada, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de

20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células totais que expressam receptores (células receptor$^+$) na composição de saída sendo receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[00688] Em algumas modalidades, a composição de saída inclui pelo menos em ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98% ou 99% do número total de células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) na composição ou do número total de células manipuladas geneticamente (por exemplo, células T) na composição que expressa o receptor recombinante, negativos para marcadores de apoptose (por exemplo, caspase-3, Anexina V). Em algumas modalidades, o marcador de apoptose é a caspase 3 ativada. Em algumas modalidades, o marcador de apoptose é a Anexina V.

[00689] Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células, por exemplo, células T, tal como células T manipuladas geneticamente, capazes de produzir uma ou mais citocinas são IL-2, IFN-gama e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células CD4$^+$/CAR$^+$ capazes de produzir IL-2. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células CD4$^+$/CAR$^+$ capazes de produzir TNF-alfa. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células CD4$^+$/CAR$^+$ capazes de produzir IL-2, TNF-alfa e IFN-gama. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células CD4$^+$/CAR$^+$ capazes de produzir IL-2 e TNF-alfa. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células CD4$^+$/CAR$^+$ capazes de produzir IL-2 e IFN-gama. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células CD8$^+$/CAR$^+$ capazes de produzir TNF-alfa. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui células CD8$^+$/CAR$^+$ capazes de produzir TNF-alfa e IFN-gama. Em algumas

modalidades, a composição de saída inclui pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$, tal como células T CD4 manipuladas geneticamente que expressam um receptor recombinante (por exemplo, CAR), capaz de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, a composição de saída inclui pelo menos cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% ou mais do número total de células T $CD4^+$, tal como células T CD4 manipuladas geneticamente que expressam um receptor recombinante (por exemplo, CAR) que são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

[00690] Em modalidades particulares, os métodos aqui fornecidos produzem ou geram uma composição de célula que contêm células geneticamente modificadas, por exemplo, uma composição de célula de saída. Em certas modalidades, uma composição de célula de saída é uma composição de célula que resulta de algumas ou de todas as etapas para células manipuladas geneticamente. Em certas modalidades, a composição da célula de saída resulta de um processo de manipulação genética de células de uma composição de célula de entrada. Em certas modalidades, o processo contém uma ou mais etapas para ativar, transduzir ou transfectar, expandir e/ou colher células, tal como células que foram obtidas a partir de uma composição de célula de entrada. Em certas modalidades, a composição da célula de saída contém células que foram geneticamente modificadas. Em modalidades particulares, as células da composição de célula de saída passaram por todas as etapas de um processo de manipulação genética.

[00691] Em algumas modalidades, a composição de célula de saída contém células que incluem um ou mais ácidos nucleicos introduzidos

por manipulação genética e, assim, expressam produtos recombinantes ou geneticamente modificados desses ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos são heterólogos, ou seja, normalmente não estão presentes em uma célula ou amostra obtida da célula, tal como uma obtida de outro organismo ou célula, que, por exemplo, não é normalmente encontrada na célula sendo manipulada e/ou um organismo do qual essa célula é derivada. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos não ocorrem naturalmente, tal como um ácido nucleico não encontrado na natureza, incluindo um que compreende combinações quiméricas de ácidos nucleicos que codificam vários domínios de vários tipos celulares diferentes.

[00692] Em algumas modalidades, a composição de célula de saída contém células que foram geneticamente modificadas. Em modalidades particulares, a composição da célula de saída contém células T manipuladas geneticamente. Em algumas modalidades, as células T manipuladas geneticamente incluem células T $CD4^+$ manipuladas geneticamente e células T $CD8^+$ manipuladas geneticamente. Em modalidades particulares, a composição da célula de saída contém ou inclui pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9% ou 100% ou cerca de 100% de células T manipuladas geneticamente. Em certas modalidades, as células manipuladas geneticamente expressam um receptor recombinante. Em modalidades particulares, a composição da célula de saída contém ou inclui pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo

menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9% ou 100% ou cerca de 100% de células T que expressam um receptor recombinante. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um TCR ou um CAR. Em modalidades particulares, o receptor recombinante é um CAR.

[00693] Em alguns aspectos, o método envolve adicionalmente determinar uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula T para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende toda ou porção da composição de saída. Em alguns aspectos, toda ou uma porção da composição de saída pode ser usada como uma dose unitária para administração a um objeto. Em alguns aspectos, os métodos também incluem selecionar toda ou uma porção da composição de saída e, opcionalmente, combinar com outra solução para alcançar uma dose unitária da composição de célula T para administração. Em alguns aspectos, as modalidades fornecidas envolvem a determinação de uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, de modo que a dose unitária possa estar contida no artigo de fabricação descrito aqui e/ou administrado a um objeto, por exemplo, para fins terapêuticos. Em alguns aspectos, a dose unitária é baseada no número de células T manipuladas geneticamente e biologicamente ativas tendo um fenótipo particular e/ou, em que a dose se baseia no número total de células T manipuladas geneticamente e biologicamente ativas tendo um fenótipo particular. Em alguns aspectos, a dose unitária pode ser qualquer dose unitária descrita aqui, por exemplo, na Seção I. Em algumas modalidades, a dose unitária compreende toda ou uma porção da composição de saída que compreende: um número definido de $CD8^+$ T expressando receptor recombinante células que expressam receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T

$CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ para células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição; um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam um cluster de diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (receptor$^+$/$CD4^+$/Células $CD27^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ para células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; ou um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ para células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou um razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/ $CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[00694] Em algumas modalidades, a composição de saída é avaliada para determinar o (s) fenótipo (s) (por exemplo, marcadores de superfície, marcadores apoptóticos, produção de citocinas) das células contidas na composição de saída e a porcentagem de tais fenótipos na composição de saída. Em algumas modalidades, as composições de saída para uso terapêutico são selecionadas com base em uma ou mais porcentagens de células com fenótipos particulares de interesse. Em algumas modalidades, a composição de saída selecionada para

uso como agente terapêutico possui ou inclui uma ou mais porcentagens de células com fenótipos particulares (por exemplo, marcadores de superfície, marcadores apoptóticos, produção de citocinas) de acordo com uma ou mais das porcentagens e fenótipos aqui descritos. Em algumas modalidades, se a composição de saída não compreender as uma ou mais porcentagens alvo de um ou mais fenótipos, por exemplo, porcentagem de fenótipos particulares aqui descritos, a composição de saída pode passar por um processo de seleção para selecionar, isolar ou enriquecer a composição de saída, que as porcentagens alvo de fenótipos são atingidas. Em algumas modalidades, se a composição de saída não puder sofrer processamento adicional para alcançar a porcentagem alvo de um ou mais fenótipos aqui descritos, a composição de saída não será usada como uma composição terapêutica.

[00695] Em algumas modalidades, a composição de saída é crioconservada de acordo com qualquer um dos métodos para preservação de criopreservação aqui conhecidos ou descritos.

III CÉLULAS MANIPULADAS GENETICAMENTE QUE EXPRESSAM RECEPTORES RECOMBINANTES

[00696] Em algumas modalidades, os métodos e artigos de fabricação fornecidos referem-se a células manipuladas geneticamente, tal como células imunes, tal como células T, que expressam um receptor recombinante. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos envolvem a administração de células T manipuladas geneticamente, tal como células T $CD3^+$, células T $CD4^+$ e/ou células T $CD8^+$, que são geneticamente modificadas para expressar um receptor recombinante, por exemplo, um receptor de antígeno quimérico (CAR), incluindo administrar composições de tais células nas quais uma determinada porcentagem ou número definido ou definido de células de um fenótipo particular é administrado como aqui descrito (por exemplo, $CCR7^+$ ou CD27).

Em alguns aspectos, os receptores recombinantes das células manipuladas geneticamente podem se ligar e/ou direcionar antígenos associados a uma doença ou condição.

A. Receptores Recombinantes

[00697] Entre os receptores estão receptores de antígeno e receptores contendo um ou mais componentes dos mesmos. Os receptores recombinantes podem incluir receptores quiméricos, tal como aqueles que contêm domínios de ligação a ligando ou fragmentos de ligação dos mesmos e domínios ou regiões de sinalização intracelular, receptores de antígeno não-TCR funcionais, receptores de antígeno quimérico (CARs) e receptores de célula T (TCRs), tais como TCRs recombinantes ou transgênicos, receptor de autoanticorpo quimérico (CAAR) e componentes de qualquer um dos anteriores. O receptor recombinante, tal como um CAR, geralmente inclui o domínio de ligação a antígeno extracelular (ou ligando) ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelular, em alguns aspectos via ligantes e/ou domínio (s) transmembranar (s).

1. Receptores de Antígeno Quiméricos (CARs)

[00698] Em algumas modalidades, são fornecidas células manipuladas geneticamente, tal como células T, que expressam um CAR com especificidade para um antígeno específico (ou marcador ou ligando), tal como um antígeno expresso na superfície de um tipo de célula específico. Em algumas modalidades, o antígeno é um polipeptídeo. Em algumas modalidades, é um carboidrato ou outra molécula. Em algumas modalidades, o antígeno é seletivamente expresso ou superexpresso nas células da doença ou condição, por exemplo, o tumor ou células patogênicas, em comparação com células ou tecidos normais ou não direcionadas. Em outras modalidades, o antígeno é expresso nas células normais e/ou é expresso nas células manipuladas geneticamente.

[00699] Em modalidades particulares, o receptor recombinante, tal como o receptor quimérico, contém uma região de sinalização intracelular, que inclui um domínio ou região de sinalização citoplasmática (também chamada de forma intercambiável de domínio ou região de sinalização intracelular), tal como uma região citoplasmática (intracelular) capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, por exemplo, um domínio ou região de sinalização citoplasmática de um componente receptor de célula T (TCR) (por exemplo, um domínio ou região de sinalização citoplasmático de uma cadeia zeta de um CD3-zeta (CD3ζ) ou uma variante funcional ou porção de sinalização da mesma) e/ou que compreende um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[00700] Em algumas modalidades, o receptor quimérico contém adicionalmente um domínio de ligação a ligando extracelular que se liga especificamente a um antígeno do ligando (por exemplo, antígeno). Em algumas modalidades, o receptor quimérico é um CAR que contém um domínio de reconhecimento de antígeno extracelular que se liga especificamente a um antígeno. Em algumas modalidades, o ligando, tal como um antígeno, é uma proteína expressa na superfície das células. Em algumas modalidades, o CAR é um CAR do tipo TCR e o antígeno é um antígeno peptídico processado, tal como um antígeno peptídico de uma proteína intracelular, que, tal como um TCR, é reconhecido na superfície celular no contexto de uma grande histocompatibilidade molécula complexa (MHC).

[00701] Receptores de antígeno exemplares, incluindo CARs, e métodos para manipulação e introdução de tais receptores nas células, incluem aqueles descritos, por exemplo, nos números de publicação de pedido de patente internacional WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, números de publicação do pedido de paten-

te U.S. US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes U.S. Nos.: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 8.470.995, 7.265.755 Pedido de patente europeia número EP2537416 e/ou os descritos por Sadelain et al., Cancer Discov. abril de 2013; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8 (4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., outubro de 2012; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 18 de março de 2012 (2): 160-75. Em alguns aspectos, os receptores de antígeno incluem um CAR, tal como descrito na Patente U.S. No.: 7.446.190, e aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente Internacional No.: WO/2014055668 A1. Exemplos de CARs incluem CARs, conforme divulgado em qualquer uma das publicações mencionadas, tal como WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente US: 7.446.190, Patente US No.: 8.389.282, Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35 (9): 689-701; e Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5 (177). Vide também WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente U.S. No. 7.446.190 e Patente U.S. No. 8.389.282.

[00702] Em algumas modalidades, o CAR é construído com uma especificidade para um antígeno específico (ou marcador ou ligando), tal como um antígeno expresso em um tipo de célula específico a ser direcionado pela terapia adotiva, por exemplo, um marcador de câncer e/ou um antígeno destinado a induzir uma resposta atenuante, tal como um antígeno expresso em um tipo de célula normal ou não doente. Assim, o CAR inclui tipicamente em sua porção extracelular uma ou mais moléculas de ligação a antígeno, tal como um ou mais fragmento, domínio ou porção de ligação a antígeno, ou um ou mais domínios variáveis de anticorpo e/ou moléculas de anticorpo. Em algumas modalidades, o CAR inclui uma porção ou partes de ligação a antígeno de

uma molécula de anticorpo, tal como um fragmento de anticorpo de cadeia única (scFv) derivado das cadeias variável pesada (VH) e variável leve (VL) de um anticorpo monoclonal (mAb).

[00703] Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo é expresso nas células como parte de um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno. Entre os receptores de antígeno estão receptores de antígeno não-TCR funcionais, tal como receptores de antígeno quiméricos (CARs). Geralmente, um CAR contendo um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que exibe especificidade do tipo TCR direcionada contra complexos peptídeo-MHC também pode ser referido como um CAR do tipo TCR. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a antígeno extracelular específico para um complexo de peptídeo MHC de um CAR tipo TCR está ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelular, em alguns aspectos via ligantes e/ou domínio (s) transmembranar (s). Em algumas modalidades, essas moléculas podem tipicamente imitar ou aproximar um sinal através de um receptor de antígeno natural, tal como um TCR, e, opcionalmente, um sinal através desse receptor em combinação com um receptor coestimulatório.

[00704] Em algumas modalidades, o receptor recombinante, tal como um receptor quimérico (por exemplo, CAR), inclui um domínio de ligação a ligando que se liga, tal como especificamente se liga, a um antígeno (ou um ligando). Entre os antígenos direcionados pelos receptores quiméricos estão os expressos no contexto de uma doença, condição ou tipo de célula a ser direcionada através da terapia celular adotiva. Entre as doenças e condições estão doenças e distúrbios proliferativos, neoplásicos e malignos, incluindo cânceres e tumores, incluindo cânceres hematológicos, cânceres do sistema imunológico, tal como linfomas, leucemias e/ou mielomas, tal como leucemias B, T e mieloide, linfomas e mielomas múltiplos.

[00705] Em algumas modalidades, o antígeno (ou um ligando) é um polipeptídeo. Em algumas modalidades, é um carboidrato ou outra molécula. Em algumas modalidades, o antígeno (ou um ligando) é seletivamente expresso ou superexpresso nas células da doença ou condição, por exemplo, o tumor ou células patogênicas, em comparação com células ou tecidos normais ou não direcionados. Em outras modalidades, o antígeno é expresso nas células normais e/ou é expresso nas células manipuladas geneticamente.

[00706] Em algumas modalidades, o CAR contém um anticorpo ou um antígeno ou um fragmento de ligação a antígeno (por exemplo, scFv) que reconhece especificamente um antígeno, tal como um antígeno intacto, expresso na superfície de uma célula.

[00707] Em algumas modalidades, o antígeno (ou um ligando) é um antígeno tumoral ou marcador de câncer. Em algumas modalidades, o antígeno (ou um ligando) do antígeno é ou inclui integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno 1B de câncer/testículo (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina Motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor da efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5); também conhecido como homólogo 5 do receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2

O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa-IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa-2 de IL-13 (IL-13Rα2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo Membro A de Famíli 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, antígeno prostático específico, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), Receptor tirosina quinase tipo órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno, ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos. Os antígenos direcionados pelos receptores em

algumas modalidades incluem antígenos associados a uma malignidade de células B, tal como qualquer um de vários marcadores conhecidos de células B. Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igcapa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30.

[00708] Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno viral (como um antígeno viral de HIV, HCV, HBV, etc.), antígenos bacterianos e/ou antígenos parasitários.

[00709] O termo "anticorpo" aqui é usado no sentido mais amplo e inclui anticorpos policlonais e monoclonais, incluindo anticorpos intactos e fragmentos de anticorpos funcionais (ligação a antígeno), incluindo fragmentos de ligação a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')2, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), regiões variáveis de cadeia pesada (VH) capazes de se ligar especificamente ao antígeno, fragmentos de anticorpos de cadeia única, incluindo fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) e anticorpos de domínio único (por exemplo, sdAb, sdFv, nanocorpo). O termo engloba formas de imunoglobulinas modificadas por manipulação genética e/ou de outra forma modificadas, tais como intracorpos, pepticorpos, anticorpos quiméricos, anticorpos totalmente humanos, anticorpos humanizados e anticorpos heteroconjugados, por exemplo, anticorpos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos multiespecíficos, biespecíficos ou triespecíficos, di-scFv em tandem, tri-scFv em tandem. Salvo indicação em contrário, o termo "anticorpo" deve ser entendido como abrangendo fragmentos funcionais de anticorpos dos mesmos, também aqui referidos como "fragmentos de ligação a antígeno". O termo também abrange anticorpos intactos ou completos, incluindo anticorpos de qualquer classe ou subclasse, incluindo IgG e suas subclasses, IgM,

IgE, IgA e IgD.

[00710] Os termos "região determinante de complementaridade" e "CDR", sinônimo de "região hipervariável" ou "HVR", são conhecidos, em alguns casos, por se referirem a sequências não contíguas de aminoácidos nas regiões variáveis de anticorpos, que conferem especificidade de antígeno e/ou afinidade de ligação. Em geral, existem três CDRs em cada região variável de cadeia pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) e três CDRs em cada região variável de cadeia leve (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). "Regiões estruturais" e "FR" são conhecidas, em alguns casos, por se referirem às partes não CDR das regiões variáveis das cadeias pesada e leve. Em geral, existem quatro FRs em cada região variável de cadeia pesada de comprimento completo (FR-H1, FR-H2, FR-H3 e FR-H4) e quatro FRs em cada região variável de cadeia leve de comprimento completo (FR-L1, FR-L2, FR-L3 e FR-L4).

[00711] Os limites precisos da sequência de aminoácidos de uma determinada CDR ou FR podem ser facilmente determinados usando qualquer um de vários esquemas bem conhecidos, incluindo os descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeração "Kabat"); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeração "Chothia"); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745." (esquema de numeração "Contact"); Lefranc MP *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, Janeiro de 2003; 27(1):55-77 (esquema de numeração "IMGT"); Honegger A e Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J

Mol Biol, Junho de 2001 8;309(3):657-70, (esquema de numeração "Aho"); e Martin *et al.*, "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (esquema de numeração "AbM").

[00712] Os limites de uma dada CDR ou FR podem variar dependendo do esquema usado para identificação. Por exemplo, o esquema Kabat é baseado em alinhamentos estruturais, enquanto o esquema Chothia é baseado em informações estruturais. A numeração para os esquemas de Kabat e Chothia baseia-se nos comprimentos de sequência da região de anticorpo mais comuns, com inserções acomodadas por letras de inserção, por exemplo, "30a" e exclusões em alguns anticorpos. Os dois esquemas colocam determinadas inserções e exclusões ("indels") em posições diferentes, resultando em numeração diferencial. O esquema de contato é baseado na análise de estruturas cristalinas complexas e é semelhante em muitos aspectos ao esquema de numeração de Chothia. O esquema AbM é um compromisso entre as definições de Kabat e Chothia, com base no usado pelo software de modelagem de anticorpos AbM da Oxford Molecular.

[00713] A Tabela 1, abaixo, lista limites de posição exemplares de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 e CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, conforme identificados pelos esquemas Kabat, Chothia, AbM e Contact, respectivamente. Para CDR-H1, a numeração de resíduos é listada usando os esquemas de numeração Kabat e Chothia. As FRs estão localizadas entre CDRs, por exemplo, com FR-L1 localizada antes de CDR-L1, FR-L2 localizada entre CDR-L1 e CDR-L2, FR-L3 localizada entre CDR-L2 e CDR-L3 e assim por diante. Note-se que, tal como o esquema de numeração Kabat mostrado coloca inserções em H35A e H35B, o final do loop Chothia CDR-H1 quando numerado usando a convenção de numeração Kabat mostrada varia entre H32 e H34, dependendo do comprimento do loop.

Tabela 1. Limites de CDRs de acordo com vários esquemas de numeração.

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Numeração Kabat[1])	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Numeração Chothia[2])	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[00714] Assim, a menos que seja especificado de outra forma, uma "CDR" ou "região determinante de complementaridade" ou CDRs especificadas individuais (por exemplo, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) de um determinado anticorpo ou região do mesmo, tal como uma região variável da mesma, deve ser entendida como abrangendo uma região determinante complementar (ou específica), conforme definido por qualquer um dos esquemas mencionados acima, ou outros esquemas conhecidos. Por exemplo, onde se afirma que uma CDR específica (por exemplo, uma CDR-H3) contém a sequência de aminoácidos de uma CDR correspondente em uma determinada sequência de aminoácidos da região VH ou VL, entende-se que essa CDR tem uma sequência de a CDR correspondente (por exemplo, CDR-H3) dentro da região variável, conforme definido por qualquer um dos esquemas mencionados acima, ou outros esquemas conhecidos. Em algumas modalidades, sequências CDR específicas são especificadas. Sequências de CDR exemplares dos anticorpos são descritas usando vários esquemas de numeração, embora se entenda que o anticorpo pode incluir CDRs como descritas de acordo com qualquer um dos outros esquemas de numeração ou outros números mencionados acima

esquemas conhecidos por uma técnica qualificada.

[00715] Da mesma forma, a menos que seja especificado de outra forma, uma FR ou FR(s) especificada individualmente (por exemplo, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), de um determinado anticorpo ou região do mesmo, tal como uma variável deve ser entendida como abrangendo uma região estrutural (ou específica) conforme definida por qualquer um dos esquemas conhecidos. Em alguns casos, o esquema para identificação de uma CDR, FR ou FR ou CDRs específica é especificado, tal como a CDR, conforme definido pelo método Kabat, Chothia, AbM ou Contact, ou outros esquemas conhecidos. Em outros casos, é dada a sequência de aminoácidos específica de uma CDR ou FR.

[00716] O termo "região variável" ou "domínio variável" refere-se ao domínio de um anticorpo de cadeia pesada ou leve que está envolvido na ligação do anticorpo ao antígeno. As regiões variáveis de cadeia pesada e da cadeia leve (VH e VL, respectivamente) de um anticorpo nativo geralmente têm estruturas semelhantes, com cada domínio compreendendo quatro regiões estruturais conservadas (FRs) e três CDRs. (Vide, por exemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6ª ed., WH Freeman e Co., página 91 (2007). Um único domínio VH ou VL pode ser suficiente para conferir especificidade de ligação a antígeno. Além disso, anticorpos que ligam um antígeno particular podem ser isolados usando um domínio VH ou VL de um anticorpo que liga o antígeno para rastrear uma biblioteca de domínios complementares VL ou VH, respectivamente. Vide, por exemplo, Portolano et al., J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352: 624-628 (1991).

[00717] Entre os anticorpos incluídos nos CARs estão fragmentos de anticorpos. Um "fragmento de anticorpo" ou "fragmento de ligação a antígeno" refere-se a uma molécula que não seja um anticorpo intacto que compreende uma porção de um anticorpo intacto que liga o antí-

geno ao qual o anticorpo intacto se liga. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; diacorpos; anticorpos lineares; regiões variáveis de cadeia pesada (VH), moléculas de anticorpo de cadeia única, tais como scFvs e anticorpos de domínio único, compreendendo apenas a região VH; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio de ligação a antígeno nos CARs é ou compreende um fragmento de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL). Em modalidades particulares, os anticorpos são fragmentos de anticorpo de cadeia única compreendendo uma região variável de cadeia pesada (VH) e/ou uma região variável de cadeia leve (VL), tal como scFvs.

[00718] Em algumas modalidades, o antígeno ou o domínio de ligação a antígeno é CD19. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivados de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD19. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga o CD19 é um anticorpo derivado de camundongo, tal como FMC63 e SJ25C1. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo humano, por exemplo, tal como descrito na Publicação de Patente U.S. No. US 2016/0152723.

[00719] Em algumas modalidades, o scFv é derivado de FMC63. FMC63 geralmente refere-se a um anticorpo IgG1 monoclonal de camundongo produzido contra células Nalm-1 e -16 que expressam CD19 de origem humana (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Em algumas modalidades, o anticorpo FMC63 compreende CDR-H1 e CDR-H2 estabelecida em SEQ ID NOS: 38 e 39, respectivamente, e CDR-H3 estabelecida em SEQ ID NO: 40 ou 54; e CDR-L1 estabelecida em SEQ ID NO: 35 e CDR-L2 estabelecida em SEQ ID

NO: 36 ou 55 e CDR-L3 estabelecida em SEQ ID NO: 37 ou 34. Em algumas modalidades, o anticorpo FMC63 compreende a região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 e a região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

[00720] Em algumas modalidades, o scFv compreende uma cadeia leve variável contendo a sequência CDR-L1 de SEQ ID NO: 35, uma sequência CDR-L2 de SEQ ID NO: 36 e uma sequência CDR-L3 de SEQ ID NO: 37 e/ou uma cadeia pesada variável contendo uma sequência CDR-H1 de SEQ ID NO: 38, uma sequência CDR-H2 de SEQ ID NO: 39 e uma sequência CDR-H3 de SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma região variável de cadeia pesada estabelecida em SEQ ID NO: 41 e uma região variável de cadeia leve estabelecida em SEQ ID NO: 42. Em algumas modalidades, as cadeias pesada variável e leve variável são conectadas por um ligante. Em algumas modalidades, o ligante é estabelecido em SEQ ID NO: 56. Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma VH, um ligante e uma VL. Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma VL, um ligante e uma VH. Em algumas modalidades, o scFv é codificado por uma sequência de nucleotídeos estabelecida em SEQ ID NO: 57 ou uma sequência que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 57. Em algumas modalidades, o scFv compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 43 ou uma sequência que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, Identidade de sequência de 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de SEQ ID NO: 43.

[00721] Em algumas modalidades, o scFv é derivado de SJ25C1. SJ25C1 é um anticorpo IgG1 monoclonal de camundongo criado con-

tra células Nalm-1 e -16 que expressam CD19 de origem humana (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte Typing III*. 302). Em algumas modalidades, o anticorpo SJ25C1 compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 estabelecidas em SEQ ID NOS: 47-49, respectivamente, e sequências CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 estabelecidas em SEQ ID NOS: 44-46, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo SJ25C1 compreende a região variável de cadeia pesada (VH) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 50 e a região variável de cadeia leve (VL) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 51.

[00722] Em algumas modalidades, o scFv compreende uma cadeia leve variável contendo uma sequência CDR-L1 de SEQ ID NO: 44, uma sequência CDR-L2 de SEQ ID NO: 45 e uma sequência CDR-L3 de SEQ ID NO: 46 e/ou uma cadeia pesada variável contendo uma sequência CDR-H1 de SEQ ID NO: 47, uma sequência CDR-H2 de SEQ ID NO: 48 e uma sequência CDR-H3 de SEQ ID NO: 49. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma região variável de cadeia pesada estabelecida em SEQ ID NO: 50 e uma região variável de cadeia leve estabelecida em SEQ ID NO: 51. Em algumas modalidades, a cadeia leve e pesada variável são conectadas por um ligante. Em algumas modalidades, o ligante é estabelecido em SEQ ID NO: 52. Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma VH, um ligante e uma VL. Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma VL, um ligante e uma VH. Em algumas modalidades, o scFv compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 53 ou uma sequência que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92% 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 53.

[00723] Em algumas modalidades, o antígeno é CD20. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivadas de um anti-

corpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD20. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga CD20 é um anticorpo que é ou é derivado do Rituximabe, tal como o Rituximabe scFv.

[00724] Em algumas modalidades, o antígeno é CD22. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD22. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga CD22 é um anticorpo que é ou é derivado de m971, tal como m971 scFv.

[00725] Em algumas modalidades, o antígeno ou domínio de ligação a antígeno é BCMA. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para BCMA. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga BCMA é ou contém uma VH e uma VL de um anticorpo ou fragmento de anticorpo estabelecido em Pedidos de Patentes Internacionais, Número de Publicação WO 2016/090327 e WO 2016/090320.

[00726] Em algumas modalidades, o antígeno ou domínio de ligação a antígeno é GPRC5D. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para GPRC5D. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga GPRC5D é ou contém uma VH e uma VL de um anticorpo ou fragmento de anticorpo estabelecido em Pedidos de Patentes Internacionais, Número de Publicação WO 2016/090329 e WO 2016/090312.

[00727] Em algumas modalidades, o CAR contém um anticorpo tipo TCR, tal como um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno (por exemplo, scFv) que reconhece especificamente um antígeno intracelular, tal como um antígeno associado a um tumor, apresentado

na superfície celular como um complexo peptídico de MHC. Em algumas modalidades, um anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo que reconhece um complexo de peptídeo MHC pode ser expresso nas células como parte de um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno. Entre os receptores de antígeno estão receptores de antígeno não-TCR funcionais, tal como receptores de antígeno quiméricos (CARs). Geralmente, um CAR contendo um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que exibe especificidade do tipo TCR direcionada contra complexos peptídeo-MHC também pode ser referido como um CAR do tipo TCR.

[00728] A referência a "Complexo principal de histocompatibilidade" (MHC) refere-se a uma proteína, geralmente uma glicoproteína, que contém um sítio de ligação a peptídeo polimórfico ou um sulco de ligação que pode, em alguns casos, complexar com antígenos peptídicos de polipeptídeos, incluindo antígenos de peptídeos processados pelo maquinário celular. Em alguns casos, as moléculas de MHC podem ser exibidas ou expressas na superfície celular, cada uma inclusive como um complexo com peptídeo, isto é, complexo de peptídeo MHC, para apresentação de um antígeno em uma conformação reconhecível por um receptor de antígeno nas células T, tal como TCRs ou anticorpo tipo TCR. Geralmente, as moléculas de MHC classe I são heterodímeros tendo uma membrana que abrange a cadeia α, em alguns casos com três domínios α e uma microglobulina β2 não covalentemente associada. Geralmente, as moléculas de MHC de classe II são compostas por duas glicoproteínas transmembranares, α e β, ambas tipicamente abrangendo a membrana. Uma molécula de MHC pode incluir uma porção eficaz de um MHC que contém um sítio ou sítios de ligação a antígeno para ligação de um peptídeo e as sequências necessárias para o reconhecimento pelo receptor de antígeno apropriado. Em algumas modalidades, as moléculas de MHC de classe I en-

tregam peptídeos originários do citosol à superfície celular, onde um complexo de MHC-peptídeo é reconhecido pelas células T, tal como geralmente células T $CD8^+$, mas em alguns casos células T $CD4^+$. Em algumas modalidades, as moléculas MHC de classe II entregam peptídeos originários do sistema vesicular à superfície celular, onde são tipicamente reconhecidos pelas células T $CD4^+$. Geralmente, as moléculas MHC são codificadas por um grupo de loci ligados, que são coletivamente denominados H-2 no camundongo e antígeno leucocitário humano (HLA) em seres humanos. Portanto, o MHC tipicamente humano também pode ser referido como antígeno leucocitário humano (HLA).

[00729] O termo "complexo MHC-peptídeo" ou "complexo peptídeo-MHC" ou variações do mesmo, refere-se a um complexo ou associação de um antígeno peptídico e uma molécula de MHC, como, geralmente, por interações não covalentes do peptídeo no sulco de ligação ou fenda da molécula de MHC. Em algumas modalidades, o complexo MHC-peptídeo está presente ou é exibido na superfície das células. Em algumas modalidades, o complexo MHC-peptídeo pode ser especificamente reconhecido por um receptor de antígeno, tal como um TCR, um CAR tipo TCR ou porções de ligação a antígeno do mesmo.

[00730] Em algumas modalidades, um peptídeo, tal como um antígeno ou epítopo peptídico, de um polipeptídeo pode se associar a uma molécula de MHC, tal como para o reconhecimento por um receptor de antígeno. Geralmente, o peptídeo é derivado de ou com base em um fragmento de uma molécula biológica mais longa, tal como um polipeptídeo ou proteína. Em algumas modalidades, o peptídeo normalmente tem cerca de 8 a cerca de 24 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, um peptídeo tem um comprimento de ou de cerca de 9 a 22 aminoácidos para reconhecimento no complexo MHC Classe II. Em algumas modalidades, um peptídeo tem um comprimento de ou

de cerca de 8 a 13 aminoácidos para reconhecimento no complexo MHC Classe I. Em algumas modalidades, após o reconhecimento do peptídeo no contexto de uma molécula de MHC, tal como o complexo MHC-peptídeo, o receptor de antígeno, tal como TCR ou CAR tipo TCR, produz ou dispara um sinal de ativação para a célula T que induz uma Resposta de células T, tal como proliferação de células T, produção de citocinas, resposta de células T citotóxicas ou outra resposta.

[00731] Em algumas modalidades, um anticorpo semelhante ao TCR ou uma porção de ligação a antígeno é conhecido ou pode ser produzido por métodos conhecidos (vide, por exemplo, pedidos publicados nos US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US2009 0304679; e Publicação Internacional PCT No. WO 03/068201).

[00732] Em algumas modalidades, um anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a um complexo peptídico do MHC, pode ser produzido imunizando um hospedeiro com uma quantidade eficaz de um imunogênio contendo um complexo específico do peptídeo MHC. Em alguns casos, o peptídeo do complexo MHC-peptídeo é um epítopo do antígeno capaz de se ligar ao MHC, tal como um antígeno tumoral, por exemplo, um antígeno universal do tumor, antígeno do mieloma ou outro antígeno, conforme descrito abaixo. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz do imunogênio é então administrada a um hospedeiro para provocar uma resposta imune, em que o imunogênio retém uma forma tridimensional do mesmo por um período de tempo suficiente para provocar uma resposta imune contra a apresentação tridimensional de o peptídeo no sulco de ligação da molécula de MHC. O soro coletado do hospedeiro é então analisado para determinar se estão sendo produzidos anticorpos desejados que reconhecem uma apresentação tridimensional do peptídeo no sulco de ligação da molécula de MHC. Em algumas modali-

dades, os anticorpos produzidos podem ser avaliados para confirmar que o anticorpo pode diferenciar o complexo MHC-peptídeo da molécula MHC sozinha, apenas o peptídeo de interesse e um complexo de MHC e peptídeo irrelevante. Os anticorpos desejados podem então ser isolados.

[00733] Em algumas modalidades, um anticorpo ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a um complexo peptídico de MHC pode ser produzido empregando métodos de exibição de bibliotecas de anticorpos, tal como bibliotecas de anticorpos de fagos. Em algumas modalidades, as bibliotecas de exibição de fagos de Fab mutante, scFv ou outras formas de anticorpo podem ser geradas, por exemplo, nas quais os membros da biblioteca são mutados em um ou mais resíduos de uma CDR ou CDRs. Vide, por exemplo, Pedido publicado US No. US20020150914, US2014/0294841; e Cohen CJ. et al. (2003) J. Mol. Reconhecimento 16: 324-332.

[00734] O termo "anticorpo" aqui é usado no sentido mais amplo e inclui anticorpos policlonais e monoclonais, incluindo anticorpos intactos e fragmentos de anticorpos funcionais (ligação a antígeno), incluindo fragmentos de ligação a antígeno do fragmento (Fab), fragmentos F(ab')2, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rIgG), regiões variáveis de cadeia pesada (VH) capazes de se ligar especificamente ao antígeno, fragmentos de anticorpo de cadeia única, incluindo fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) e anticorpos de domínio único (por exemplo, sdAb, sdFv, nanocorpo). O termo abrange formas de imunoglobulinas modificadas por manipulação genética e/ou modificadas de outra forma, tais como intracorpos, peptcorpos, anticorpos quiméricos, anticorpos totalmente humanos, anticorpos humanizados e anticorpos heteroconjugados, anticorpos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos, multiespecíficos, por exemplo, biespecíficos, di-scFv em tandem, tri-scFv em tandem. Salvo indicação em

contrário, o termo "anticorpo" deve ser entendido como abrangendo fragmentos funcionais de anticorpos. O termo também abrange anticorpos intactos ou completos, incluindo anticorpos de qualquer classe ou subclasse, incluindo IgG e suas subclasses, IgM, IgE, IgA e IgD.

[00735] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação a antígeno, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos reconhecem especificamente um antígeno de um anticorpo completo. Em algumas modalidades, as cadeias pesada e leve de um anticorpo podem ser de tamanho completo ou podem ser uma porção de ligação a antígeno (um fragmento Fab, F(ab')2, Fv ou um Fv de cadeia única (scFv)). Em outras modalidades, a região constante de cadeia pesada do anticorpo é escolhida entre, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, particularmente escolhida dentre, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, mais particularmente, IgG1 (por exemplo, IgG1 humana). Em outra modalidade, a região constante de cadeia leve do anticorpo é escolhida entre, por exemplo, capa ou lambda, particularmente capa.

[00736] Entre os anticorpos fornecidos estão os fragmentos de anticorpo. Um "fragmento de anticorpo" refere-se a uma molécula diferente de um anticorpo intacto que compreende uma porção de um anticorpo intacto que liga o antígeno ao qual o anticorpo intacto se liga. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; diacorpos; anticorpos lineares; regiões variáveis de cadeia pesada (VH), moléculas de anticorpo de cadeia única, tal como scFvs e anticorpos únicos de VH de domínio único; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo. Em modalidades particulares, os anticorpos são fragmentos de anticorpo de cadeia única compreendendo uma região variável de cadeia pesada e/ou uma região variável de cadeia leve, tal como scFvs.

[00737] O termo "região variável" ou "domínio variável" refere-se ao domínio de um anticorpo de cadeia pesada ou leve que está envolvido na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve (VH e VL, respectivamente) de um anticorpo nativo geralmente têm estruturas semelhantes, com cada domínio compreendendo quatro regiões estruturais conservadas (FRs) e três CDRs. (Vide, por exemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6ª ed., WH Freeman e Co., página 91 (2007). Um único domínio VH ou VL pode ser suficiente para conferir especificidade de ligação a antígeno. Além disso, anticorpos que ligam um antígeno específico podem ser isolados usando um domínio VH ou VL de um anticorpo que liga o antígeno para rastrear uma biblioteca de domínios complementares VL ou VH, respectivamente. Vide, por exemplo, Portolano et al., J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352: 624-628 (1991).

[00738] Anticorpos de domínio único são fragmentos de anticorpo compreendendo toda ou uma porção do domínio variável de cadeia pesada ou toda ou uma porção do domínio variável de cadeia leve de um anticorpo. Em certas modalidades, um anticorpo de domínio único é um anticorpo de domínio único humano. Em algumas modalidades, o CAR compreende um domínio de cadeia pesada de anticorpo que liga especificamente o antígeno, tal como um marcador de câncer ou antígeno de superfície celular de uma célula ou doença a ser direcionada, tal como uma célula tumoral ou uma célula cancerígena, tal como qualquer um dos os antígenos alvo aqui descritos ou conhecidos.

[00739] Os fragmentos de anticorpos podem ser feitos por várias técnicas, incluindo, entre outras, digestão proteolítica de um anticorpo intacto, bem como produção por células hospedeiras recombinantes. Em algumas modalidades, os anticorpos são fragmentos produzidos de forma recombinante, tal como fragmentos que compreendem arranjos que não ocorrem naturalmente, tal como aqueles com duas ou

mais regiões ou cadeias de anticorpos unidas por ligantes sintéticos, por exemplo, ligantes peptídicos e/ou que podem não ser produzidos pela digestão enzimática de um anticorpo intacto que ocorre naturalmente. Em algumas modalidades, os fragmentos de anticorpo são scFvs.

[00740] Um anticorpo "humanizado" é um anticorpo no qual todos ou substancialmente todos os resíduos de aminoácidos CDR são derivados de CDR não humanas e todos ou substancialmente todos os resíduos de aminoácidos FR são derivados de FRs humanas. Um anticorpo humanizado pode opcionalmente incluir pelo menos uma porção de uma região constante de anticorpo derivada de um anticorpo humano. Uma "forma humanizada" de um anticorpo não humano refere-se a uma variante do anticorpo não humano que foi submetido à humanização, tipicamente para reduzir a imunogenicidade para seres humanos, mantendo a especificidade e afinidade do anticorpo não humano parental. Em algumas modalidades, alguns resíduos FR em um anticorpo humanizado são substituídos por resíduos correspondentes de um anticorpo não humano (por exemplo, o anticorpo do qual os resíduos CDR são derivados), por exemplo, para restaurar ou melhorar a especificidade ou afinidade do anticorpo.

[00741] Assim, em algumas modalidades o receptor de antígeno quimérico, incluindo CARs tipo TCR, inclui uma porção extracelular contendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento inclui um scFv. Em alguns aspectos, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo o anticorpo ou fragmento e uma região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é ca-

paz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[00742] Em algumas modalidades, o receptor recombinante, tal como o CAR, tal como a porção de anticorpo do mesmo, inclui adicionalmente um espaçador, que pode ser ou incluir pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina ou uma variante ou versão modificada da mesma, tal como uma região de dobradiça, por exemplo, uma região de dobradiça de IgG4 e/ou uma região de CH1/CL e/ou Fc. Em algumas modalidades, o receptor recombinante compreende adicionalmente um espaçador e/ou uma região de dobradiça. Em algumas modalidades, a região ou porção constante é de uma IgG humana, tal como IgG4 ou IgG1. Em alguns aspectos, a porção da região constante serve como uma região espaçadora entre o componente de reconhecimento de antígeno, por exemplo, scFv e domínio transmembranar. O espaçador pode ter um comprimento que proporcione maior capacidade de resposta da célula após a ligação a antígeno, em comparação com a ausência do espaçador. Em alguns exemplos, o espaçador tem em ou cerca de 12 aminoácidos de comprimento ou não tem mais que 12 aminoácidos de comprimento. Espaçadores exemplares incluem aqueles que têm pelo menos cerca de 10 a 229 aminoácidos, cerca de 10 a 200 aminoácidos, cerca de 10 a 175 aminoácidos, cerca de 10 a 150 aminoácidos, cerca de 10 a 125 aminoácidos, cerca de 10 a 125 aminoácidos, cerca de 10 a 100 aminoácidos, cerca de 10 a 75 aminoácidos, cerca de 10 a 50 aminoácidos, cerca de 10 a 40 aminoácidos, cerca de 10 a 30 aminoácidos, cerca de 10 a 20 aminoácidos ou cerca de 10 a 15 aminoácidos, e incluindo qualquer número inteiro entre os pontos finais de qualquer um dos intervalos listados. Em algumas modalidades, uma região espaçadora

tem cerca de 12 aminoácidos ou menos, cerca de 119 aminoácidos ou menos, ou cerca de 229 aminoácidos ou menos. Espaçadores exemplares incluem dobradiça de IgG4 sozinha, dobradiça de IgG4 ligada aos domínios CH2 e CH3, ou dobradiça de IgG4 ligada ao domínio CH3. Espaçadores exemplares incluem, mas não estão limitados aos descritos em Hudecek et al. (2013) *Clin. Cancer Res*., 19: 3153, Hudecek et al. (2015) *Cancer Immunol Res*. 3 (2): 125–135 ou número de publicação do pedido de patente internacional WO2014031687. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência estabelecida em SEQ ID NO: 1 e é codificado pela sequência estabelecida em SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência estabelecida em SEQ ID NO: 3 Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência estabelecida em SEQ ID NO: 4.

[00743] Em alguns aspectos, o espaçador é um espaçador polipeptídico que (a) compreende ou consiste em todo ou uma porção de uma dobradiça de imunoglobulina ou uma versão modificada da mesma ou compreende cerca de 15 aminoácidos ou menos e não compreende um CD28 extracelular região ou uma região extracelular de CD8, (b) compreende ou consiste em toda ou uma porção de uma dobradiça de imunoglobulina, opcionalmente uma dobradiça de IgG4, ou uma versão modificada da mesma e/ou compreende cerca de 15 aminoácidos ou menos e não compreende um CD28 região extracelular ou uma região extracelular de CD8, ou (c) tem em ou cerca de 12 aminoácidos de comprimento e/ou compreende ou consiste em toda ou uma porção de uma dobradiça de imunoglobulina, opcionalmente uma IgG4 ou uma versão modificada da mesma; ou (d) consiste ou compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NOS: 1, 3-5, 27-34 ou 58, ou uma variante de qualquer dos anteriores, tendo pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência, ou (e)

compreende ou consiste em a fórmula X1PPX2P, em que X1 é glicina, cisteína ou arginina e X2 é cisteína ou treonina.

[00744] Em algumas modalidades, a região ou porção constante é de IgD. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência estabelecida em SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, o espaçador tem uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 3, 4 e 5.

[00745] O domínio de reconhecimento de antígeno geralmente está ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelular, tal como componentes de sinalização que imitam a ativação por meio de um complexo receptor de antígeno, tal como um complexo TCR, no caso de um CAR, e/ou sinal via outro receptor de superfície celular. Assim, em algumas modalidades, o componente de ligação a antígeno (por exemplo, anticorpo) está ligado a uma ou mais regiões de sinalização transmembranar e intracelular. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é fundido ao domínio extracelular. Em uma modalidade, é utilizado um domínio transmembranar que naturalmente está associado a um dos domínios no receptor, por exemplo, CAR. Em alguns casos, o domínio transmembranar é selecionado ou modificado por substituição de aminoácidos para evitar a ligação de tais domínios aos domínios transmembranares da mesma ou de diferentes proteínas membranares de superfície para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor.

[00746] O domínio transmembranar em algumas modalidades é derivado de uma fonte natural ou de uma fonte sintética. Onde a fonte é natural, em alguns aspectos, o domínio é derivado de qualquer proteína transmembranar ou ligada à membrana. As regiões transmembranares incluem aquelas derivadas (ou seja, compreendem pelo menos

as regiões transmembranares) da cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, o domínio transmembranar em algumas modalidades é sintético. Em alguns aspectos, o domínio transmembranar sintético compreende resíduos predominantemente hidrofóbicos, tal como leucina e valina. Em alguns aspectos, um tripleto de fenilalanina, triptofano e valina será encontrado em cada extremidade de um domínio transmembranar sintético. Em algumas modalidades, a ligação é feita por ligantes, espaçadores e/ou domínios transmembranares.

[00747] Entre a região de sinalização intracelular estão aquelas que imitam ou aproximam um sinal através de um receptor de antígeno natural, um sinal através desse receptor em combinação com um receptor coestimulatório e/ou um sinal através de um receptor coestimulatório sozinho. Em algumas modalidades, um ligante oligo- ou polipeptídico curto, por exemplo, um ligante de 2 a 10 aminoácidos de comprimento, tal como um contendo glicina e serina, por exemplo, dupleto de glicina-serina, está presente e forma uma ligação entre o domínio transmembranar e domínio citoplasmático de sinalização do CAR.

[00748] O receptor, por exemplo, o CAR, geralmente inclui pelo menos um componente ou componentes de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o receptor inclui um componente intracelular de um complexo TCR, tal como uma cadeia CDR CD3 que medeia a ativação de células T e citotoxicidade, por exemplo, cadeia CD3 zeta. Assim, em alguns aspectos, o anticorpo de ligação a ROR1 está ligado a um ou mais módulos de sinalização celular. Em algumas modalidades, os módulos de sinalização celular incluem o domínio transmembranar CD3, domínios de sinalização intracelular CD3 e/ou outros domínios transmembranares de CD. Em algumas modalidades, o receptor, por exemplo, CAR, inclui adicionalmente uma porção de uma

ou mais moléculas adicionais, tais como o receptor Fc γ, CD8, CD4, CD25 ou CD16. Por exemplo, em alguns aspectos, o CAR inclui uma molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3-ζ) ou receptor Fc γ e CD8, CD4, CD25 ou CD16.

[00749] Em algumas modalidades, após a ligação do CAR, o domínio citoplasmático ou a região de sinalização intracelular do CAR ativa pelo menos uma das funções efetoras normais ou respostas da célula imune, por exemplo, célula T manipulada geneticamente para expressar o CAR. Por exemplo, em alguns contextos, o CAR induz uma função de uma célula T, tal como atividade citolítica ou atividade auxiliar de T, tal como secreção de citocinas ou outros fatores. Em algumas modalidades, uma porção truncada de uma região de sinalização intracelular de um componente receptor de antígeno ou molécula coestimulatória é usada no lugar de uma cadeia imunoestimulatória intacta, por exemplo, se ela transduz o sinal da função efetora. Em algumas modalidades, as regiões de sinalização intracelular, por exemplo, compreendendo domínios ou domínios intracelulares, incluem as sequências citoplasmáticas do receptor de células T (TCR) e, em alguns aspectos, também os de correceptores que no contexto natural atuam em conjunto com tal receptor para iniciar a transdução de sinal após o engate do receptor de antígeno e/ou qualquer derivado ou variante de tais moléculas e/ou qualquer sequência sintética que tenha a mesma capacidade funcional.

[00750] No contexto de um TCR natural, a ativação completa geralmente requer não apenas sinalização através do TCR, mas também um sinal coestimulatório. Assim, em algumas modalidades, para promover a ativação completa, um componente para gerar sinal secundário ou coestimulatório também é incluído no CAR. Em outras modalidades, o CAR não inclui um componente para gerar um sinal coestimulatório. Em alguns aspectos, um CAR adicional é expresso na

mesma célula e fornece o componente para gerar o sinal secundário ou coestimulatório.

[00751] A ativação de células T é, em alguns aspectos, descrita como sendo mediada por duas classes de sequências de sinalização citoplasmáticas: aquelas que iniciam a ativação primária dependente de antígeno através do TCR (sequências primárias de sinalização citoplasmática) e aquelas que atuam de maneira independente de antígeno para fornecer um sinal secundário ou coestimulatório (sequências de sinalização citoplasmáticas secundárias). Em alguns aspectos, o CAR inclui um ou ambos os componentes de sinalização.

[00752] Em alguns aspectos, o CAR inclui uma sequência de sinalização citoplasmática primária que regula a ativação primária do complexo TCR. As sequências de sinalização citoplasmáticas primárias que atuam de maneira estimulatória podem conter motivos de sinalização que são conhecidos como motivos de ativação à base de tirosina imunorreceptora ou ITAMs. Exemplos de ITAM contendo sequências de sinalização citoplasmáticas primárias incluem aquelas derivadas de TCR ou CD3 zeta, FcR gama ou FcR beta. Em algumas modalidades, a (s) molécula (s) de sinalização citoplasmática no CAR contém um domínio de sinalização citoplasmático, uma porção do mesmo ou uma sequência derivada da CD3 zeta.

[00753] Em algumas modalidades, o CAR inclui uma região de sinalização e/ou porção transmembranar de um receptor coestimulatório, tais como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. Em alguns aspectos, o mesmo CAR inclui a região de sinalização e os componentes coestimulatórios.

[00754] Em algumas modalidades, a região de sinalização é incluída dentro de um CAR, enquanto o componente coestimulatório é fornecido por outro CAR reconhecendo outro antígeno. Em algumas modalidades, os CARs incluem CARs de ativação ou estimulatórios e

CARs coestimulatórios, ambos expressos na mesma célula (vide WO2014/055668).

[00755] Em certas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio transmembranar e de sinalização CD28 ligado a um domínio intracelular CD3 (por exemplo, CD3-zeta). Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio estimulatório quimérico CD28 e CD137 (4-1BB, TNFRSF9), ligado a um domínio intracelular CD3 zeta.

[00756] Em algumas modalidades, o CAR engloba um ou mais, por exemplo, dois ou mais domínios coestimulatórios e um domínio de ativação, por exemplo, domínio de ativação primário, na porção citoplasmática. Exemplos de CARs incluem componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 e 4-1BB.

[00757] Em alguns casos, os CARs são referidos como CARs de primeira, segunda e/ou terceira geração. Em alguns aspectos, um CAR de primeira geração é aquele que apenas fornece um sinal induzido pela cadeia CD3 após a ligação a antígeno; em alguns aspectos, um CAR de segunda geração é aquele que fornece tal um sinal e sinal coestimulatório, tal como um que inclui um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulatório tal como CD28 ou CD137; em alguns aspectos, um CAR de terceira geração em alguns aspectos é aquele que inclui múltiplos domínios coestimulatórios de diferentes receptores coestimulatórios.

[00758] Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo o anticorpo ou fragmento aqui descrito. Em alguns aspectos, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo o anticorpo ou fragmento aqui descrito e um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento inclui um scFv ou um anticorpo VH de domínio único e o domínio intracelular contém um ITAM. Em alguns

aspectos, o domínio de sinalização intracelular inclui um domínio de sinalização de uma cadeia zeta de uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ). Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico inclui um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

[00759] Em alguns aspectos, o domínio transmembranar contém uma porção transmembranar de CD28. O domínio extracelular e a transmembrana podem ser ligados direta ou indiretamente. Em algumas modalidades, o domínio extracelular e a transmembrana estão ligados por um espaçador, tal como qualquer um aqui descrito. Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico contém um domínio intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T, tal como entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular. Em alguns aspectos, a molécula coestimulatória de célula T é CD28 ou 4-1BB.

[00760] Em algumas modalidades, o CAR contém um anticorpo, por exemplo, um fragmento de anticorpo, um domínio transmembranar que é ou contém uma porção transmembranar de CD28 ou uma variante funcional da mesma e um domínio de sinalização intracelular contendo uma porção de sinalização de CD28 ou variante funcional da mesma e uma porção de sinalização de CD3 zeta ou variante funcional da mesma. Em algumas modalidades, o CAR contém um anticorpo, por exemplo, fragmento de anticorpo, um domínio transmembranar que é ou contém uma porção transmembranar de CD28 ou uma variante funcional da mesma e um domínio de sinalização intracelular contendo uma porção de sinalização de um 4-1BB ou variante funcional e uma porção de sinalização de CD3 zeta ou variante funcional da mesma. Em algumas dessas modalidades, o receptor inclui adicionalmente um espaçador contendo uma porção de uma molécula de Ig, tal como uma molécula de Ig humana, tal como uma dobradiça de Ig, por

exemplo, uma dobradiça IgG4, tal como um espaçador apenas de dobradiça.

[00761] Em algumas modalidades, o domínio transmembranar do receptor, por exemplo, o CAR é um domínio transmembranar de CD28 humano ou uma variante do mesmo, por exemplo, um domínio transmembranar de 27 aminoácidos de um CD28 humano (No. de acesso: P10747.1), ou é um domínio transmembranar que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 8 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos 85 %, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 8; em algumas modalidades, a porção contendo domínio transmembranar do receptor recombinante compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 9 ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais identidade de sequência.

[00762] Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico contém um domínio intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T. Em alguns aspectos, a molécula coestimulatória de célula T é CD28 ou 4-1BB.

[00763] Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulatório intracelular de CD28 humano ou uma variante ou porção funcional do mesmo, tal como um domínio de 41 aminoácidos do mesmo e/ou um domínio com uma substituição de LL por GG nas posições 186-187 de uma proteína CD28 nativa. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular pode compreender a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 10 ou 11 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais da identidade de sequência com SEQ ID NO: 10 ou 11. Em algumas modalidades, a região intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulatório intracelular de 4-1BB ou variante funcional ou porção dos mesmos, tal como um domínio citoplasmático de 42 aminoácidos de um 4-1BB humano (No. de acesso Q07011.1) ou variante funcional ou porção dos mesmos, tal como a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 12 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para a SEQ ID NO: 12.

[00764] Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende uma cadeia CD3 humana, opcionalmente um domínio de sinalização estimulatória de CD3 zeta ou uma variante funcional da mesma, tal como um domínio citoplasmático 112 AA da isoforma 3 de CD3ζ humana (No. de acesso: P20963.2) ou um domínio de sinalização CD3 zeta como descrito na Patente US No.: 7.446.190 ou Patente US No 8.911.993. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 13, 14 ou 15 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência de SEQ ID NO: 13, 14 ou 15.

[00765] Em alguns aspectos, o espaçador contém apenas uma região de dobradiça de uma IgG, tal como apenas uma dobradiça de IgG4 ou IgG1, tal como o espaçador de dobradiça estabelecido em SEQ ID NO: 1. Em outras modalidades, o espaçador é uma dobradiça de Ig, por exemplo, e dobradiça de IgG4, ligada a um domínio CH2 e/ou CH3. Em algumas modalidades, o espaçador é uma dobradiça de Ig, por exemplo, uma dobradiça de IgG4, ligada aos domínios CH2 e

CH3, tal como estabelecido em SEQ ID NO: 3. Em algumas modalidades, o espaçador é uma dobradiça de Ig, por exemplo, uma dobradiça de IgG4, ligada apenas a um domínio CH3, tal como estabelecido em SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, o espaçador é ou compreende uma sequência rica em glicina-serina ou outro ligante flexível, tal como ligantes flexíveis conhecidos.

2. Receptores de Células T (TCRs)

[00766] Em algumas modalidades, são fornecidas células manipuladas geneticamente, tal como células T, que expressam um receptor de células T (TCR) ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo que reconhece um epítopo peptídico ou epítopo da célula T de um polipeptídeo alvo, tal como um antígeno de um tumor, proteína viral ou autoimune.

[00767] Em algumas modalidades, um "receptor de célula T" ou "TCR" é uma molécula que contém cadeias α e β variáveis (também conhecidas como TCRα e TCRβ, respectivamente) ou cadeias γ e δ variáveis (também conhecidas como TCRα e TCRβ, respectivamente), ou suas porções de ligação a antígeno, e que é capaz de se ligar especificamente a um peptídeo ligado a uma molécula de MHC. Em algumas modalidades, o TCR está na forma αβ. Tipicamente, os TCRs que existem nas formas αβ e γδ são geralmente estruturalmente semelhantes, mas as células T que as expressam podem ter sítios ou funções anatômicas distintas. Um TCR pode ser encontrado na superfície de uma célula ou na forma solúvel. Geralmente, um TCR é encontrado na superfície das células T (ou linfócitos T), onde geralmente é responsável pelo reconhecimento de antígenos ligados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).

[00768] Salvo indicação em contrário, o termo "TCR" deve ser entendido como abrangendo TCRs completos, bem como porções de ligação a antígeno ou fragmentos dos mesmos. Em algumas modali-

dades, o TCR é um TCR intacto ou completo, incluindo TCRs na forma αβ ou γδ. Em algumas modalidades, o TCR é uma porção de ligação a antígeno que é menor que um TCR de comprimento total, mas que se liga a um peptídeo específico ligado a uma molécula de MHC, tal como se liga a um complexo de peptídeo de MHC. Em alguns casos, uma porção ou fragmento de ligação a antígeno de um TCR pode conter apenas uma porção dos domínios estruturais de um TCR inteiro ou intacto, mas adicionalmente é capaz de se ligar ao epítopo peptídico, tal como complexo MHC-peptídeo, ao qual o TCR completo se liga. Em alguns casos, uma porção de ligação a antígeno contém os domínios variáveis de um TCR, tal como a cadeia α variável e a cadeia β variável de um TCR, suficientes para formar um sítio de ligação para a ligação a um complexo MHC-peptídeo específico. Geralmente, as cadeias variáveis de um TCR contêm regiões determinantes de complementaridade envolvidas no reconhecimento do complexo peptídeo, MHC e/ou MHC-peptídeo.

[00769] Em algumas modalidades, os domínios variáveis do TCR contêm loops hipervariáveis, ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs), que geralmente são os principais contribuintes para o reconhecimento de antígenos e capacidades e especificidade de ligação. Em algumas modalidades, uma CDR de um TCR ou uma combinação dos mesmos forma todo ou substancialmente todo o sítio de ligação a antígeno de uma dada molécula de TCR. As várias CDRs dentro de uma região variável de uma cadeia de TCR geralmente são separadas por regiões estruturais (FRs), que geralmente exibem menos variabilidade entre as moléculas de TCR em comparação com as CDRs (vide, por exemplo, Jores et al., Proc. Nat'l Acad Sci. USA 87: 9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7: 3745, 1988; vide também Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). Em algumas modalidades, a CDR3 é a CDR principal responsável pela ligação ou especi-

ficidade do antígeno ou é a mais importante entre as três CDRs em uma determinada região variável de TCR para reconhecimento do antígeno, e/ou para interação com a porção peptídica processada do complexo peptídeo-MHC. Em alguns contextos, a CDR1 da cadeia alfa pode interagir com a parte N-terminal de certos peptídeos antigênicos. Em alguns contextos, CDR1 da cadeia beta pode interagir com a parte C-terminal do peptídeo. Em alguns contextos, a CDR2 contribui mais fortemente para ou é a CDR principal responsável pela interação ou reconhecimento da porção MHC do complexo MHC-peptídeo. Em algumas modalidades, a região variável de cadeia β pode conter uma região hipervariável adicional (CDR4 ou HVR4), que geralmente está envolvida na ligação de superantígenos e não no reconhecimento de antígenos (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8: 411-426).

[00770] Em algumas modalidades, um TCR também pode conter um domínio constante, um domínio transmembranar e/ou uma cauda citoplasmática curta (vide, por exemplo, Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3ª Ed., Current Biology Publications, por exemplo, 4:33, 1997). Em alguns aspectos, cada cadeia do TCR pode possuir um domínio variável da imunoglobulina N-terminal, um domínio constante da imunoglobulina, uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática curta na extremidade C-terminal. Em algumas modalidades, um TCR está associado a proteínas invariantes do complexo CD3 envolvidas na mediação da transdução de sinal.

[00771] Em algumas modalidades, uma cadeia de TCR contém um ou mais domínio constante. Por exemplo, a porção extracelular de uma determinada cadeia de TCR (por exemplo, cadeia α ou cadeia β) pode conter dois domínios do tipo imunoglobulina, tal como um domínio variável (por exemplo, Vα ou Vβ; tipicamente os aminoácidos 1 a 116 sobre a numeração de Kabat Kabat et al., "Sequences of Proteins

of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5tª ed.) e um domínio constante (por exemplo, domínio constante de cadeia α ou Cα, tipicamente posições 117 a 259 da cadeia com base na numeração de Kabat ou domínio constante de cadeia β ou Cβ, tipicamente posições 117 a 295 da cadeia com base em Kabat) adjacente à membrana celular. Por exemplo, em alguns casos, a porção extracelular do TCR formada pelas duas cadeias contém dois domínios constantes proximais à membrana e dois domínios variáveis distais à membrana, cujos domínios variáveis contêm CDRs. O domínio constante do TCR pode conter sequências de conexão curtas nas quais um resíduo de cisteína forma uma ligação dissulfeto, ligando assim as duas cadeias do TCR. Em algumas modalidades, um TCR pode ter um resíduo de cisteína adicional em cada uma das cadeias α e β, de modo que o TCR contenha duas ligações dissulfeto nos domínios constantes.

[00772] Em algumas modalidades, as cadeias de TCR contêm um domínio transmembranar. Em algumas modalidades, o domínio transmembranar é carregado positivamente. Em alguns casos, a cadeia TCR contém uma cauda citoplasmática. Em alguns casos, a estrutura permite que o TCR se associe a outras moléculas como CD3 e suas subunidades. Por exemplo, um TCR contendo domínios constantes com uma região transmembranar pode ancorar a proteína na membrana celular e associar-se a subunidades invariantes do aparelho ou complexo de sinalização CD3. As caudas intracelulares das subunidades de sinalização de CD3 (por exemplo, cadeias CD3γ, CD3δ, CD3ε e CD3ζ) contêm um ou mais motivos de ativação à base de tirosina imunorreceptores ou ITAM que estão envolvidos na capacidade de sinalização do complexo TCR.

[00773] Em algumas modalidades, o TCR pode ser um heterodímero de duas cadeias α e β (ou opcionalmente γ e δ) ou pode ser um

construto de TCR de cadeia única. Em algumas modalidades, o TCR é um heterodímero contendo duas cadeias separadas (cadeias α e β ou cadeias γ e δ) que são ligadas, tal como por uma ligação dissulfeto ou ligações dissulfeto.

[00774] Em algumas modalidades, o TCR pode ser gerado a partir de uma sequência conhecida de TCR, tal como sequências de cadeias Vα, β, para as quais uma sequência de codificação substancialmente completa está prontamente disponível. Os métodos para obter sequências de TCR de tamanho completo, incluindo sequências da cadeia V, de fontes celulares são bem conhecidos. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos que codificam o TCR podem ser obtidos a partir de uma variedade de fontes, tal como por amplificação por reação em cadeia polimerase (PCR) de ácidos nucleicos que codificam o TCR dentro ou isolados de uma determinada célula ou células, ou síntese de sequências de DNA TCR disponível publicamente.

[00775] Em algumas modalidades, o TCR é obtido a partir de uma fonte biológica, tal como células de uma célula T (por exemplo, célula T citotóxica), hibridomas de células T ou outra fonte disponível publicamente. Em algumas modalidades, as células T podem ser obtidas a partir de células isoladas *in vivo*. Em algumas modalidades, o TCR é um TCR timidamente selecionado. Em algumas modalidades, o TCR é um TCR restrito a neoepítopos. Em algumas modalidades, as células T podem ser um hibridoma ou clone de célula T cultivado. Em algumas modalidades, o TCR ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo pode ser gerado sinteticamente a partir do conhecimento da sequência do TCR.

[00776] Em algumas modalidades, o TCR é gerado a partir de um TCR identificado ou selecionado a partir do rastreamento de uma biblioteca de TCRs candidatos contra um antígeno polipeptídico alvo ou epítopo de célula T alvo do mesmo. As bibliotecas de TCR podem ser

geradas por amplificação do repertório de Vα e Vβ a partir de células T isoladas de um objeto, incluindo células presentes em PBMCs, baço ou outro órgão linfoide. Em alguns casos, as células T podem ser amplificadas a partir de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs). Em algumas modalidades, as bibliotecas de TCR podem ser geradas a partir de células $CD4^+$ ou $CD8^+$. Em algumas modalidades, os TCRs podem ser amplificados a partir de uma fonte de células T de um objeto saudável normal, isto é, bibliotecas normais de TCR. Em algumas modalidades, os TCRs podem ser amplificados a partir de uma fonte de células T de um objeto doente, isto é, bibliotecas de TCR doentes. Em algumas modalidades, os iniciadores degenerados são usados para amplificar o repertório genético de Vα e Vβ, tal como por RT-PCR em amostras, tal como células T, obtidas de seres humanos. Em algumas modalidades, as bibliotecas scTv podem ser montadas a partir de bibliotecas Vα e Vβ puras nas quais os produtos amplificados são clonados ou montados para serem separados por um ligante. Dependendo da fonte do objeto e das células, as bibliotecas podem ser específicas de alelo HLA. Alternativamente, em algumas modalidades, as bibliotecas de TCR podem ser geradas por mutagênese ou diversificação de uma molécula de TCR parental ou scaffold. Em alguns aspectos, os TCRs são objetos a evolução direcionada, tal como por mutagênese, por exemplo, da cadeia α ou β. Em alguns aspectos, resíduos particulares nas CDRs do TCR são alterados. Em algumas modalidades, os TCRs selecionados podem ser modificados por maturação por afinidade. Em algumas modalidades, as células T específicas do antígeno podem ser selecionadas, tal como por meio de triagem para avaliar a atividade de CTL contra o peptídeo. Em alguns aspectos, TCRs, por exemplo, presentes nas células T específicas de antígeno, podem ser selecionados, tal como por atividade de ligação, por exemplo, afinidade ou avidez particular para o antígeno.

[00777] Em algumas modalidades, os receptores de antígeno geneticamente modificados incluem receptores de células T recombinantes (TCRs) e/ou TCRs clonados a partir de células T que ocorrem naturalmente. Em algumas modalidades, um clone de células T de alta afinidade para um antígeno-alvo (por exemplo, um antígeno de câncer) é identificado, isolado de um paciente e introduzido nas células. Em algumas modalidades, o clone TCR para um antígeno-alvo foi gerado em camundongos transgênicos manipulados geneticamente com genes do sistema imune humano (por exemplo, o sistema de antígeno leucocitário humano, ou HLA). Vide, por exemplo, antígenos tumorais (vide, por exemplo, Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15: 169–180 e Cohen et al. (2005) J. Immunol. 175: 5799–5808. Em algumas modalidades, exibição de fagos é usada para isolar TCRs contra um antígeno-alvo (vide, por exemplo, Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390–1395 e Li (2005) Nat Biotechnol. 23: 349–354.

[00778] Em algumas modalidades, o TCR ou porção de ligação a antígeno do mesmo é aquele que foi modificado ou manipulado geneticamente. Em algumas modalidades, métodos de evolução direcionada são usados para gerar TCRs com propriedades alteradas, tal como com maior afinidade para um complexo MHC-peptídeo específico. Em algumas modalidades, a evolução direcionada é alcançada por métodos de exibição, incluindo, mas não limitado a, exibição de leveduras (Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97, 5387-92), exibição de fagos (Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) ou exibição de células T (Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84). Em algumas modalidades, as abordagens de exibição envolvem manipulação ou modificação de um TCR conhecido, parental ou de referência. Por exemplo, em alguns casos, um TCR do tipo selvagem pode ser usado como modelo para produzir TCRs mutagenizados nos quais um ou mais resíduos das

CDRs são mutados, e mutantes com uma propriedade alterada desejada, tal como maior afinidade por um antígeno-alvo desejado, são selecionados.

[00779] Em algumas modalidades, peptídeos de um polipeptídeo alvo para uso na produção ou geração de um TCR de interesse são conhecidos ou podem ser facilmente identificados por um especialista na técnica. Em algumas modalidades, peptídeos adequados para uso na geração de TCRs ou porções de ligação a antígeno podem ser determinados com base na presença de um motivo restrito de HLA em um polipeptídeo alvo de interesse, tal como um polipeptídeo alvo descrito abaixo. Em algumas modalidades, os peptídeos são identificados usando modelos de previsão de computador disponíveis. Em algumas modalidades, para a previsão de sítios de ligação de MHC classe I, esses modelos incluem, mas não estão limitados a, ProPred1 (Singh e Raghava (2001) Bioinformatics 17 (12): 1236-1237 e SYFPEITHI (vide Schuler et al. (2007)) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409 (1): 75-93, 2007. Em algumas modalidades, o epítopo restrito de MHC é HLA-A0201, que é expresso em ou cerca de 39-46% de todos os caucasianos e, portanto, representa uma escolha adequada de antígeno MHC para uso na preparação de um TCR ou outra molécula de ligação ao peptídeo MHC.

[00780] Motivos de ligação a HLA-A0201 e os sítios de clivagem para proteassomas e imunoproteassomas usando modelos de previsão por computador são conhecidos. Para prever sítios de ligação de MHC classe I, esses modelos incluem, mas não estão limitados a, ProPred1 (descrito em mais detalhes em Singh e Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001), e SYFPEITHI (vide Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93 2007).

[00781] Em algumas modalidades, o TCR ou porção de ligação a antígeno do mesmo pode ser uma proteína natural produzida de forma recombinante ou uma forma mutada na qual uma ou mais propriedades, tal como característica de ligação, foi alterada. Em algumas modalidades, um TCR pode ser derivado de uma de várias espécies animais, tais como humano, camundongo, rato ou outro mamífero. Um TCR pode estar ligado à célula ou na forma solúvel. Em algumas modalidades, para fins dos métodos fornecidos, o TCR está na forma ligada à célula expressa na superfície de uma célula.

[00782] Em algumas modalidades, o TCR é um TCR de comprimento completo. Em algumas modalidades, o TCR é uma porção de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o TCR é um TCR dimérico (dTCR). Em algumas modalidades, o TCR é um TCR de cadeia única (sc-TCR). Em algumas modalidades, um dTCR ou scTCR tem as estruturas descritas nos documentos WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[00783] Em algumas modalidades, o TCR contém uma sequência correspondente à sequência transmembranar. Em algumas modalidades, o TCR contém uma sequência correspondente às sequências citoplasmáticas. Em algumas modalidades, o TCR é capaz de formar um complexo de TCR com CD3. Em algumas modalidades, qualquer um dos TCRs, incluindo um dTCR ou scTCR, pode ser ligado a domínios de sinalização que produzem um TCR ativo na superfície de uma célula T. Em algumas modalidades, o TCR é expresso na superfície das células.

[00784] Em algumas modalidades, um dTCR contém um primeiro polipeptídeo em que uma sequência correspondente a uma sequência de região variável de cadeia α de TCR é fundida ao N-terminal de uma sequência correspondente a uma sequência extracelular de região constante de cadeia α de TCR, e um segundo polipeptídeo em que

uma sequência correspondente a uma sequência de região variável de cadeia β de TCR é fundida ao N-terminal de uma sequência correspondente a uma sequência extracelular de região constante de cadeia β de TCR, o primeiro e o segundo polipeptídeos sendo ligados por uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades, a ligação pode corresponder à ligação dissulfeto intercadeia nativa presente nos TCRs αβ diméricos nativos. Em algumas modalidades, as ligações dissulfeto intercadeia não estão presentes em um TCR nativo. Por exemplo, em algumas modalidades, uma ou mais cisteínas podem ser incorporadas nas sequências extracelulares de região constante do par de polipeptídeo dTCR. Em alguns casos, uma ligação dissulfeto nativa e uma não nativa pode ser desejável. Em algumas modalidades, o TCR contém uma sequência transmembranar para ancorar na membrana.

[00785] Em algumas modalidades, um dTCR contém uma cadeia α de TCR contendo um domínio α variável, um domínio α constante e um primeiro motivo de dimerização ligado ao C-terminal do domínio α constante e uma cadeia β de TCR compreendendo um domínio β variável, um domínio β constante e um primeiro motivo de dimerização ligado ao C-terminal do domínio β constante, em que o primeiro e o segundo motivos de dimerização interagem facilmente para formar uma ligação covalente entre um aminoácido no primeiro motivo de dimerização e um aminoácido no segundo motivo de dimerização que liga a cadeia α de TCR e a cadeia β de TCR conjuntamente.

[00786] Em algumas modalidades, o TCR é um scTCR. Tipicamente, um scTCR pode ser gerado usando métodos conhecidos, Vide, por exemplo, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (EUA) 89, 4759 (1992); Wulfing, C. e Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (EUA) 90 3830 (1993); Publicado internacional PCT Nos. WO 96/13 593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; e Schlueter, C.J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996).

Em algumas modalidades, um scTCR contém uma ligação intercadeia dissulfeto não nativa introduzida para facilitar a associação das cadeias de TCR (vide, por exemplo, PCT internacional publicado No. WO 03/020763). Em algumas modalidades, um scTCR é um TCR truncado não ligado a dissulfeto no qual zíperes de leucina heterólogos fundidos com seus C-terminais facilitam a associação de cadeias (vide, por exemplo, o PCT internacional publicado No. WO99/60120). Em algumas modalidades, um scTCR contém um domínio variável de TCRα covalentemente ligado a um domínio variável de TCRβ por meio de um ligante peptídico (vide, por exemplo, PCT internacional publicado No. WO99/18129).

[00787] Em algumas modalidades, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de aminoácidos correspondente a uma região variável de cadeia α de TCR, um segundo segmento constituído por uma sequência de aminoácidos correspondente a uma sequência de região variável de cadeia β de TCR fundida ao N-terminal de uma sequência de aminoácidos correspondente a uma sequência extracelular de domínio constante de cadeia β de TCR e uma sequência de ligante que liga o C-terminal do primeiro segmento ao N-terminal do segundo segmento.

[00788] Em algumas modalidades, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia α fundida ao N-terminal de uma sequência de domínio constante extracelular da cadeia α e um segundo segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia β fundida ao N-terminal de uma sequência extracelular constante de cadeia β e uma sequência transmembranar, e, opcionalmente, uma sequência de ligante que liga o C-terminal do primeiro segmento ao N-terminal do segundo segmento.

[00789] Em algumas modalidades, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia

β de TCR fundida com o N-terminal de uma sequência de domínio constante extracelular de cadeia β, e um segundo segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia α fundida a o N-terminal de uma sequência extracelular constante de cadeia α e sequência transmembranar, e, opcionalmente, uma sequência de ligante que liga o C-terminal do primeiro segmento ao N-terminal do segundo segmento.

[00790] Em algumas modalidades, o ligante de um scTCRs que liga o primeiro e o segundo segmentos de TCR pode ser qualquer ligante capaz de formar um único filamento polipeptídico, mantendo a especificidade de ligação a TCR. Em algumas modalidades, a sequência de ligante pode, por exemplo, ter a fórmula -P-AA-P- em que P é prolina e AA representa uma sequência de aminoácidos em que os aminoácidos são glicina e serina. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo segmentos são emparelhados de modo que as sequências da região variável dos mesmos sejam orientadas para essa ligação. Portanto, em alguns casos, o ligante tem um comprimento suficiente para abranger a distância entre o C-terminal do primeiro segmento e o N-terminal do segundo segmento, ou vice-versa, mas não é muito longo para bloquear ou reduzir a ligação do scTCR ao ligando alvo. Em algumas modalidades, o ligante pode conter de ou de cerca de 10 a 45 aminoácidos, tal como 10 a 30 aminoácidos ou 26 a 41 resíduos de aminoácidos, por exemplo, 29, 30, 31 ou 32 aminoácidos. Em algumas modalidades, o ligante tem a fórmula -PGGG- $(SGGGG)_5$-P- em que P é prolina, G é glicina e S é serina (SEQ ID NO: 22). Em algumas modalidades, o ligante tem a sequência GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 23)

[00791] Em algumas modalidades, o scTCR contém uma ligação dissulfeto covalente que liga um resíduo da região de imunoglobulina do domínio constante de cadeia α a um resíduo da região de imuno-

globulina do domínio constante de cadeia β. Em algumas modalidades, a ligação dissulfeto intercadeia em um TCR nativo não está presente. Por exemplo, em algumas modalidades, uma ou mais cisteínas podem ser incorporadas nas sequências extracelulares da região constante dos primeiro e segundo segmentos do polipeptídeo scTCR. Em alguns casos, uma ligação dissulfeto nativa e uma não nativa pode ser desejável.

[00792] Em algumas modalidades de um dTCR ou scTCR contendo ligações dissulfeto intercadeia introduzidas, as ligações dissulfeto nativas não estão presentes. Em algumas modalidades, as uma ou mais das cisteínas nativas que formam uma ligação dissulfeto intercadeia nativa são substituídas por outro resíduo, tal como uma serina ou alanina. Em algumas modalidades, uma ligação dissulfeto introduzida pode ser formada pela mutação de resíduos não cisteína no primeiro e segundo segmentos em cisteína. Exemplos de ligações dissulfeto não nativas de um TCR são descritas no PCT Internacional publicado No. WO2006/000830.

[00793] Em algumas modalidades, o TCR ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo exibe uma afinidade com uma constante de ligação de equilíbrio para um antígeno-alvo entre ou entre cerca de 10-5 e 10-12 M e todos os seus valores e faixas individuais. Em algumas modalidades, o antígeno-alvo é um complexo MHC-peptídeo ou ligando.

[00794] Em algumas modalidades, o ácido nucleico ou ácidos nucleicos que codificam um TCR, tal como as cadeias α e β, podem ser amplificados por PCR, clonagem ou outro processo meios aceitáveis e clonados em um vetor ou vetores de expressão adequados. O vetor de expressão pode ser qualquer vetor de expressão recombinante adequado e pode ser usado para transformar ou transfectar qualquer hospedeiro adequado. Os vetores adequados incluem aqueles projetados

para propagação e expansão ou expressão ou ambos, tal como plasmídeos e vírus.

[00795] Em algumas modalidades, o vetor pode ser um vetor da série pUC (Fermentas Life Sciences), da série pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), da série pET (Novagen, Madison, Wis.), da série pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), ou da série pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). Em alguns casos, vetores de bacteriófagos, tal como λG10, λGT11, λZapII (Stratagene), λEMBL4 e λNM1149, também podem ser utilizados. Em algumas modalidades, os vetores de expressão de plantas podem ser usados e incluem pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 e pBIN19 (Clontech). Em algumas modalidades, os vetores de expressão animal incluem pEUK-Cl, pMAM e pMAMneo (Clontech). Em algumas modalidades, um vetor viral é usado, tal como um vetor retroviral.

[00796] Em algumas modalidades, os vetores de expressão recombinantes podem ser preparados usando técnicas padrão de DNA recombinante. Em algumas modalidades, os vetores podem conter sequências reguladoras, tal como códons de começo e terminação da transcrição e tradução, que são específicos para o tipo de hospedeiro (por exemplo, bactéria, fungo, planta ou animal) no qual o vetor deve ser introduzido, tal como apropriado e levando em consideração se o vetor é baseado em DNA ou RNA. Em algumas modalidades, o vetor pode conter um promotor não nativo operacionalmente ligado à sequência de nucleotídeos que codifica o TCR ou a porção de ligação a antígeno (ou outra molécula de ligação ao peptídeo MHC). Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor não viral ou um promotor viral, tal como um promotor de citomegalovírus (CMV), um promotor SV40, um promotor de RSV e um promotor encontrado na repetição terminal longa do vírus célula-tronco de murina. Outros promotores conhecidos também são contemplados.

[00797] Em algumas modalidades, após a obtenção do clone de células T, as cadeias alfa e beta de TCR são isoladas e clonadas em um vetor de expressão gênica. Em algumas modalidades, os genes alfa e beta de TCR são ligados via um peptídeo de salto ribossomal picornavírus 2A, de modo que ambas as cadeias sejam coexpressão. Em algumas modalidades, a transferência genética do TCR é realizada via vetores retrovirais ou lentivirais ou via transposons (vide, por exemplo, Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063 Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18: 1748-1757; e Hackett et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18: 674-683.

[00798] Em algumas modalidades, para gerar um vetor que codifica um TCR, as cadeias α e β são amplificadas por PCR a partir de cDNA total isolado de um clone de células T que expressa o TCR de interesse e clonadas em um vetor de expressão. Em algumas modalidades, as cadeias α e β são clonadas no mesmo vetor. Em algumas modalidades, as cadeias α e β são clonadas em diferentes vetores. Em algumas modalidades, as cadeias α e β geradas são incorporadas a um retroviral, por exemplo, lentiviral, vetor.

3. Receptor de Autoanticorpo Quimérico (CAAR)

[00799] Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um receptor de autoanticorpo quimérico (CAAR). Em algumas modalidades, o CAAR é específico para um autoanticorpo. Em algumas modalidades, uma célula que expressa o CAAR, tal como uma célula T manipulada geneticamente para expressar um CAAR, pode ser usada para se ligar e matar especificamente células que expressam autoanticorpos, mas não células que expressam anticorpos normais. Em algumas modalidades, as células que expressam CAAR podem ser usadas para tratar uma doença autoimune associada à expressão de au-

toantígenos, tal como doenças autoimunes. Em algumas modalidades, as células que expressam CAAR podem alcançar células B que, em última análise, produzem os autoanticorpos e exibem os autoanticorpos em suas superfícies celulares, marcam essas células B como alvos específicos da doença para intervenção terapêutica. Em algumas modalidades, as células que expressam CAAR podem ser usadas para direcionar e matar eficientemente as células B patogênicas em doenças autoimunes, direcionando as células B causadoras de doenças usando um receptor de autoanticorpo quimérico específico de antígeno. Em algumas modalidades, o receptor recombinante é um CAAR, tal como qualquer um descrito no Pedido de Patente U.S. Pub. No. US 2017/0051035.

[00800] Em algumas modalidades, o CAAR compreende um domínio de ligação de autoanticorpo, um domínio transmembranar e uma região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em algumas modalidades, a região de sinalização intracelular compreende uma região de sinalização secundária ou coestimulatória (regiões de sinalização intracelular secundárias).

[00801] Em algumas modalidades, o domínio de ligação de autoanticorpo compreende um autoantígeno ou um fragmento do mesmo. A escolha do autoantígeno pode depender do tipo de autoanticorpo sendo direcionado. Por exemplo, o autoantígeno pode ser escolhido porque reconhece um autoanticorpo em uma célula-alvo, tal como uma

célula B, associada a um estado de doença específico, por exemplo uma doença autoimune, tal como uma doença autoimune mediada por autoanticorpos. Em algumas modalidades, a doença autoimune inclui o pênfigo vulgar (PV). Autoantígenos exemplares incluem desmoglein 1 (Dsg1) e Dsg3.

4. Multidirecionamento

[00802] Em algumas modalidades, as células e métodos incluem estratégias de multidirecionamento, tal como expressão de dois ou mais receptores geneticamente modificados na célula, cada um reconhecendo o mesmo de um antígeno diferente e tipicamente cada um incluindo um componente de sinalização intracelular diferente. Tais estratégias de multidirecionamento são descritas, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente Internacional No: WO 2014055668 A1 (que descreve combinações de CARs de ativação e coestimulatórios, por exemplo, direcionando dois antígenos diferentes presentes individualmente em células fora de alvo, por exemplo, normais, mas presentes juntos apenas nas células da doença ou condição a ser tratada) e Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5 (215) (dezembro de 2013) (que descreve células que expressam um CAR de ativação e um inibitório, tal como aquelas nas quais o CAR de ativação se liga a um antígeno expresso em células normais ou não doentes e células da doença ou condição a ser tratada, e o CAR inibitório se liga a outro antígeno expresso apenas nas células normais ou células que não se deseja tratar).

[00803] Por exemplo, em algumas modalidades, as células incluem um receptor que expressa um primeiro receptor de antígeno geneticamente modificado (por exemplo, CAR ou TCR) que é capaz de induzir um sinal de ativação ou estimulação à célula, geralmente mediante ligação específica ao antígeno reconhecido pelo primeiro receptor, por exemplo, o primeiro antígeno. Em algumas modalidades, a célula inclui

adicionalmente um segundo receptor de antígeno geneticamente modificado (por exemplo, CAR ou TCR), por exemplo, um receptor coestimulatório quimérico, que é capaz de induzir um sinal coestimulatório para a célula imune, geralmente mediante ligação específica a um segundo antígeno reconhecido pelo segundo receptor. Em algumas modalidades, o primeiro antígeno e o segundo antígeno são os mesmos. Em algumas modalidades, o primeiro antígeno e o segundo antígeno são diferentes.

[00804] Em algumas modalidades, o primeiro e/ou o segundo receptor de antígeno geneticamente modificado (por exemplo, CAR ou TCR) é capaz de induzir um sinal de ativação ou estimulação para a célula. Em algumas modalidades, o receptor inclui um componente de sinalização intracelular contendo motivos ITAM ou ITAM. Em algumas modalidades, a ativação induzida pelo primeiro receptor envolve uma transdução de sinal ou alteração na expressão de proteínas na célula, resultando no início de uma resposta imune, tal como a fosforilação de ITAM e/ou o início da cascata de transdução de sinal mediada por ITAM, formação de uma sinapse imunológica e/ou formação de cluster de moléculas próximas ao receptor ligado (por exemplo, CD4 ou CD8, etc.), ativação de um ou mais fatores de transcrição, tal como NF-κB e/ou AP-1, e/ou indução da expressão gênica de fatores como citocinas, proliferação e/ou sobrevivência.

[00805] Em algumas modalidades, o primeiro e/ou o segundo receptor incluem domínios de sinalização intracelular de receptores coestimulatórios, tal como CD28, CD137 (4-1BB), OX40 e/ou ICOS. Em algumas modalidades, o primeiro e o segundo receptor incluem um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulatório que são diferentes. Em uma modalidade, o primeiro receptor contém uma região de sinalização coestimulatória de CD28 e o segundo receptor contém uma região de sinalização coestimulatória de 4-1BB ou vice-

versa.

[00806] Em algumas modalidades, o primeiro e/ou o segundo receptor incluem um domínio de sinalização intracelular contendo ITAM ou motivos ITAM e um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulatório.

[00807] Em algumas modalidades, o primeiro receptor contém um domínio de sinalização intracelular contendo ITAM ou motivos ITAM e o segundo receptor contém um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulatório. O sinal coestimulatório em combinação com o sinal de ativação ou estimulação induzido na mesma célula é aquele que resulta em uma resposta imune, tal como uma resposta imune robusta e sustentada, tal como aumento da expressão gênica, secreção de citocinas e outros fatores, e funções efetoras mediadas célula T, tal como a morte celular.

[00808] Em algumas modalidades, nem a ligação do primeiro receptor isoladamente nem a ligação do segundo receptor isoladamente induz uma resposta imune robusta. Em alguns aspectos, se apenas um receptor estiver ligado, a célula se torna tolerada ou não responsiva a antígenos, ou inibida e/ou não é induzida a proliferar ou secretar fatores ou desempenhar funções efetoras. Em algumas dessas modalidades, no entanto, quando a pluralidade de receptores é ligada, tal como no encontro de uma célula que expressa o primeiro e o segundo antígenos, é alcançada uma resposta desejada, tal como ativação ou estimulação imune completa, por exemplo, conforme indicado pela secreção de uma ou mais citocinas, proliferação, persistência e/ou realização de uma função efetora imunológica, tal como a morte citotóxica de uma célula-alvo.

[00809] Em algumas modalidades, os dois receptores induzem, respectivamente, um sinal de ativação e inibitório para a célula, de modo que a ligação de um dos receptores ao seu antígeno ativa a cé-

lula ou induz uma resposta, mas a ligação pelo segundo receptor inibitório ao seu antígeno induz um sinal que suprime ou atenua essa resposta. Exemplos são combinações de CARs de ativação e CARs inibitórios ou iCARs. Essa estratégia pode ser usada, por exemplo, na qual o CAR de ativação liga um antígeno expresso em uma doença ou condição, mas que também é expresso em células normais, e o receptor inibitório se liga a um antígeno separado que é expresso nas células normais, mas não células da doença ou condição.

[00810] Em algumas modalidades, as células que expressam o receptor recombinante incluem adicionalmente CARs inibitórios (iCARs, vide Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5 (215) (2013), tal como um CAR que reconhece um antígeno diferente de um associado a e/ou específico para a doença ou condição pela qual um sinal de ativação entregue através do CAR alvo da doença é diminuído ou inibido pela ligação do CAR inibidor ao seu ligando, por exemplo, para reduzir os efeitos fora do alvo.

[00811] Em algumas modalidades, os dois receptores induzem, respectivamente, um sinal de ativação e inibitório à célula, de modo que a ligação de um dos receptores ao seu antígeno ativa a célula ou induz uma resposta, mas a ligação do segundo receptor inibitório ao seu antígeno induz um sinal que suprime ou atenua essa resposta. Exemplos são combinações de CARs de ativação e CARs inibitórios (iCARs). Essa estratégia pode ser usada, por exemplo, para reduzir a probabilidade de efeitos fora de alvo no contexto em que o CAR de ativação liga um antígeno expresso em uma doença ou condição, mas que também é expresso em células normais, e o receptor inibitório se liga a um antígeno separado que é expresso nas células normais, mas não nas células da doença ou condição.

[00812] Em alguns aspectos, o receptor quimérico é ou inclui um CAR inibitório (por exemplo, iCAR) e inclui componentes intracelulares

que atenuam ou suprimem uma resposta imune, tal como uma resposta promovida por ITAM e/ou coestimulatória na célula. Exemplos de tais componentes de sinalização intracelular são aqueles encontrados nas moléculas do ponto de verificação imune, incluindo PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, receptores PGE2, receptores EP2/4 de adenosina, incluindo A2AR. Em alguns aspectos, a célula manipulada geneticamente inclui um CAR inibitório, incluindo um domínio de sinalização ou derivado de uma molécula inibidora, de modo que serve para atenuar a resposta da célula, por exemplo, aquela induzida por um CAR de ativação e/ou estimulatório.

[00813] Em algumas modalidades, a estratégia de multidirecionamento é empregue em um caso em que um antígeno associado a uma doença ou condição particular é expresso em uma célula não doente e/ou é expresso na própria célula manipulada geneticamente, seja de forma transitória (por exemplo, mediante estímulo associado à manipulação genética) ou permanentemente. Nesses casos, ao exigir a ligação de dois receptores de antígeno separados e individualmente específicos, a especificidade, a seletividade e/ou a eficácia podem ser melhoradas.

[00814] Em algumas modalidades, a pluralidade de antígenos, por exemplo, o primeiro e o segundo antígenos, é expressa na célula, tecido ou doença ou condição sendo direcionada, tal como na célula cancerígena. Em alguns aspectos, a célula, tecido, doença ou condição é mieloma múltiplo ou uma célula de mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, um ou mais da pluralidade de antígenos geralmente também é expressa em uma célula que não é desejável alcançar com a terapia celular, tal como uma célula ou tecido normal ou não doente e/ou as próprias células manipuladas geneticamente. Em tais modalidades, ao exigir a ligação de múltiplos receptores para obter uma resposta da célula, é alcançada especificidade e/ou eficácia.

IV ARTIGO DE FABRICAÇÃO E KITS

[00815] Também são fornecidos artigos de fabricação, tal como kits e dispositivos, para a administração das células a objetos de acordo com os métodos fornecidos para terapia celular adotiva e para armazenamento e administração das células e composições.

[00816] Os artigos fabricados incluem um ou mais recipientes, tipicamente uma pluralidade de recipientes, material de embalagem e um rótulo ou bula ou associados ao recipiente ou aos recipientes e/ou embalagem, geralmente incluindo instruções para administração das células a um objeto.

[00817] Em algumas modalidades, são fornecidos artigos de fabricação e/ou kits que incluem uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer uma das células manipuladas geneticamente aqui descritas e instruções para administrar a um objeto para tratamento de uma doença ou condição. Em algumas modalidades, as instruções podem especificar alguns ou todos os elementos dos métodos aqui fornecidos. Em algumas modalidades, as instruções especificam instruções particulares para administração das células para terapia celular, por exemplo, doses, tempo, seleção e/ou identificação de objetos para administração e condições para administração. Em algumas modalidades, as instruções podem ser incluídas como um rótulo ou bula que acompanha as composições para administração. Em algumas modalidades, as instruções especificam determinar uma dose da composição a ser administrada, por exemplo, uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias

[00818] Os recipientes geralmente contêm as células a serem administradas, por exemplo, uma ou mais doses unitárias das mesmas. O artigo de fabricação inclui tipicamente uma pluralidade de recipientes, cada um contendo uma única dose unitária das células. A dose

unitária pode ser uma quantidade ou número das células a serem administradas ao objeto na primeira dose ou duas vezes o número (ou mais) de células a serem administradas na primeira ou em qualquer uma ou mais doses consecutivas. Pode ser a dose mais baixa ou a dose mais baixa possível das células que seriam administradas ao objeto em conexão com o método de administração. Em algumas modalidades, a dose unitária é o número mínimo de células ou número de células ou o número mínimo de unidades de referência ou as unidades de referência alvo ou unidades de referência dentro de uma faixa alvo que seriam administradas em uma dose única a qualquer objeto com uma determinada doença ou condição ou qualquer objeto, de acordo com os métodos aqui descritos.

[00819] Em algumas modalidades, o número de células na dose unitária é o número de células ou o número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de tais células de um dado fenótipo, por exemplo, células que expressam ou não expressam um ou mais marcadores são selecionadas a partir de CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, Anexina V ou caspase ativada 3, que se deseja administrar a um objeto particular em uma dose, tal como um objeto a partir do qual as células foram derivadas. Em algumas modalidades, o número de células na dose unitária é o número de células ou o número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão, frequência e/ou proporção de tais células de um dado fenótipo, por exemplo, células $CCR7^+$, $CD27^+$, CD45RA+, $CD45RA^-$, $CD4^+$, $CD8^+$, apoptose negativas (por exemplo, células Anexina V– ou Caspase 3-), ou células positivas ou negativas para um ou mais dos itens anteriores, que se deseja administrar a um objeto particular em uma dose, tal como um objeto a partir do qual as células foram derivadas.

[00820] Em algumas modalidades, o número de células na dose unitária é o número de células ou o número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão e/ou proporção de tais células de um dado fenótipo, por exemplo, $CCR7^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD8^+$, $CD27^+/CD4^+$, $CD27^+/CD8^+$, $CD45RA^+/CD4^+$, $CD45RA^+/CD8^+$, $CCR7^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD8^+$, $CD27^-/CD4^+$, $CD27^-/CD8^+$, $CD45RA^-/CD4^+$, $CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD8^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^-/CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^-/CD27^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD27^-/CD8^+$; e células negativas para marcador de apoptose (por exemplo, Anexina V- ou Caspase 3-), que se deseja administrar a um objeto particular em uma dose, tal como um objeto do qual as células foram derivadas. Em algumas modalidades, o número definido de células inclui o número de células ou o número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número, porcentagem, razão e/ou proporção de tais células de um dado fenótipo, por exemplo, $CCR7^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD8^+$, $CD27^+/CD4^+$, $CD27^+/CD8^+$, CD45RA+/$CD4^+$, CD45RA+/$CD8^+$, CCR7-/$CD4^+$, CCR7-/$CD8^+$, CD27-/$CD4^+$, CD27-/$CD8^+$, $CD45RA^-/CD4^+$, $CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD8^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^+/$ $CD45RA^-/CD8^+$, CCR7-/$CD45RA^-/CD4^+$, CCR7-/$CD45RA^-/CD8^+$, CCR7-/CD27-/$CD4^+$, CCR7-/CD27-/$CD8^+$; e células negativas para marcador de apoptose (por exemplo, Anexina V- ou Caspase 3-), e/ou qualquer subconjunto das mesmas, e que se deseja administrar a um objeto particular em uma dose, tal como um objeto do qual as células foram derivadas. Em algumas modalidades, as células foram derivadas do objeto a ser tratado pelos métodos aqui fornecidos ou em necessidade das mesmas.

[00821] Em algumas modalidades, as instruções especificam a dose ou número de células ou tipo (s) de célula e/ou uma frequência, ra-

zão e/ou porcentagem de células ou tipos de células, por exemplo, populações individuais, fenótipos ou subtipos, na composição de célula, tal como aquelas com os fenótipos de anexina V–/CCR7$^+$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CD27$^+$/CAR$^+$; anexina V–/CD27$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD27$^+$/ CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$; anexina V–/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; anexina V–/CCR7-/CD27-/CAR$^+$, anexina V–/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD4$^+$; anexina V–/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CD27$^+$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CD27$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD27$^+$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7$^+$/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD4$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD45RA$^-$/CAR$^+$/CD8$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD27-/CAR$^+$; caspase ativada 3-/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD4$^+$; e/ou caspase ativada 3-/CCR7-/CD27-/CAR$^+$/CD8$^+$; ou uma combinação dos mesmos.

[00822] Em algumas modalidades, o artigo de fabricação contém uma dose unitária de células contendo um número definido, razão ou porcentagem de células T CD8$^+$ manipuladas geneticamente que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) e/ou um número definido de células CD4$^+$ T manipuladas geneticamente que expres-

sam CCR7; e/ou uma razão definida de células T $CD8^+$ que expressam CCR7 e/ou células T $CD4^+$ que expressam CCR7. Em algumas modalidades, o artigo de fabricação contém instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou instruções para avaliar qualquer um dos fenótipos aqui descritos e/ou instruções para determinar uma dose para administração e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias. Doses unitárias exemplares de número definido, razão ou porcentagem de células que expressam CAR^+ com um fenótipo particular incluem qualquer uma como descrita ao longo desta descrição.

[00823] Em algumas modalidades, cada um dos recipientes compreende individualmente uma dose unitária das células, por exemplo, incluindo o mesmo ou substancialmente o mesmo número de células ou número de células que expressam receptores recombinantes ou que expressam CAR, ou número de células de um dado fenótipo, por exemplo, $CCR7^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD8^+$, $CD27^+/CD4^+$, $CD27^+/CD8^+$, $CD45RA^+/CD4^+$, $CD45RA^+/CD8^+$, $CCR7^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD8^+$, $CD27^-/CD4^+$, $CD27^-/CD8^+$, $CD45RA^-/CD4^+$, $CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD4^+$, $CCR7^+/CD27^+/CD8^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^+/CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^-/CD45RA^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD45RA^-/CD8^+$, $CCR7^-/CD27^-/CD4^+$, $CCR7^-/CD27^-/CD8^+$; e células negativas para marcador de apoptose (por exemplo, Anexina V ou Caspase 3-). Em algumas modalidades, cada um dos recipientes compreende individualmente uma dose unitária das células, por exemplo, incluindo o mesmo ou substancialmente o mesmo número de unidades de referência alvo ou um número de unidades de referência dentro de uma faixa alvo.

[00824] Em algumas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende um recipiente, opcionalmente um frasco que compreende

uma pluralidade de células T $CD4^+$ que expressam um receptor recombinante, e um recipiente, opcionalmente um frasco que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ que expressam um receptor recombinante. Em algumas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende um recipiente, opcionalmente um frasco que compreende uma pluralidade de células T $CD4^+$ que expressam um receptor recombinante e compreende adicionalmente, no mesmo recipiente, uma pluralidade de células T $CD8^+$ que expressam um receptor recombinante. Em algumas modalidades, um crioprotetor é incluído nas células. Em alguns aspectos, o recipiente é uma bolsa.

[00825] Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e bolsas flexíveis, tal como bolsas de infusão. Em modalidades particulares, os recipientes são bolsas, por exemplo, bolsas flexíveis, tal como aquelas adequadas para infusão de células a objetos, por exemplo, bolsas de plástico ou PVC flexíveis e/ou bolsas de solução IV. As bolsas em algumas modalidades são seláveis e/ou podem ser esterilizados, de modo a fornecer solução e entrega estéreis das células e composições. Em algumas modalidades, os recipientes, por exemplo, bolsas, têm uma capacidade de em ou cerca de ou pelo menos em ou cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, ou 1000 mL de capacidade, tal como entre em ou cerca de 10 e em ou cerca de 100 ou entre em ou cerca de 10 e em ou cerca de 500 mL de capacidade. Em algumas modalidades, os recipientes, por exemplo, bolsas, são e/ou são feitos de material que é estável e/ou fornece armazenamento e/ou manutenção estável de células a uma ou mais de várias temperaturas, tal como em temperaturas baixas, por exemplo, abaixo de em ou cerca de ou em ou cerca de -20 ºC, -80 ºC, -120 ºC, 135 ºC e/ou temperaturas adequadas para preservação de criopreservação e/ou outras temperaturas, tal como temperaturas adequadas para descongelar as células e temperatura corporal, tal

como em ou cerca de 37 ºC, por exemplo, para permitir o descongelamento, por exemplo, na localização ou localização de tratamento do objeto, por exemplo, no leito, imediatamente antes do tratamento.

[00826] Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, tal como vidro ou plástico. Em algumas modalidades, o recipiente possui uma ou mais portas, por exemplo, portas de acesso estéreis, por exemplo, para conexão de tubulação ou canulação a um ou mais tubos, por exemplo, para infusão intravenosa ou outra e/ou conexão para fins de transferência para e de outros recipientes, tal como cultura de células e/ou bolsas de armazenamento ou outros recipientes. Recipientes exemplares incluem bolsas de infusão, bolsas de solução intravenosa, frascos, incluindo aqueles com tampas de rosca perfuráveis por uma agulha para injeção.

[00827] O artigo de fabricação pode adicionalmente incluir uma bula ou rótulo com uma ou mais informações de identificação e/ou instruções de uso. Em algumas modalidades, as informações ou instruções indicam que o conteúdo pode ou deve ser usado para tratar uma condição ou doença particular e/ou fornecer instruções para as mesmas. O rótulo ou a bula pode indicar que o conteúdo do artigo de fabricação deve ser usado no tratamento da doença ou condição. Em algumas modalidades, o rótulo ou a bula fornece instruções para tratar um objeto, por exemplo, o objeto do qual as células foram derivadas, através de um método que envolve a administração de uma primeira e uma ou mais doses consecutivas das células, por exemplo, de acordo com a qualquer uma das modalidades dos métodos fornecidos. Em algumas modalidades, as instruções especificam a administração, em uma primeira dose, de uma dose unitária, por exemplo, o conteúdo de um único recipiente individual no artigo de fabricação, seguido por uma ou mais doses consecutivas em um momento especificado ou dentro de uma janela de tempo especificada e/ou após a detecção da presença

ou ausência ou quantidade ou grau de um ou mais fatores ou resultados no objeto.

[00828] Em algumas modalidades, as instruções especificam a administração de uma ou mais doses unitárias ao objeto. Em algumas modalidades, as instruções especificam a administração de uma dose determinada usando os métodos aqui fornecidos. Em algumas modalidades, as instruções especificam métodos para determinar e/ou calcular uma dose apropriada, com base na avaliação da expressão de marcadores da superfície celular.

[00829] Em algumas modalidades, o rótulo ou bula ou embalagem compreende um identificador para indicar a identidade específica do objeto a partir do qual as células são derivadas e/ou devem ser administradas. No caso de transferência autóloga, a identidade do objeto do qual as células são derivadas é a mesma que a identidade do objeto ao qual as células devem ser administradas. Assim, a informação de identificação pode especificar que as células devem ser administradas a um paciente em particular, tal como aquele de onde as células foram originalmente derivadas. Essas informações podem estar presentes no material de embalagem e/ou rótulo na forma de um código de barras ou outro identificador codificado ou podem indicar o nome e/ou outras características de identificação do objeto.

[00830] O artigo de fabricação, em algumas modalidades, inclui um ou mais, tipicamente uma pluralidade, de recipientes contendo composições que compreendem as células, por exemplo, formas individuais de dose unitária das mesmas, e incluem adicionalmente um ou mais recipientes adicionais com uma composição nela contida que inclui um agente adicional, tal como um agente citotóxico ou terapêutico, por exemplo, que deve ser administrado em combinação, por exemplo, simultânea ou sequencialmente em qualquer ordem, com as células. Alternativa ou adicionalmente, o artigo de fabricação pode adicional-

mente incluir outro ou o mesmo recipiente compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável. Ele pode adicionalmente incluir outros materiais, tal como outros tampões, diluentes, filtros, tubos, agulhas e/ou seringas.

[00831] O termo "bula" é usado para se referir às instruções normalmente incluídas nas embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informações sobre as indicações, uso, dosagem, administração, terapia combinada, contraindicações e/ou avisos sobre o uso de tais produtos terapêuticos.

[00832] Em algumas modalidades, os artigos de fabricação e/ou kits incluem adicionalmente um ou mais reagentes para analisar amostras biológicas, por exemplo, amostras biológicas de objetos candidatos à administração ou aos quais a terapia foi administrada e, opcionalmente, instruções de uso dos reagentes ou ensaios. Em algumas modalidades, o artigo de fabricação e/ou kits contêm reagentes para medir o nível de marcadores fenotípicos particulares, por exemplo, CD4, CD8, CCR7, CD27 e/ou CD45RA, e marcadores particulares indicativos de apoptose, tal como clivagem da Anexina V e/ou caspase 3 e instruções para medição. Em algumas modalidades, a amostra biológica é ou é obtida de uma amostra de sangue, plasma ou soro. Em algumas modalidades, os reagentes podem ser utilizados antes da administração da terapia celular ou após a administração da terapia celular, para fins de diagnóstico, para identificar objetos e/ou avaliar os resultados do tratamento e/ou toxicidades. Por exemplo, em algumas modalidades, o artigo de fabricação e/ou kits contêm adicionalmente reagentes para medir o nível de marcadores de superfície celular particulares ou outros marcadores que estão associados à toxicidade e instruções para medição. Em algumas modalidades, os reagentes incluem componentes para a realização de um ensaio *in vitro* para medir os marcadores da superfície celular ou outros marcadores, tal como um imunoen-

saio, um ensaio baseado em aptâmero, um ensaio histológico ou citológico ou um ensaio de nível de expressão de mRNA. Em algumas modalidades, o ensaio *in vitro* é selecionado a partir de um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), imunotransferência, imunoprecipitação, radioimunoensaio (RIA), imunocoloração, ensaio de citometria de fluxo, ressonância plasmônica de superfície (SPR), ensaio de quimioluminescência, imunoensaio de fluxo lateral, ensaio de inibição e ensaio de avidez. Em alguns aspectos, o reagente é um reagente de ligação que liga especificamente os marcadores da superfície celular ou outros marcadores. Em alguns casos, o reagente de ligação é um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, um aptâmero ou uma sonda de ácido nucleico. Em algumas modalidades, os reagentes incluem reagentes para detectar expressão e/ou presença de marcadores como CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, Anexina V ou caspase ativada 3.

V. DEFINIÇÕES

[00833] A menos que definido de outra forma, todos os termos da técnica, notações e outros termos ou terminologia técnica e científica usados neste documento têm o mesmo significado que é comumente entendido por um versado na técnica a qual a matéria reivindicada pertence. Em alguns casos, termos com significados comumente entendidos são aqui definidos para maior clareza e/ou referência imediata, e a inclusão de tais definições aqui não deve necessariamente ser interpretada como representando uma diferença substancial em relação ao que é geralmente entendido na técnica.

[00834] Conforme usado neste documento, as formas singulares "a", "o", "uma" e "um" incluem referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Por exemplo, "a", "o", "uma" e "um" significam "pelo menos um" ou "um ou mais". Entende-se que aspectos e variações aqui descritos incluem "consistindo" e/ou "consis-

tindo essencialmente em" aspectos e variações.

[00835] Ao longo desta descrição, vários aspectos da matéria reivindicada são apresentados em um formato de faixa. Deve-se entender que a descrição no formato de faixa é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo da matéria reivindicada. Por conseguinte, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todas as subfaixas possíveis, bem como valores numéricos individuais dentro dessa faixa. Por exemplo, quando uma faixa de valores é fornecida, entende-se que cada valor intermediário, entre o limite superior e inferior dessa faixa e qualquer outro valor declarado ou interveniente nessa faixa declarada, é abrangido pela matéria reivindicada. Os limites superior e inferior dessas faixas menores podem ser incluídos independentemente nas faixas menores, e também estão englobados na matéria reivindicada, sujeitos a qualquer limite excluído especificamente na faixa indicada. Quando a faixa declarada inclui um ou ambos os limites, as faixas excluindo um ou ambos os limites incluídos também são incluídas na matéria reivindicada. Isso se aplica independentemente da amplitude da faixa.

[00836] O termo "cerca de", conforme usado neste documento, refere-se à faixa de erro usual para o respectivo valor prontamente conhecido pelo especialista neste campo técnico. A referência a "cerca de" um valor ou parâmetro neste documento inclui (e descreve) modalidades que são direcionadas a esse valor ou parâmetro per se. Por exemplo, a descrição referente a "cerca de X" inclui a descrição de "X".

[00837] Como aqui utilizado, a recitação de que as posições de nucleotídeos ou aminoácidos "correspondem a" posições de nucleotídeos ou aminoácidos em uma sequência divulgada, tal como estabelecido na Listagem de Sequências, refere-se a posições de nucleotídeos ou aminoácidos identificados após o alinhamento com a sequência divul-

gada para maximizar a identidade usando um algoritmo de alinhamento padrão, tal como o algoritmo GAP. Ao alinhar as sequências, um especialista na técnica pode identificar resíduos correspondentes, por exemplo, usando resíduos de aminoácidos conservados e idênticos como guias. Em geral, para identificar posições correspondentes, as sequências de aminoácidos são alinhadas para que seja obtida a correspondência de mais alta ordem (vide, por exemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nova Iorque, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., e Griffin, H.G., eds., Humana Press, New.Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; e Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nova Iorque, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

[00838] O termo "vetor", tal como usado aqui, refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de propagar outro ácido nucleico ao qual está ligado. O termo inclui o vetor como uma estrutura de ácido nucleico autorreplicante, bem como o vetor incorporado no genoma de uma célula hospedeira na qual foi introduzido. Certos vetores são capazes de direcionar a expressão de ácidos nucleicos aos quais eles estão operacionalmente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão". Entre os vetores estão vetores virais, tal como retrovirais, por exemplo, vetores gama-retrovirais e lentivirais.

[00839] Os termos "célula hospedeira", "linhagem celular hospedeira" e "cultura de células hospedeiras" são usados de forma intercambiável e se referem a células nas quais o ácido nucleico exógeno foi introduzido, incluindo a progênie de tais células. As células hospedeiras incluem "transformantes" e "células transformadas", que incluem a célula primária transformada e a progênie delas derivadas, sem levar

em consideração o número de passagens. A progênie pode não ser completamente idêntica no conteúdo de ácido nucleico a uma célula parental, mas pode conter mutações. A progênie mutante que tem a mesma função ou atividade biológica como rastreada ou selecionada na célula originalmente transformada está incluída aqui.

[00840] Como aqui utilizado, uma declaração de que uma célula ou população de células é "positiva" para um marcador particular refere-se à presença detectável na célula ou dentro de um marcador particular, tipicamente um marcador de superfície. Quando se refere a um marcador de superfície, o termo refere-se à presença de expressão da superfície como detectada por citometria de fluxo, por exemplo, por coloração com um anticorpo que se liga especificamente ao marcador e detecção do referido anticorpo, em que a coloração é detectável por citometria de fluxo em um nível substancialmente acima da coloração detectada executando o mesmo procedimento com um controle compatível com isotipo sob condições idênticas e/ou em um nível substancialmente semelhante ao da célula que se sabe ser positiva para o marcador e/ou em um nível substancialmente mais alto do que para uma célula que se sabe ser negativa para o marcador.

[00841] Como aqui utilizado, uma declaração de que uma célula ou população de células é "negativa" para um marcador particular refere-se à ausência de presença detectável substancial em ou na célula de um marcador particular, tipicamente um marcador de superfície. Quando se refere a um marcador de superfície, o termo refere-se à ausência de expressão da superfície como detectada por citometria de fluxo, por exemplo, por coloração com um anticorpo que se liga especificamente ao marcador e detecção do referido anticorpo, em que a coloração não é detectada pela citometria de fluxo em um nível substancialmente acima da coloração detectada executando o mesmo procedimento com um controle compatível com isótipo em condições

idênticas, e/ou em um nível substancialmente mais baixo do que o da célula conhecida como positiva para o marcador e/ou em um nível substancialmente semelhante ao de uma célula conhecida como negativa para o marcador.

[00842] Como usado aqui, "porcentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" e "porcentagem de identidade" quando usado em relação a uma sequência de aminoácidos (sequência polipeptídica de referência) são definidas como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata (por exemplo, o anticorpo ou fragmento em questão) que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência polipeptídica de referência, depois de alinhar as sequências e introduzir lacunas, se necessário, para alcançar a identidade percentual máxima da sequência e sem considerar substituições conservadoras como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da porcentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser alcançado de várias maneiras dentro da especialidade na técnica, por exemplo, usando software de computador disponível publicamente, tal como o software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os especialistas na técnica podem determinar parâmetros apropriados para o alinhamento de sequências, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências sendo comparadas.

[00843] Uma substituição de aminoácido pode incluir a substituição de um aminoácido em um polipeptídeo por outro aminoácido. A substituição pode ser uma substituição conservadora de aminoácidos ou uma substituição não conservadora de aminoácidos. As substituições de aminoácidos podem ser introduzidas em uma molécula de ligação, por exemplo, anticorpo de interesse e os produtos triados quanto a uma atividade desejada, por exemplo, ligação a antígeno reti-

da/aperfeiçoada, imunogenicidade reduzida ou ADCC ou CDC aperfeiçoado.

[00844] Os aminoácidos geralmente podem ser agrupados de acordo com as seguintes propriedades comuns da cadeia lateral:

(1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácido: Asp, Glu;

(4) básico: His, Lys, Arg;

(5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro;

(6) aromati c: Trp, Tyr, Phe.

[00845] Em algumas modalidades, as substituições conservadoras podem envolver a troca de um membro de uma dessas classes por outro membro da mesma classe. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos não conservadoras podem envolver a troca de um membro de uma dessas classes por outra classe.

[00846] Como usado aqui, uma composição refere-se a qualquer mistura de dois ou mais produtos, substâncias ou compostos, incluindo células. Pode ser uma solução, uma suspensão, líquido, pó, uma pasta, aquosa, não aquosa ou qualquer combinação dos mesmos.

[00847] Como usado aqui, um "objeto" é um mamífero, tal como um humano ou outro animal, e tipicamente é humano.

VI MODALIDADES EXEMPLARES

[00848] Entre as modalidades fornecidas, estão:

[00849] 1. Composição terapêutica compreendendo células T que expressam um receptor recombinante, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos

para superfície para CCR7 e/ou CD27.

[00850] 2. A composição terapêutica da modalidade 1, em que pelo menos em ou cerca de, ou pelo menos ou cerca de 50% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

[00851] 3. A composição terapêutica da modalidade 1, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 60% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

[00852] 4. A composição terapêutica da modalidade 1, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

[00853] 5. A composição terapêutica da modalidade 1, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 80% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

[00854] 6. A composição terapêutica de qualquer uma das modalidades 1-5, em que:

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD4^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$ e $CD4^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor

recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD4^+$; e/ou

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em aproximadamente 1:1 ou aproximadamente entre 1:3 e 3:1 ou aproximadamente entre 1:2 e 2:1, células T $CD4^+$:$CD8^+$.

[00855] 7. Composição terapêutica compreendendo células T que expressam um receptor recombinante, em que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente em que:

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD4^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$ e $CD4^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de

30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD4^+$; e/ou

as células T na composição e/ou expressando o receptor recombinante compreendem ou consistem em aproximadamente 1:1 ou aproximadamente entre 1:3 e 3:1 ou aproximadamente entre 1:2 e 2:1, células T $CD4^+$:$CD8^+$.

[00856] 8. A composição terapêutica de qualquer uma das modalidades 1-7, o número total de células T na composição ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7.

[00857] 9. A composição terapêutica de qualquer uma das modalidades 1-7, o número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição expressando o receptor recombinante são positivos para superfície para CD27.

[00858] 10. A composição terapêutica de qualquer uma das modalidades 1-7, o número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e CD27.

[00859] 11. A composição de qualquer uma das modalidades 1-10, em que a composição compreende uma ou mais doses unitárias de células.

[00860] 12. A composição de qualquer uma das modalidades 1-11,

em que a dose unitária ou composição compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD4^+$), células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais, receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais ou receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais, cada uma

inclusive e/ou

em que a dose unitária ou composição compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais.

[00861] 13. A composição de qualquer uma das modalidades 1-12, em que a composição ou dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

[00862] 14. A composição de qualquer uma das modalidades 1-13, em que a composição ou dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00863] 15. A composição de qualquer uma das modalidades 1-14, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na composição ou dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de

30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na composição ou unidade a dose é receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na composição ou dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na composição ou dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[00864] 16. A composição de qualquer uma das modalidades 1-15, em que a dose unitária de células ou composição compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00865] 17. A composição da modalidade 16, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD27 e/ou CD45RA nas células.

[00866] 18. A composição da modalidade 16 ou modalidade 17, em que o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CD27 e/ou CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente são células CD27$^+$ ou CD45RA$^-$.

[00867] 19. A composição de qualquer uma das modalidades 1-15, em que a dose unitária de células ou composição compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00868] 20. A composição da modalidade 19, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CCR7 e/ou CD45RA nas células.

[00869] 21. A composição da modalidade 19 ou modalidade 20, em

que o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CCR7 e/ou CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente é CCR7$^+$ ou CD45RA$^-$.

[00870] 22. A composição de qualquer uma das modalidades 1-21, em que a dose unitária de células ou composição compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00871] 23. A composição de qualquer uma das modalidades 1-21, em que a dose unitária de células ou composição compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00872] 24. A composição de qualquer uma das modalidades 1-23, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou composição, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou as composições são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00873] 25. A composição de qualquer uma das modalidades 1-24, em que a dose unitária ou número de células que expressam o receptor recombinante compreende entre pelo menos 1 x 10^5 e pelo ou cerca de 5 x 10^8, entre pelo menos 1 x 10^5 e pelo ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD3$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD3$^+$) ou células CD3$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00874] 26. A composição de qualquer uma das modalidades 1-24, em que a dose unitária ou número de células que expressam o receptor recombinante compreende não mais do que cerca de 5 x 10^8, não

mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD3$^+$ totais ou células CD3$^+$ totais.

[00875] 27. A composição de qualquer uma das modalidades 1-26, em que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis.

[00876] 28. A composição de qualquer uma das modalidades 1-27, em que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número de tais células totais que não expressam um marcador apoptótico e/ou é o número total de tais células que são negativas (-) para marcador apoptótico, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[00877] 29 A composição de qualquer uma das modalidades 1-28, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante.

[00878] 30. A composição de qualquer uma das modalidades 1-29, em que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

[00879] 31. A composição da modalidade 30, em que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer.

[00880] 32. A composição da modalidade 30 ou modalidade 31, em que o antígeno-alvo é um antígeno tumoral.

[00881] 33. A composição de qualquer uma das modalidades 30-32, em que o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecido como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/ testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina de motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor de fator de crescimento epidérmico do tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo 5 do receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitá-

rio humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de Membro D do Grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma preferivelmente expresso (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA) antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor tirosina quinase tipo órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[00882] 34. A composição de qualquer uma das modalidades 1-33, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

[00883] 35. A composição de qualquer uma das modalidades 1-34, em que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[00884] 36. A composição de qualquer uma das modalidades 1-35, em que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular

compreendendo um domínio de ligação a antígeno.

[00885] 37. A composição da modalidade 36, em que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

[00886] 38. A composição da modalidade 37, em que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

[00887] 39. A composição da modalidade 37 ou modalidade 38, em que o fragmento compreende um scFv.

[00888] 40. A composição de qualquer uma das modalidades 1-39, em que o receptor recombinante compreende uma região de sinalização intracelular.

[00889] 41. A composição da modalidade 40, em que a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular.

[00890] 42. A composição da modalidade 41, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[00891] 43. A composição da modalidade 42, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

[00892] 44. A composição de qualquer uma das modalidades 40-43, em que o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região

de sinalização intracelular.

[00893] 45. A composição de qualquer uma das modalidades 40-44, em que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

[00894] 46. A composição da modalidade 45, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

[00895] 47. A composição da modalidade 45 ou modalidade 46, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

[00896] 48. A composição de qualquer uma das modalidades 45-47, em que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[00897] 49. A composição de qualquer uma das modalidades 1-48, em que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

[00898] 50. A composição de qualquer uma das modalidades 1-49, em que as células T são alogênicas para o objeto.

[00899] 51. A composição de qualquer uma das modalidades 1-50, em que as células T são alogênicas para o objeto.

[00900] 52. Artigo de fabricação, compreendendo um recipiente compreendendo uma composição de qualquer uma das modalidades 1-51, e instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias do mesmo e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00901] 53. Artigo de fabricação, que compreende:

um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitá-

rias de células, presentes em uma ou mais composições terapêuticas, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ expressando (opcionalmente manipuladas geneticamente para expressar) um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam (opcionalmente expressam superfície) receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00902] 54. Artigo de fabricação, que compreende:

um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitárias de células, presentes em uma ou mais composições terapêuticas, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ expressando (opcionalmente manipuladas geneticamente para expressar) um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam (opcionalmente expressam superfície) um cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de

células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00903] 55. O artigo de fabricação da modalidade 53 ou modalidade 54, em que a dose unitária de células compreende a composição de qualquer uma das modalidades 1-51.

[00904] 56. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 53-55, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CCR7$^+$; e/ou em que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD4$^+$/CCR7$^+$.

[00905] 57. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 53-55, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CD27$^+$; e/ou em que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD4$^+$/CD27$^+$.

[00906] 58. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 52-57,

em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD8$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD8$^+$) ou células CD4$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD4$^+$), células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais, ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive e/ou

em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca

de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

[00907] 59. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-58, em que a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

[00908] 60. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-59, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00909] 61. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-60, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária,

ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[00910] 62. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 51-56 e 58-61, em que a dose unitária de células ou composição compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00911] 63. O artigo de fabricação da modalidade 62, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD27 e/ou CD45RA nas células.

[00912] 64. O artigo de fabricação da modalidade 62 ou modalidade 63, em que o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CD27 e/ou CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente são células CD27$^+$ ou CD45RA$^-$.

[00913] 65. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 51-55 e 57-61, em que a dose unitária de células ou composição compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00914] 66. O artigo de fabricação da modalidade 65, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CCR7 e/ou CD45RA nas células.

[00915] 67. O artigo de fabricação da modalidade 65 ou modalidade 66, em que o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CCR7 e/ou CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente é CCR7$^+$ ou CD45RA$^-$.

[00916] 68. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 51-67, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00917] 69. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 51-67, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00918] 70. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 51-69, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00919] 71. Artigo de fabricação, que compreende:

um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitárias de células, presentes em uma ou mais composições terapêuticas, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ expressando, opcionalmente manipuladas geneticamente para expressar, um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (receptor$^+$/Células CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro

subconjunto de células na composição; e

instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00920] 72. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63, 64 e 66-71, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$.

[00921] 73. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63, 64 e 66-71, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$.

[00922] 74. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63, 64 e 66-73, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre 1×10^6 e 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD4^+$), células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais ou receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais células, cada uma inclusive.

[00923] 75. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63, 64 e 66-74, em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais do que cerca de 5×10^5 células receptor$^+$/$CD8^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais.

[00924] 76. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63, 64 e 66-75, em que a dose unitária compreende pelo menos

cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[00925] 77. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63. 64 e 66-76, em que a dose unitária compreende entre cerca de 3 x 10^6 e cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00926] 78. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63, 64 e 66-77, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60 %, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[00927] 79. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 63, 64 e 66-78, em que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão opcional é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00928] 80. O artigo de fabricação da modalidade 79, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD45RA nas células.

[00929] 81. O artigo de fabricação da modalidade 79 ou modalidade

80, em que o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente é células $CD45RA^-$.

[00930] 82. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52, 53, 55, 56, 58-64 e 66-81, em que entre uma pluralidade de artigos ou doses unitárias, opcionalmente produzidos de acordo com o mesmo método, o número ou razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária não variam mais que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[00931] 83. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-82, em que a dose unitária ou número de células que expressam o receptor recombinante compreende entre pelo menos 1×10^5 e pelo ou cerca de 5×10^8, entre pelo menos 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD3^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD3^+$) ou células $CD3^+$ totais, cada uma inclusive.

[00932] 84. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 52-83, em que a dose unitária ou número de células que expressam o receptor recombinante compreende não mais do que cerca de 5×10^8, não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais do que cerca de 5×10^5 células $receptor^+/CD3^+$ totais ou células $CD3^+$ totais.

[00933] 85. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-84, em que o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número total de $receptor^+/CD8^+/$

CCR7$^+$ células, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis.

[00934] 86. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-85, em que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de receptores + Células/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número tais células totais que não expressam um marcador apoptótico e/ou é o número tais células totais que são negativas para marcador apoptótico (-), em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[00935] 87. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-86, em que as instruções especificam administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

[00936] 88. O artigo de fabricação da modalidade 87, em que a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$.

[00937] 89. O artigo de fabricação da modalidade 88, em que a primeira composição compreende as células T $CD8^+$.

[00938] 90. O artigo de fabricação da modalidade 88, em que a primeira composição compreende as células T $CD4^+$.

[00939] 91. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 88-90, em que as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, no máximo 15 minutos, no máximo mais de 10 minutos ou não mais de 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

[00940] 92. Artigo de fabricação de qualquer modalidade 88-91, em que as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00941] 93. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 88-92, em que as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração a composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias das mesmas e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[00942] 94. O artigo de fabricação de qualquer uma das modalidades 52-93, em que o receptor recombinante é ou compreende um re-

ceptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante.

[00943] 95. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-94, em que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

[00944] 96. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 95, em que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer.

[00945] 97. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 95 ou modalidade 96, em que o antígeno-alvo é um antígeno tumoral.

[00946] 98. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 95-97, em que o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecido como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, Ligando 1 de quimiocina de motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), proteína do fator de crescimento epidérmico truncado (tEGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo do receptor Fc 5 ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangli oside GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), receptor 5D acoplado à proteína G (GPCR5D), Her2/neu (re-

ceptor tirosina-quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão celular L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno do melanoma (PRAME), receptor de progesterona expresso preferivelmente, antígeno específico de próstata, antígeno de células-tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), tirosina quinase de receptor tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), receptor do fator de crescimento endotelial vascular(VEGFR), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), tumor 1 de Wilms (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[00947] 99. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-98, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

[00948] 100. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-99, em que o receptor recombinante é um re-

ceptor de antígeno quimérico (CAR).

[00949] 101. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-100, em que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno.

[00950] 102. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 101, em que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

[00951] 103. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 102, em que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

[00952] 104. Artigo de fabricação ou composição da modalidade 102 ou modalidade 103, em que o fragmento compreende um scFv.

[00953] 105. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-104, em que o receptor recombinante compreende uma região de sinalização intracelular.

[00954] 106. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 105, em que a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular.

[00955] 107. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 106, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[00956] 108. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 107, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcional-

mente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

[00957] 109. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-108, em que o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

[00958] 110. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-109, em que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

[00959] 111. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 110, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

[00960] 112. O artigo de fabricação ou composição da modalidade 110 ou modalidade 111, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

[00961] 113. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 110-112, em que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[00962] 114. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-113, em que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

[00963] 115. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-114, em que as células T são alogênicas para o objeto.

[00964] 116. O artigo de fabricação ou composição de qualquer uma das modalidades 1-114, em que as células T são alogênicas para

o objeto.

[00965] 117. Um método de tratamento, compreendendo a administração a um objeto tendo uma doença ou condição de uma ou mais doses unitárias de uma composição terapêutica da modalidade 1 ou modalidade 7 ou uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, opcionalmente em que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição; e/ou

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária variam em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[00966] 118. O método da modalidade 117, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+$.

[00967] 119. O método da modalidade 117, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+$.

[00968] 120. Um método de tratamento, compreendendo a administração a um objeto tendo uma doença ou condição de uma ou mais doses unitárias de uma composição terapêutica da modalidade 1 ou modalidade 7, ou uma composição terapêutica compreendendo uma

pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, opcionalmente em que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; e/ou

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CD27 (células $CD27^+$) na dose unitária varia não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[00969] 121. O método da modalidade 120, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CD27^+$.

[00970] 122. O método da modalidade 120, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CD27^+$.

[00971] 123. O método de qualquer uma das modalidades 117-122, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou célula $CD4^+$ total que expressa o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou

células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00972] 124. O método de qualquer uma das modalidades 117-123, em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6, ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

[00973] 125. O método de qualquer uma das modalidades 117-124, em que a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

[00974] 126. O método de qualquer uma das modalidades 117-125, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7 entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00975] 127. O método de qualquer uma das modalidades 117-126, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$

totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[00976] 128. O método de qualquer uma das modalidades 117-119 e 123-127, em que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00977] 129. O método de qualquer uma das modalidades 117-119 e 123-128, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD27 e/ou CD45RA nas células.

[00978] 130. O método de qualquer uma das modalidades 120-127, em que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00979] 131. O método de qualquer uma das modalidades 120-127 e 130, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CCR7 e/ou CD45RA nas células.

[00980] 132. O método da modalidade 131, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00981] 133. O método de qualquer uma das modalidades 129, 131 ou 132, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00982] 134. O método da modalidade 131, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00983] 135. O método de qualquer uma das modalidades 129, 131 ou 132, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

[00984] 136. Um método de tratamento, o método compreendendo administrar a um objeto tendo uma doença ou condição uma ou mais doses unitárias de uma composição da modalidade 1 ou modalidade 7.

[00985] 137. O método da modalidade 136, em que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células

CCR7$^+$) na dose unitária variam em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[00986] 138. Um método de tratamento, o método compreendendo administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, em que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células CCR7$^+$) na dose unitária variam em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[00987] 139. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-138, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[00988] 140. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-138, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[00989] 141. O método de qualquer uma das modalidades 129 e

131-140, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/$CD4^+$), receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais, ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais/$CCR7^+$/$CD27^+$, cada uma inclusive.

[00990] 142. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-141, em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6, ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/$CD8^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais, células receptor$^+$/ $CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/ $CD27^+$ totais.

[00991] 143. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-142, em que a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais.

[00992] 144. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-143, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais; e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais, cada uma inclu-

sive.

[00993] 145. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-144, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[00994] 146. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-145, em que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[00995] 147. O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-146, em que o número ou razão definido é adicionalmente baseado na expressão ou ausência de expressão de CD45RA nas células.

[00996] 148. T O método de qualquer uma das modalidades 129 e 131-147, em que o número definido de células adicionalmente expressa ou não expressa CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente é células CD45RA$^-$.

[00997] 149. O método de qualquer uma das modalidades 117-148, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^8, entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8 entre ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD3$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD3$^+$) ou células CD3$^+$ totais, cada uma inclusive.

[00998] 150. O método de qualquer uma das modalidades 117-149, em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 5 x 10^8,

não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD3$^+$ totais ou células CD3$^+$ totais.

[00999] 151. O método de qualquer uma das modalidades 117-150, em que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis.

[001000] 152. O método de qualquer uma das modalidades 117-151, em que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número tais células totais que não expressam um marcador apoptótico e/ou é o número tais células totais que são negativas (-) para marcadores apoptóticos, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[001001] 153. O método de qualquer uma das modalidades 117-152, compreendendo a administração de uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

[001002] 154. O método de qualquer uma das modalidades 117-153, em que a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T $CD8^+$ e as células T $CD4^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T $CD8^+$ e o $CD4^+$ T células.

[001003] 155. O método da modalidade 154, em que a primeira composição compreende as células T $CD8^+$.

[001004] 156. O método da modalidade 154, em que a primeira composição compreende as células T $CD4^+$.

[001005] 157. O método de qualquer uma das modalidades 154-156, que compreende a administração da composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, no máximo 15 minutos, no máximo 10 minutos ou não mais de 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

[001006] 158. O método de qualquer uma das modalidades 154-157, que compreende a administração da composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias das mesmas e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[001007] 159. O método de qualquer uma das modalidades 154-158, que compreende a administração da composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses uni-

tárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[001008] 160. O método de qualquer uma das modalidades 117-159, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante.

[001009] 161. O método de qualquer uma das modalidades 117-160, em que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

[001010] 162. O método da modalidade 161, em que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer.

[001011] 163. O método da modalidade 161 ou modalidade 162, em que o antígeno-alvo é um antígeno tumoral.

[001012] 164. O método de qualquer uma das modalidades 161-163, em que o antígeno-alvo é escolhido de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando de quimiocina Motivo C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor de Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo de receptor de Fc 5 ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação de folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2

O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão a células neurais (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno expresso preferivelmente melanoma (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), tirosina quinase de receptor tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecido como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), tumor 1 de Wilms (WT-1), antígeno específico de patógeno, ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[001013] 165. O método de qualquer uma das modalidades 117-164, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

[001014] 166. O método de qualquer uma das modalidades 117-165, em que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[001015] 167. O método de qualquer uma das modalidades 117-166, em que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno.

[001016] 168. O método da modalidade 167, em que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

[001017] 169. O método da modalidade 168, em que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

[001018] 170. O método da modalidade 168 ou modalidade 169, em que o fragmento compreende um scFv.

[001019] 171. O método de qualquer uma das modalidades 117-161, em que o receptor recombinante compreende uma região de sinalização intracelular.

[001020] 172. O método da modalidade 171, em que a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular.

[001021] 173. O método da modalidade 172, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente de receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[001022] 174. O método da modalidade 173, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização

intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

[001023] 175. O método de qualquer uma das modalidades 117-174, em que o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

[001024] 176. O método de qualquer uma das modalidades 117-175, em que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

[001025] 177. O método da modalidade 176, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

[001026] 178. O método da modalidade 176 ou modalidade 177, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

[001027] 179. O método de qualquer uma das modalidades 176-178, em que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[001028] 180. O método de qualquer uma das modalidades 117-179, em que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

[001029] 181. O método de qualquer uma das modalidades 117-180, em que as células T são alogênicas para o objeto.

[001030] 182. O método de qualquer uma das modalidades 117-180, em que as células T são alogênicas para o objeto.

[001031] 183. Método para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente para tratar um objeto, o método compreendendo:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 ($receptor^+/CCR7^+$);

(b) com base no número, porcentagem ou razão de células $receptor^+/CCR7^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001032] 184. Método para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente para tratar um objeto, o método compreendendo:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CD27 ($receptor^+/CD27^+$); e

(b) com base no número, porcentagem ou razão de células $receptor^+/CD27^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam cluster de

diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001033] 185. Método para produzir uma composição compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, o método compreendendo:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e/ou CD27 (receptor$^+$/CCR7$^+$ e/ou receptor$^+$/CD27$^+$); e

(b) encher um recipiente com toda ou uma porção da composição e, opcionalmente, outra solução para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição ou um número definido de CD8$^+$ T que expressam receptores recombinantes células que expressam cluster de diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (célu-

las receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001034] 186. Método para produzir uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, o método compreendendo preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que se liga especificamente um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001035] 187. Método para produzir uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, o método compreendendo preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que se liga especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam cluster de diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um nú-

mero definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001036] 188. O método de qualquer uma das modalidades 184-187, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+$.

[001037] 189. O método de qualquer uma das modalidades 184-188, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+$.

[001038] 190. O método de qualquer uma das modalidades 184-189, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou célula $CD4^+$ total que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive.

[001039] 191. O método de qualquer uma das modalidades 184-180, em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais do que cerca de 5×10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais.

[001040] 192. O método de qualquer uma das modalidades 184-191,

em que a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

[001041] 193. O método de qualquer uma das modalidades 184-192, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7 entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[001042] 194. O método de qualquer uma das modalidades 184-193, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% de células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

[001043] 195. O método de qualquer uma das modalidades 184-194, em que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$,

cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[001044] 196. O método de qualquer uma das modalidades 184-195, em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células $CD27^+$ ou $CD45RA^-$.

[001045] 197. O método de qualquer uma das modalidades 184-196, compreendendo adicionalmente avaliar na composição terapêutica o número, porcentagem ou razão de células T que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45RA, opcionalmente o número, porcentagem ou razão de células T que são $CD27^+$ ou $CD45RA^-$.

[001046] 198. O método da modalidade 196 ou modalidade 197, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

[001047] 199. O método da modalidade 196 ou modalidade 197, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

[001048] 200. O método de qualquer uma das modalidades 196-199, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais a dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, do receptor total + células na dose unitária são $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

[001049] 201. Método para determinar uma dose unitária de células

T manipuladas geneticamente para tratar um objeto, o método compreendendo:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e CD27 ($receptor^+/CCR7^+/CD27^+$);

(b) com base no número, porcentagem ou razão de células $receptor^+/CCR7^+/CD27^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de recombinantes células T $CD8^+$ que expressam receptores que expressam CCR7 e CD27 (células $+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001050] 202. Método para produzir uma composição compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, o método compreendendo:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e CD27 ($receptor^+/CCR7^+/CD27^+$); e

(b) preencher um recipiente com toda ou uma porção da composição e, opcionalmente, outra solução para alcançar uma dose

unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001051] 203. Método para produzir uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, o método compreendendo preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que se liga especificamente um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ que expressam receptores recombinantes que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+$/Células $CCR7^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001052] 204. O método de qualquer uma das modalidades 201-203, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$.

[001053] 205. O método de qualquer uma das modalidades 201-203,

em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$.

[001054] 206. O método de qualquer uma das modalidades 201-205, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células +/$CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células +/$CD4^+$), células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais/$CCR7^+$/$CD27^+$, cada uma inclusive.

[001055] 207. O método de qualquer uma das modalidades 201-206, em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1×10^8, não mais do que cerca de 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais do que cerca de 5×10^5 células receptor$^+$/$CD8^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais.

[001056] 208. O método de qualquer uma das modalidades 201-207, em que a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 receptor total de células +/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou pelo menos cerca de 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6 ou 1×10^7 total células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$.

[001057] 209. O método de qualquer uma das modalidades 201-208, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times 10^7$, entre em ou cerca de 4×10^6 e em ou cerca de 2×10^7, ou entre em ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3×10^6 e em ou cerca de $2{,}5 \times 10^7$, entre em ou cerca de 4×10^6 e em ou cerca de 2×10^7, ou entre em ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de

1 x 10^7 receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[001058] 210. O método de qualquer uma das modalidades 201-209, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% do receptor total + células na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[001059] 211. O método de qualquer uma das modalidades 201-210, em que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[001060] 212. O método de qualquer uma das modalidades 201-211, em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células CD45RA$^-$.

[001061] 213. O método de qualquer uma das modalidades 201-212, compreendendo adicionalmente avaliar na composição terapêutica o número, porcentagem ou razão de células T que expressam ou não expressam CD45RA, opcionalmente o número, porcentagem ou razão de células T que são CD45RA$^-$.

[001062] 214. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, o método compreendendo:

i) fornecer, a partir de uma amostra biológica de um objeto, uma composição de entrada compreendendo uma porcentagem alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7,

CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou fazem não expressar CCR7, CD27 e/ou CD45RA;

ii) introduzir, na composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante; e

iii) estimular as células na composição de entrada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, em que a estimulação compreende incubar as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, os referidos resultados estimulantes na ativação e/ou proliferação das células;

em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/$CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[001063] 215. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, o método compreendendo introduzir, em uma composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, em que a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA fornecidos a partir de uma amostra biológica de um objeto, e a composição de entrada é estimulada antes de, durante e/ou subsequente à referida introdução por incubação das células na presença de um ou mais agentes estimulantes, a referida estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células; e em que o

método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[001064] 216. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, o método compreendendo:

i) isolar, a partir de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um número alvo de células T CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, gerando assim uma composição de entrada;

ii) introduzir, na composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante; e

iii) estimular as células na composição de entrada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, em que a estimulação compreende incubar as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, os referidos resultados estimulantes na ativação e/ou proliferação das células;

em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um razão definida de células T receptor$^+$/CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7,

CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[001065] 217. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, o método compreendendo introduzir, em uma composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, em que a composição de entrada é gerada pelo isolamento, a partir de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um número alvo de células T CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, e a composição de entrada é estimulada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, incubando as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, a referida estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células; e em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

[001066] 218. O método de qualquer uma das modalidades 214-217, em que a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T CD4$^+$ que expressam ou não expresse CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

[001067] 219. O método de qualquer uma das modalidades 214-217, em que a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo

de $CD4^+/CCR7^+$, $CD4^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$, células $CD8^+/CCR7^+$, $CD8^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$.

[001068] 220. O método de qualquer uma das modalidades 214-219, em que a composição de saída compreende uma razão definida de $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$, para $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$ células; ou

uma razão definida de $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA+$ células e/ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA+$ células para outro subconjunto de células na composição.

[001069] 221. O método de qualquer uma das modalidades 214-219, compreendendo adicionalmente determinar uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula T para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende toda ou uma porção da composição de saída que compreende:

um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 ($receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição;

um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam um cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (receptor$^+$/$CD4^+$/Células $CD27^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ para células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; ou

um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ para células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

[001070] 222. O método da modalidade 221, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+$, células $CD4^+/CCR7^+$, células $CD8^+/CD27^+$, células $CD4^+/CD27^+$, células $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou $CD4^+$/Célula $CCR7^+/CD27^+$ s.

[001071] 223. O método da modalidade 221 ou modalidade 222, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7, cada uma inclusive, células receptor$^+$/$CD8^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais ou

células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[001072] 224. O método de qualquer uma das modalidades 221-223, em que a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais.

[001073] 225. O método de qualquer uma das modalidades 221-224, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e entre em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

[001074] 226. O método de qualquer uma das modalidades 221-225, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou

90% de células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; e/ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$; e/ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

[001075] 227. O método de qualquer uma das modalidades 221-226, em que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1; e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1; e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

[001076] 228. O método de qualquer uma das modalidades 221-227, em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expres-

sam CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células $CD45RA^-$.

[001077] 229. O método da modalidade 228, em que a dose unitária de células compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

[001078] 230. O método de qualquer uma das modalidades 221-229, em que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células $receptor^+$ totais na dose unitária são $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$ ou $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

[001079] 231. O método de qualquer uma das modalidades 214-230, em que antes do fornecimento ou isolamento, o método compreende determinar o número, número por volume, número por peso e/ou porcentagem das células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam células T CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

[001080] 232. O método de qualquer uma das modalidades 214-231, em que os um ou mais agentes estimulantes são capazes de ativar células T, células T $CD4^+$ e/ou células T $CD8^+$; são capazes de induzir um sinal através de um complexo TCR; e/ou são capazes de induzir a proliferação de células T, células T $CD4^+$ e/ou células T $CD8^+$.

[001081] 233. O método de qualquer uma das modalidades 214-232, em que os um ou mais agentes estimulantes compreendem um agente primário que se liga a um membro de um complexo de TCR, opcionalmente que se liga especificamente a CD3.

[001082] 234. O método da modalidade 233, em que os um ou mais agentes estimulantes compreendem adicionalmente um agente se-

cundário que se liga especificamente a uma molécula coestimulatória de célula T.

[001083] 235. O método da modalidade 234, em que a molécula co-estimulatória é selecionada a partir do grupo que consiste em CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 ou ICOS.

[001084] 236. O método da modalidade 234 ou modalidade 235, em que os agentes primário e secundário compreendem anticorpos, opcionalmente em que os um ou mais agentes estimulantes compreendem a incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28.

[001085] 237. O método de qualquer uma das modalidades 214-236, em que os um ou mais agentes estimulantes estão presentes na superfície de um suporte sólido, opcionalmente uma conta.

[001086] 238. O método de qualquer uma das modalidades 214-237, em que os um ou mais agentes estimulantes são selecionados a partir do grupo que consiste em moléculas de ligação a CD3; moléculas de ligação a CD28; IL-2 recombinante; IL-15 recombinante; e IL-7 recombinante, uma vacina compreendendo um antígeno especificamente reconhecido pelo receptor de antígeno e um anticorpo anti-idiotipo que se liga especificamente ao receptor de antígeno ou suas combinações.

[001087] 239. O método de qualquer uma das modalidades 183-238, em que a composição terapêutica é uma composição de acordo com a modalidade 1.

[001088] 240. Os métodos de qualquer uma das modalidades 183-239, compreendendo adicionalmente a administração a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[001089] 241. O método de qualquer uma das modalidades 183-240, caracterizado pelo fato de que, entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou razão de células que expressam

CCR7 (células CCR7$^+$) na dose unitária varia em não mais de 40%, por não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

[001090] 242. O método de qualquer uma das modalidades 183-241, em que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^8, entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8 entre ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD3$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD3$^+$) ou células CD3$^+$ totais, cada uma inclusive.

[001091] 243. O método de qualquer uma das modalidades 183-242, em que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 5 x 10^8, não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD3$^+$ totais ou células CD3$^+$ totais.

[001092] 244. O método de qualquer uma das modalidades 183-243, em que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis.

[001093] 245. O método de qualquer uma das modalidades 183-244, em que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$,

número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de tais células que não expressam um marcador apoptótico e/ou é o número tais células totais que são negativas (-) para marcadores apoptóticos, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase ativada 3.

[001094] 246. O método de qualquer uma das modalidades 240-245, compreendendo a administração de uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

[001095] 247. O método da modalidade 246, em que a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$.

[001096] 248. O método da modalidade 247, em que a primeira composição compreende as células T CD8$^+$.

[001097] 249. O método da modalidade 247, em que a primeira composição compreende as células T CD4$^+$.

[001098] 250. O método de qualquer uma das modalidades 247-249, compreendendo a administração da composição contendo células T CD8$^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T CD4$^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, no máximo 15 minutos, no máximo 10 minutos ou não mais de 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

[001099] 251. O método de qualquer uma das modalidades 247-250, compreendendo a administração da composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[001100] 252. O método de qualquer uma das modalidades 247-250, compreendendo a administração da composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

[001101] 253. O método de qualquer uma das modalidades 183-252, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante.

[001102] 254. O método de qualquer uma das modalidades 183-253, em que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno-alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

[001103] 255. O método da modalidade 254, em que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer.

[001104] 256. O método da modalidade 254 ou modalidade 255, em que o antígeno-alvo é um antígeno tumoral.

[001105] 257. O método de qualquer uma das modalidades 254-256, em que o antígeno-alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecido como CAIX ou

G250), um antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina de motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor de fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor da efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo do receptor Fc tipo 5 ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AchR fetal), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos do membro D de grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), tirosi-

na quinase de receptor do tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

[001106] 258. O método de qualquer uma das modalidades 183-257, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

[001107] 259. O método de qualquer uma das modalidades 183-258, em que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[001108] 260. O método de qualquer uma das modalidades 183-259, em que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular que compreende um domínio de ligação a antígeno.

[001109] 261. O método da modalidade 260, em que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

[001110] 262. O método da modalidade 261, em que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

[001111] 263. O método da modalidade 261 ou modalidade 262, em que o fragmento compreende um scFv.

[001112] 264. O método de qualquer uma das modalidades 183-263, em que o receptor recombinante compreende uma região de sinalização intracelular.

[001113] 265. O método da modalidade 264, em que a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular.

[001114] 266. O método da modalidade 265, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[001115] 267. O método da modalidade 266, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

[001116] 268. O método de qualquer uma das modalidades 183-267, em que o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

[001117] 269. O método de qualquer uma das modalidades 183-268, em que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

[001118] 270. O método da modalidade 269, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

[001119] 271. O método da modalidade 259 ou modalidade 270, em que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

[001120] 272. O método de qualquer uma das modalidades 269-271,

em que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

[001121] 273. O método de qualquer uma das modalidades 183-272, em que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

[001122] 274. O método de qualquer uma das modalidades 183-273, em que as células T são alogênicas para o objeto.

[001123] 275. O método de qualquer uma das modalidades 183-274, em que as células T são alogênicas para o objeto.

[001124] 276. Uma composição de saída produzida pelo método de qualquer uma das modalidades 183-275.

[001125] 277. Uma dose unitária determinada ou produzida pelo método de qualquer uma das modalidades 201-213 e 221-276.

[001126] 278. Uma composição farmacêutica compreendendo a dose unitária da modalidade 277.

[001127] 279. A composição farmacêutica da modalidade 278, compreendendo adicionalmente um veículo farmacêutico.

[001128] 280. Um método de tratamento, compreendendo a administração a um objeto mamífero de toda ou uma porção da composição de saída da modalidade 276, uma dose unitária da modalidade 277 ou uma composição farmacêutica da modalidade 278 ou modalidade 279.

[001129] 281. Uso de toda ou uma porção da composição de saída da modalidade 276, uma dose unitária da modalidade 277 ou uma composição farmacêutica da modalidade 278 ou modalidade 279 para o tratamento de câncer.

[001130] 282. Uso de toda ou uma porção da composição de saída da modalidade 276, uma dose unitária da modalidade 277 ou uma composição farmacêutica da modalidade 278 ou modalidade 279 na fabricação de um medicamento para tratamento de câncer.

[001131] 283. A composição de saída da modalidade 276, uma dose

unitária da modalidade 277 ou uma composição farmacêutica da modalidade 278 ou modalidade 279 para uso no tratamento de câncer.

VII EXEMPLOS

[001132] Os exemplos a seguir são incluídos apenas para fins ilustrativos e não se destinam a limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1 Avaliação de Atributos Celulares e Fenótipos de Células T que Expressam CAR Anti-CD19 e Parâmetros Farmacocinéticos (PK), Resposta e Toxicidade

[001133] A relação entre fenótipos celulares de células T manipuladas geneticamente para expressar um receptor quimérico de antígeno (CAR) e parâmetros farmacocinéticos (PK), os resultados de resposta e toxicidade das células após a administração a objetos foram avaliados.

A. Atributos de Composição Terapêutica de Célula T

[001134] Composições terapêuticas de células T exemplares contendo células T autólogas que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para CD19 foram geradas. O CAR anti-CD19 continha um scFv anti-CD19 derivado de um anticorpo murino (região variável derivada de FMC63, orientação VL-ligante-VH), um espaçador derivado de imunoglobulina, um domínio transmembranar derivado de CD28, uma região coestimulatória derivada de 4-1BB, e um domínio de sinalização intracelular CD3-zeta. O vetor viral continha adicionalmente sequências que codificam um receptor truncado, que serviu como um marcador substituto para a expressão de CAR; separados da sequência CAR por uma sequência de salto do ribossoma T2A. As composições terapêuticas de células T geradas, usadas para administração em objetos com linfoma não-Hodgkin (NHL) recidivado e refratário descrito abaixo, foram avaliadas para mais de cem atributos fenotípicos, funcionais e relacionados à saúde celular, usando citometria de fluxo e ensaios in vitro. As células foram avaliadas antes e

depois da manipulação, para vários atributos.

[001135] Atributos exemplares que foram avaliados são apresentados na Tabela E1. Os atributos fenotípicos geralmente associados à composição fenotípica da memória e aos fenótipos de saúde celular foram examinados usando citometria de fluxo. A funcionalidade das células T foi avaliada utilizando bioensaios específicos para antígenos in vitro. Os testes de caracterização e liberação foram realizados em composições terapêuticas de células T que haviam passado por um número representativo de ciclos de congelamento e descongelamento.

Tabela E1: Atributos de caracterização representativa medidos em composições terapêuticas de célula contendo células T anti-CD19 CAR
Viabilidade Caspase-3 intracelular ativa Anexina V
CCR7 (receptor de quimiocina C-C tipo 7)
Citocinas inflamatórias tal como TNF-α (fato α de necrose tumoral)

[001136] Para geração de composições de células para administração, células autólogas foram isoladas dos objetos via leucaférese. As amostras de leucaférese foram submetidas a um processo para geração de células que expressam CAR. O processo envolveu a lavagem de células usando uma seleção automatizada baseada em lavagem e imunoafinidade para purificação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, resultando em duas composições enriquecidas para $CD8^+$ (na qual uma mediana de 99%, intervalo interquartil (IQR) 98-100%, as células eram $CD8^+$) e $CD4^+$ (nas quais uma mediana de 99%, IQR 99-100%, as células eram $CD4^+$), respectivamente.

[001137] As células das composições $CD4^+$ e $CD8^+$ enriquecidas foram submetidas separadamente a transdução lentiviral com um vetor

que codifica um CAR anti-CD19 com um domínio coestimulatório de 4-1BB. As populações transduzidas foram então incubadas separadamente na presença de reagentes estimulantes para expansão celular. As células $CD8^+$ e $CD4^+$ expandidas foram formuladas e crioconservadas separadamente e armazenadas antes da administração. Para minimizar as variações, entre lotes e/ou composições de células derivadas de diferentes pacientes, tal como aqueles com diferentes atributos de paciente, em parâmetros indicativos de saúde celular, as células foram mantidas em volumes constantes entre lotes. Os produtos celulares exibiram uma faixa estreita de concentrações celulares viáveis (com base na avaliação das composições celulares para um grupo de objetos, $CD8^+$: mediana 31 x 10^6 células/mL, IQR 28-40 x 10^6 células/mL, N = 38; $CD4^+$: mediana 35 x 10^6 células/mL, IQR 31-40 x 10^6, N = 36).

[001138] No sítio de administração, as composições celulares foram descongeladas e administradas separadamente, de acordo com um volume alvo de cada composição correspondente ao número de células $CD8^+$ CAR^+ e $CD4^+$ CAR^+ na dose apropriada (como para DL1, contendo 5 x 10^7 células T totais expressando CAR (2,5 x 10^7 cada uma das células $CD4^+$ e $CD8^+$ expressando CAR), ou DL2, contendo 1 x 10^8 células T totais que expressam CAR (5 x 10^7 cada uma das células $CD4^+$ expressando CAR $CD8^+$ expressando CAR)).

[001139] Os parâmetros indicativos de saúde das células T que expressam CAR nas composições para administração foram avaliados, tal como medindo, pós-descongelamento, viabilidade, expressão da Anexina V da superfície celular e níveis de Caspase intracelular ativa 3. A porcentagem mediana das células que expressam Anexina V foram 11% (IQR 9-18%; N = 33) de células T $CD8^+$ CAR^+ e 10% (IQR 8-17%; N = 31) de células T $CD4^+$ CAR^+. A expressão da caspase 3 foi semelhante à expressão da Anexina V.

[001140] As quantidades de células T CAR^+ $CD4^+$ e CAR^+ $CD8^+$ na composição para administração foram controladas com precisão. Observou-se que o número de células realmente administradas a um conjunto exemplar de objetos estava dentro de 8% ou menos do número alvo de células para uma dada dose:

- 2,4-2,7 x 10^7 (alvo ± 8%) células T $CD4^+$ CAR^+ e 2,4-2,7 x 10^7 (alvo ± 8%) células T $CD8^+$ CAR^+ para objetos administrados em células DL1 (n = 48)
- 4,6-5,1 x 10^7 (alvo ± 8%) células T $CD4^+$ CAR^+ ou 4,6-5,1 x 10^7 (alvo ± 8%) células T $CD8^+$ CAR^+ para objetos administrados em células DL2 (n = 20).

[001141] Verificou-se que a faixa de dose administrada apresenta baixa variabilidade em um conjunto diferente de exemplos de objetos:

- 48-52 × 106 células T $CD3^+$ CAR^+ em DL1 (n = 34)
- 96-101 × 106 células T $CD3^+$ CAR^+ em DL2 (n = 29)
- 24-27 x 10^6 células T $CD4^+$ CAR^+ ou T $CD8^+$ CAR^+ em DL1 (n = 34)
- 46-51 x 10^6 células T $CD4^+$ CAR^+ ou T $CD8^+$ CAR^+ em DL2 (n = 29).

[001142] Como mostrado na FIG. 1A, observou-se que as composições de célula T que expressam CAR administradas a objetos exibem alta pureza de células T e baixa variação entre os lotes. Tendo em vista, por exemplo, controles de processos e produtos, observou-se que as composições de célula terapêuticas contendo células T CAR apresentam baixa variabilidade de lote para lote na função de célula T específica de célula.

[001143] O acúmulo de citocina específica de antígeno *in vitro* e a coloração intracelular de citocinas (ICS) mostraram uma baixa variação semelhante entre lotes para produção de citocinas para várias ci-

tocinas (IL-2, TNF-α e IFN-γ). Em um exemplo de experimento ICS, células de composições foram estimuladas com CD19, coradas para citocinas, incluindo TNF-α, e proteínas de superfície, incluindo receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) como marcador de fenótipo de memória e analisado por citometria de fluxo. O número de células na composição para administração que eram positivas para as citocinas ou proteínas de superfície foi determinado. A FIG. 1B mostra o número de células $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+, células $CD4^+$ CAR^+ TNF-α^+ e $CD8^+$ CAR^+ TNF-α^+, $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ e $CD8^+$ CAR^+ $CCR7^+$ e presentes nas composições de célula T CAR para administração em DL1 e DL2. A FIG. 1C mostra outra figura que representa o número de células $CD4^+$ CAR^+, células $CD8^+$ CAR^+, células $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ e células $CD8^+$ CAR^+ $CCR7^+$ nas composições de dose controlada, em uma escala diferente. Esses resultados estão resumidos na Tabela E2. Os resultados mostram baixa variabilidade no número de células $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+, $CD4^+$ CAR^+ TNF-α^+ e $CD8^+$ CAR^+ TNF-α^+, $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ e $CD8^+$ CAR^+ $CCR7^+$. Por exemplo, foi observado um intervalo estreito para o número de células positivas para a produção de TNF-α (n = 61).

Tabela E2: Dose controlada, fenótipos de células T e função específica das células (x 10^6 células)

	$CD4^+$**CAR^+**		$CD8^+$**CAR^+**		$CD4^+$**CAR^+ TNF-α^+**	
	DL1	**DL2**	**DL1**	**DL2**	**DL1**	**DL2**
Mediana	25.1	50.0	25.0	49.9	22.4	47.3
IQR	24.7-25.4	49.6-50.4	24.8-25.3	49.6-50.3	21.1-23.8	46.1-48.4

Tabela E2:(continuação)- Dose controlada, fenótipos de células T e função específica das células (x 10^6 células)

	$CD8^+$**CAR^+ TNF-α^+**		$CD4^+$**CAR^+** $CCR7^+$		$CD8^+$**CAR^+** $CCR7^+$	
	DL1	**DL2**	**DL1**	**DL2**	**DL1**	**DL2**
Mediana	19.4	41.0	10.6	16.6	13.5	19.9
IQR	17.1-21.7	39.3-45.5	6.2-14.7	9.0-29.4	5.4-16.2	9.6-27.9

[001144] Um parâmetro indicativo de produção por células CAR^+ do fator alfa de necrose tumoral (TNFα) após estimulação com CD19 mostrou uma faixa estreita entre lotes diferentes, com desvio padrão relativo (RSD) de 37% para células T $CD4^+$ CAR^+ (N = 59) e 51% para células T $CD8^+$ CAR^+ (N = 61).

[001145] Os resultados foram consistentes com uma observação de que pelo menos três aspectos do processo de fabricação e controle da composição de célula contribuíram para a baixa variabilidade entre as composições e a saúde celular consistente: uma dose plana precisa e consistente das células $CD4^+$ e $CD8^+$ administradas; controle e otimização das condições de cultura de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ que resultam em baixa variabilidade de lotes entre fenótipos (por exemplo, CCR7) e função in vitro (por exemplo, produção de IL-2, TNF-α e IFN-γ após estimulação do antígeno); e constante formulação e volume de composição. Os resultados também mostraram que o controle rígido do número de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ CAR^+ na composição terapêutica para administração em objetos, permite a identificação de atributos das células na composição de célula manipulada geneticamente (vide FIG. 1C) e potencial associação com a farmacocinética (PK) e resultados clínicos, tal como resposta e toxicidade.

B. Administração de Composição de Célula T CAR^+ Anti-CD19

[001146] A composição terapêutica das células T CAR^+ descrita acima foi administrada a objetos com linfoma não-Hodgkin (NHL) agressivo recidivante ou refratário (R/R) em um estudo clínico. Especificamente, uma coorte de objetos humanos adultos com R/R NHL, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) de novo ou transformado a partir de linfoma indolente (NOS), linfoma de células B de alto grau (incluindo acerto duplo/triplo), DLBCL transformado a partir de leucemia linfocítica crônica (CLL) ou linfomas da zona marginal (MZL), linfoma primário de grandes células mediastinais (PMBCL) e linfoma

folicular grau 3b (FLG3B) foram administrados com composições de célula T que expressam CAR anti-CD19. Os resultados foram avaliados separadamente para um subconjunto principal de objetos da coorte completa (excluindo aqueles com status de baixo desempenho (ECOG 2), DLBCL transformado de linfomas da zona marginal (MZL) e/ou leucemia linfocítica crônica (CLL, Richter) e excluindo os objetos com linfoma primário de grandes células mediastinais (PMBCL) e linfoma folicular grau 3b (FLG3B) (coorte central)). A coorte principal incluiu objetos com DLBCL, NOS e linfoma folicular transformado (tFL) ou linfoma de células B de alto grau (acerto duplo/triplo) ou linfoma de células B de alto grau, com rearranjos MYC e BCL2 e/ou BCL6 com histologia de DLBCL (acerto duplo/triplo) e com status de desempenho do Grupo de Oncologia Cooperativa Oriental (PS ECOG) de 0 ou 1. A análise neste momento apresentada neste exemplo é baseada na avaliação de um total de 91 objetos na coorte completa (88 (65 da coorte CORE) avaliados quanto à resposta e 91 (67 da coorte CORE) avaliados quanto à segurança) que foram administrados com as células que expressam CAR anti-CD19.

[001147] O CAR anti-CD19 continha um scFv anti-CD19 derivado de um anticorpo murino (região variável derivada de FMC63, orientação VL-ligante-VH), um espaçador derivado de imunoglobulina, um domínio transmembranar derivado de CD28, uma região coestimulatória derivada de 4-1BB, e um domínio de sinalização intracelular CD3-zeta. O vetor viral continha adicionalmente sequências que codificam um receptor truncado, que serviu como um marcador substituto para a expressão de CAR; separadas da sequência CAR por uma sequência de salto ribossomal T2A.

[001148] As composições de células crioconservadas contendo células que expressam CAR anti-CD19 foram descongeladas antes da administração intravenosa. A dose terapêutica de células T foi admi-

nistrada como uma composição de célula definida, administrando a população de células $CD4^+$ CAR^+ formulada e a população de $CD8^+$ CAR^+ formulada, administrada separadamente, a uma razão alvo de aproximadamente 1:1. Os objetos receberam uma dose única ou dupla de células T que expressam CAR (cada dose única por infusão separada de células T que expressam CAR $CD4^+$ e células T que expressam CAR $CD8^+$, respectivamente) da seguinte maneira: uma dose única do nível de dose 1 (DL1) contendo 5×10^7 células T no total de expressão de CAR ou uma dose única do nível de dose 2 (DL2) contendo 1×10^8 células no total de expressão de CAR. Em alguns casos, os objetos receberam uma dose dupla de DL1 na qual cada dose foi administrada com intervalo de em ou cerca de 14 (quatro) dias, administrada no dia 1 e no dia 14, incluindo um objeto que inadvertidamente recebeu duas doses de DL2 por meio do programa de duas doses, devido a um erro de dosagem. O nível de dose e o número alvo de subconjuntos de células T para a composição administrada em DL1 e DL2 são apresentados na Tabela E3. Na coorte principal, 34 objetos receberam DL1 e 27 objetos receberam DL2.

Tabela E3. Nível de dose alvo e número de subconjuntos de células T para composições de células contendo células T anti-CD19 CAR

Nível de Dose	**Dose de Células T Auxiliares (T_H) ($CD4^+$ CAR^+)**	**Dose de Células T Citotóxicas (T_C) ($CD8^+$ CAR^+)**	**Dose de Células T Totais ($CD3^+$ CAR^+)**
1	25×10^6	25×10^6	50×10^6
2	50×10^6	50×10^6	100×10^6

C. Resultados de Segurança e Resposta Após o Tratamento

[001149] A tabela E4 mostra os resultados gerais de resposta e segurança para a coorte completa e a coorte principal nos dois níveis de dose. A taxa de resposta objetiva (ORR) foi de 74%, incluindo 52% dos objetos que mostraram uma resposta completa (CR). A incidência de qualquer grau de síndrome de liberação de citocinas (CRS) foi de

35%, com CRS grave de 1%; e a incidência de qualquer grau de neurotoxicidade (NT) foi de 19%, com 1% de NT grave.

Tabela E4. Resposta e segurança após administração de células CAR+				
	COMPLETO	**CORE**		
	Todos os níveis de dose	**Todos os níveis de dose**	**DL1**	**DL2**
Melhor Resposta geral (BOR), n[b]	88	65	34	27
ORR, % (95% CI)	74 (63,83)	80(68, 89)	77 (59,89)	82 (62, 94)
CR, % (95% CI)	52 (41,63)	55(43, 68)	47 (30, 65)	63 (42, 81)
Segurança, n[c]	91	67	34	29
Qualquer CRS, % (95% CI)	35 (25, 46)	36 (24, 48)	41 (25, 59)	24 (10, 44)
sCRS(grau 3-4), % (95% CI)	1 (0, 6)	1 (0, 8)	38 (0, 15)	0
Qualquer NT, % (95% CI)	19 (11,28)	21 (12, 33)	24 (11, 41)	17 (6, 36)
sNT(grau 3-4), % (95% CI)	12 (6, 21)	15 (7, 26)	21 (9, 38)	7 (1, 23)

[a] Quatro pacientes tratados com DL1D (nível de dose 1, programa de duas doses) com resultados semelhantes.

[b] Inclui pacientes com evento de DP, morte ou exames de reinicialização de 28 dias. Um paciente não teve varreduras reinicializadas disponíveis.

[c] Inclui todos os objetos que receberam pelo menos uma dose de produto de célula que expressa CAR em conformidade 28 dias antes do ponto no tempo ou morreram.

D. Avaliação Farmacocinética

[001150] Números de células T CAR+ em sangue periférico e medula óssea em momentos antes da administração (pré-tratamento ou quimioterapia pré-linfodeficiência (LDC)) e vários momentos no pós-tratamento (com dia de administração como dia 1) em 86 objetos da coorte DLBCL com PK avaliável, por citometria de fluxo usando um anticorpo específico para o receptor truncado usado como marcador substituto e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) usando iniciadores específicos para um elemento regulador pós-transcricional (WPRE) do vírus da hepatite por marmota presente no

vetor que codifica o receptor de antígeno quimérico (CAR). A área sob a curva que representa os números por microlitro para a população de células CAR^+ indicada entre os dias 0 e 28 (AUC_{0-28}; células CAR^+ * dia/μL de sangue), a concentração sanguínea máxima ou máxima das células CAR^+ (C_{max}; células CAR^+/μL sangue) e o tempo até a C_{max} (T_{max}; dias).

[001151] Um exemplo de gráfico representando os números detectados de células T CAR por microlitro de sangue em vários momentos indicados, tal como avaliado por qPCR ou citometria de fluxo, é mostrado na FIG. 2. Como mostrado na FIG. 2, os níveis de células que expressam CAR em amostras de objetos foram observados por ensaios baseados em citometria de fluxo e ensaios baseados em qPCR.

Exemplo 2 Associação entre Atributos Celulares de Células T que Expressam CAR Anti-CD19 e Parâmetros Farmacocinéticos (PK), Resposta e Toxicidade

[001152] A relação entre os atributos celulares avaliados das células T manipuladas geneticamente para expressar parâmetros do receptor de antígeno quimérico (CAR) e farmacocinético (PK), resultados de resposta e toxicidade das células após a administração a objetos, conforme determinado no Exemplo 1, foi avaliada.

A. Relação entre a Farmacocinética/Exposição de Células T CAR^+ e Atributos de Fenótipo Celular de Composição de Célula Terapêutica Administrada

[001153] As relações foram avaliadas entre certos atributos fenotípicos das células T CAR^+ nas composições terapêuticas administradas e parâmetros associados à farmacocinética (PK) ou exposição de células T CAR^+ T e produção de citocinas.

[001154] Em particular, devido à baixa variabilidade entre composições de células terapêuticas manipuladas geneticamente a partir de células derivadas e formuladas para administração a diferentes obje-

tos, foi possível detectar fenótipos (por exemplo, expressão de $CCR7^+$ e produção de citocinas) associados a parâmetros farmacocinéticos (por exemplo, AUC), resultados de resposta clínica e resultados de toxicidade (por exemplo, CRS ou NT).

[001155] Os níveis de expressão de superfície celular ou a ausência de expressão de marcadores de superfície celular que podem ser indicativos de certos subtipos de células T, tal como os subtipos de células de memória, incluindo o receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7), CD27 e CD45RA, foram avaliados por fluxo citometria. Os níveis de expressão de superfície de CD3, CD4, CD8, CD28 e/ou receptor truncado usados como marcador substituto também foram avaliados; a presença de caspase ativada 3 foi avaliada como uma medida de células apoptóticas. A produção de citocinas (pg/mL) foi avaliada em células CD8 após estimulação com CD19 (antígeno específico para o CAR expresso). A expressão dos marcadores e a produção de citocinas foram correlacionadas com a área sob a curva que representa os números de células T CAR^+ (ou subconjuntos) detectados no sangue dos objetos, entre os dias 0 e 28 após a administração (AUC_{0-28}; dia 0 como dia de dosagem) e a concentração sanguínea máxima ou pico de células CAR^+ (C_{max}) pós-administração. As correlações foram avaliadas usando análises univariadas, multivariadas e baseadas em aprendizado de máquina.

[001156] Entre as células negativas (não apoptóticas) para caspase 3 ativa na composição de célula terapêutica administrada, observou-se que a porcentagem total ou número de células $CCR7^+$, células $CD27^+$, células $CCR7^+$ $CD27^+$ ou células $CD45RA^-CCR7^+$, entre células T CAR^+ CD4 ou CD8, na composição administrada, estavam positivamente correlacionadas com CD4 ou CD8 C_{max} e AUC_{0-28}. Observou-se que a porcentagem total ou número de células $CD45RA^-$CCR7- estava negativamente correlacionado com CD4 ou CD8 C_{max} e AUC_{0-28}. Ob-

servou-se que a porcentagem total ou número de células CCR7-CD27- estava negativamente correlacionado com CD4 C_{max} e AUC_{0-28}. Observou-se que os níveis de produção de IL-2 in vitro após a estimulação com CD19 estavam correlacionados com CD8 C_{max} e AUC_{0-28}.

[001157] A FIG. 3A mostra os resultados de um estudo que avalia a relação das células $CCR7^+$ percentuais (entre as populações de células $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+) e a farmacocinética das células $CD4^+$ CAR^+ e células $CD8^+$ CAR^+, respectivamente (como indicado por AUC_{0-28} de $CD4^+$ ou AUC_{0-28} de células $CD8^+$ no sangue para objetos administrados com a terapia celular). Cada ponto representa um paciente individual, com sombreamento de pontos individuais indicando se o paciente recebeu o nível de dose 1 (DL1) ou o nível de dose 2 (DL2)). Na FIG. 3B, essa análise é mostrada com resultados indicados separadamente para objetos exibindo alta (nesta avaliação, indicado por uma soma dos produtos de diâmetros (DPS) maior ou igual a 50 cm^2) ou baixa (valor de DPS menor 50 cm^2) carga de tumor pré-tratamento (avaliada no momento da quimioterapia pré-tratamento com linfodeficiência). Observou-se correlação positiva com a porcentagem de células $CCR7^+$ entre as células $CD4^+$ CAR^+ na dose administrada com a AUC_{0-28} $CD4^+$, e observou-se correlação positiva com a porcentagem de células $CCR7^+$ entre as células $CD8^+$ CAR^+ na dose administrada e com a AUC_{0-28} $CD8^+$. Além disso, observou-se geralmente que as composições de célula manipulada geneticamente terapêuticas geradas a partir de células derivadas de objetos no grupo de "alta" carga de doenças pré-tratamento exibem uma porcentagem mais alta de células $CCR7^+$, entre as composições $CD8^+$ e $CD4^+$. A FIG. 3C mostra os resultados para avaliar a relação entre o número total de células $CCR7^+$ $CD4^+$ CAR^+ e $CCR7^+$ $CD8^+$ CAR^+ e a AUC_{0-28} de $CD4^+$ e AUC_{0-28} de células CAR^+ $CD8^+$ no sangue para os objetos que receberam a terapia celular, respectivamente.

[001158] Em uma avaliação adicional da relação entre os atributos de células T $CD4^+$ CAR^+ e a AUC_{0-28} e C_{max} de células T CAR^+ $CD4^+$ ou $CD8^+$, observou-se correlação da porcentagem de células T $CD4^+$ CAR^+ que são $CCR7^+$ ou $CCR7^+$ $CD27^+$ com parâmetros PK (AUC_{0-28} e C_{max}) de células T $CD4^+$ CAR^+ (FIGURAS 3A, 3D-3F) e células T $CD8^+$ CAR^+ (FIGURAS 3G-3J). Os resultados são consistentes com uma observação de que as células T $CD4^+$ CAR^+ podem ajudar na expansão das células T $CD8^+$ CAR^+.

[001159] Os resultados foram consistentes com uma observação de que a representação nas composições terapêuticas de células que expressam certos marcadores fenotípicos, tal como aqueles indicativos de subtipos de células T, tal como subtipos de compartimento de memória, por exemplo, CCR7 e/ou CD27, se correlacionaram positivamente com parâmetros farmacocinéticos, tal como aqueles indicativos de grau de exposição a células T CAR^+, tal como AUC_{0-28} e/ou C_{max}, em objetos administrados com a composição de célula definida. Em alguns aspectos, as células $CD45RA^-$ CCR7- ou CCR7- CD27- na composição de célula T CAR^+ foram negativamente correlacionadas com os parâmetros farmacocinéticos.

B. Relação entre Farmacocinética/Exposição de Células T CAR^+, Resposta Clínica, Toxicidade e Atributos de Fenótipo Celular de Compostos Celulares Terapêuticos Administrados

[001160] A relação entre certos atributos fenotípicos das células T CAR+ nas composições terapêuticas e parâmetros associados à farmacocinética (PK) ou exposição de células T CAR+, produção de citocinas, resultados de resposta clínica e resultados de toxicidade foi avaliada. Em uma análise de composições terapêuticas geradas e administradas a um grupo exemplar de objetos, as composições com frequência elevada de células que expressam marcadores indicativos de subtipos de células T de memória exibiram uma forte correlação com a

produção de citocinas após a estimulação in vitro de CD19.

[001161] Níveis de expressão de superfície celular de vários marcadores, presença de caspases ativadas, produção de citocinas nas células $CD4^+$ e $CD8^+$ após a estimulação com CD19, parâmetros farmacocinéticos (PK) após a administração (AUC_{0-28} e C_{max}) foram determinados como descrito acima. A expressão dos marcadores e a produção de citocinas foram correlacionadas com os resultados da AUC_{0-28}, C_{max} e resposta clínica (incluindo sobrevida livre de progressão e resposta durável) e resultados de toxicidade (síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou neurotoxicidade (NT)), determinados a partir de objetos avaliáveis da coorte principal descrita acima que receberam a composição específica de células T CAR^+. As correlações foram avaliadas usando análises univariadas, multivariadas e baseadas em aprendizado de máquina. Um mapa de calor foi gerado indicando valores p nominais para vários atributos das células e a associação com parâmetros de toxicidade, resposta ou farmacocinética (PK).

[001162] Os resultados mostraram uma associação entre certos perfis funcionais, eventos de segurança e resposta durável e a frequência de células que expressam marcadores indicativos de um estado de célula T menos diferenciado, por exemplo, $CCR7^+$ $CD27^+$. Especificamente, composições com alta frequência de células $CCR7^+$, um marcador indicativo do subtipo de célula T de memória central, exibiram aumento da produção de IL-2 (Spearman $\rho = 0,55$, $P < 0,0001$). Como mostrado nas FIGURAS 4A-4B, composições de célula T que expressam CAR $CD4^+$ contendo frequências aumentadas de células T $CCR7^+$ $CD27^+$ CAR^+ menos diferenciadas secretam IFNγ reduzido (FIG. 4A) e IL-2 aumentada (FIG. 4B). Em contraste, as composições com altas frequências de células que expressam marcadores associados a subtipos de células T efetoras diferenciadas exibiram produção aumentada de IFNγ ($\rho = 0,51$, $P < 0,0001$) e produção de IL-13 ($\rho = 0,45$, $P <$

0,0001). Como mostrado nas FIGURAS 5A-5B, as composições de célula T que expressam CAR $CD8^+$ contendo frequências aumentadas de células T $CCR7^+$ $CD27^+$ CAR^+ menos diferenciadas produzem baixos níveis de algumas citocinas associadas a Th2, tal como IL-5 (FIG. 5A) e IL-13 (FIG. 5B).

[001163] As correlações entre o fenótipo de memória na composição e função traduzidas em uma correlação positiva entre a composição do subconjunto da memória central e o pico de expansão in vivo das células CAR^+ (ρ = 0,42, *P* = 0,002) e a sobrevida livre de progressão (PFS) (Estimativa de sobrevida de Kaplan-Meier, *P* = 0,0164) que foram observadas. As FIGURAS 6A-6D mostram as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para objetos aos quais foram administradas composições de célula T CAR^+, divididos em grupos aos quais foram administradas composições contendo uma frequência de células $CCR7^+$ $CD27^+$ CAR^+ T entre células T $CD4^+$ CAR^+ (FIG. 6A para sobrevivência livre de progressão, FIG. 6C para duração de resposta) e entre células T $CD8^+$ CAR^+ (FIG. 6B para sobrevivência livre de progressão, FIG. 6D para duração de resposta) que está acima ou abaixo de um certo nível limite. Observou-se que células de memória $CCR7^+$ $CD27^+$ mais altas na composição estavam correlacionadas com maior sobrevida livre de progressão.

[001164] Além disso, as composições de célula T $CD4^+$ CAR^+ contendo uma frequência aumentada de uma subpopulação de memória central demonstraram relações com o fato de o objeto desenvolver uma toxicidade após a administração da composição terapêutica, seja a síndrome de liberação de citocinas (CRS, Grau 1 ou superior), *P* = 0,0069; FIG. 7A) ou neurotoxicidade grave (NT, Grau 3 ou superior, *P* = 0,0014, FIG. 7C). As composições de célula T $CD4^+$ CAR^+ com produção reduzida de IFNγ foram associadas a CRS (Grau 1 ou superior, *P* = 0,0186; FIG. 7B) ou NT grave (Grau 3 ou superior, *P* = 0,0055,

FIG. 7D).

[001165] Os resultados mostraram uma relação entre os atributos de composição de célula modificada e PK, segurança e resultado da resposta das células administradas. Observou-se que as composições com alta frequência de células CCR7$^+$ apresentam um pico de expansão e persistência de células CAR$^+$ após administração consistente com uma observação de que células T CAR+ menos diferenciadas contribuem para parâmetros farmacocinéticos e sobrevida livre de progressão. Os resultados são consistentes com uma observação de que fenótipo e atributos funcionais e perfis associados a uma célula T menos diferenciada exibiram relações com maior probabilidade de NT ou CRS e maior durabilidade da resposta

C. Análise de Fenótipo Multiparamétrico

[001166] Uma análise de fenótipo multiparamétrico exemplar foi realizada com base em uma incorporação estocástica de vizinhos distribuída em t(tSNE), para identificar diferentes populações de subtipos de células usando citometria de fluxo. A análise do tSNE envolveu uma redução não linear da dimensionalidade para representar os resultados em um espaço bidimensional, incluindo o colapso de vários atributos celulares em um gráfico bidimensional e a identificação de 6 subtipos de células diferentes no gráfico bidimensional (vide FIG. 8A). Os dois atributos predominantemente presentes no esquema foram identificados. Como mostrado, um subconjunto de células T de memória, que expressam CCR7 e CD27 (dentro dos limites da forma desenhada na FIG. 8A, gráfico de citometria de fluxo para expressão de CCR7 e CD27 mostrado na FIG. 8B) foi identificado entre as células T CD4$^+$ e CD8$^+$ CAR$^+$. Como mostrado acima nas FIGURAS 4A-4B e 5A-5B, as células identificadas exibiram um perfil funcional distinto.

D. Conclusão

[001167] As composições de célula T CAR$^+$ administradas aos obje-

tos exibiram baixa variabilidade, eram puras e continham uma dose precisa, permitindo a identificação de relações entre vários atributos celulares e resultados clínicos, tal como resposta e toxicidade. As populações celulares que expressam marcadores associados a fenótipos de memória exibiram perfis funcionais específicos (por exemplo, produção de citocinas), com células T $CCR7^+$ $CD27^+$ $CD4^+$ CAR produzindo IFNγ reduzido e IL-2 aumentada e IL-2 aumentada, e células $CCR7^+$ $CD27^+$ $CD8^+$ CAR produzindo IL-5 reduzida e IL-13. Observou-se que as composições celulares administradas contendo células T CAR^+ em um estado menos diferenciado, baseadas em fenótipos como expressão de $CCR7^+$ $CD27^+$ e perfis funcionais como produção de citocinas, foram associadas a parâmetros farmacocinéticos, eventos de segurança e maior resposta durável.

[001168] Além disso, entre as modalidades aqui fornecidas, estão aquelas que envolvem métodos e composições que proporcionam baixa variabilidade entre muitas composições celulares terapêuticas (como aquelas produzidas a partir de populações iniciais em uma variedade de pacientes diferentes), tal como aquelas que contêm células CAR anti-CD19. Entre as modalidades fornecidas, estão aquelas baseadas na capacidade, por exemplo, que pode ser devida em parte a esses baixos graus de variabilidade, para estratificar os pacientes de acordo com a carga da doença e/ou identificar certos fenótipos de células T ou atributos fenotípicos que podem estar associados a um ou mais resultados após a administração, tal como parâmetros farmacocinéticos das células CAR^+ CD19 anti-CD19, por exemplo, fatores indicativos de exposição do paciente às células CAR-T após a administração do tratamento, incluindo níveis máximos de exposição ou exposição ao longo do tempo, tal como medido por AUC.

[001169] Em algumas modalidades, esses parâmetros incluem um ou mais marcadores indicativos de subtipos de um ou mais comparti-

mentos de células T, tal como atributos relacionados a marcadores indicativos de subtipos de memória, incluindo fenótipo de célula T de memória central, tal como expressão ou expressão de $CCR7^+$ ou $CD27^+$ percentagem e/ou de células $CCR7^+$ e/ou $CD27^+$. Em alguns aspectos, esses resultados suportam a dosagem com base na expressão de um ou mais desses marcadores e/ou atributos, tal como a administração de uma composição de célula, incluindo uma composição de célula que expressa um receptor recombinante (por exemplo, CAR), no qual pelo menos uma certa porcentagem de células é positiva para um ou mais desses marcadores, por exemplo, CCR7 e/ou CD27, e/ou administrando uma dose na qual um número ou porcentagem específica de células que expressam esses marcadores, por exemplo, CCR7 e/ou CD27, são indicados para administração, por exemplo, em vários objetos ou indicações. Entre essas modalidades, estão aquelas em que a dosagem é baseada em um número definido ou em uma dose fixa de células que expressam receptores recombinantes (por exemplo, CAR) que são $CCR7^+$. Em alguns aspectos, essas abordagens podem limitar ou diminuir a variabilidade dose a dose entre os objetos administrados com a composição terapêutica. Em alguns aspectos, essas abordagens permitem o direcionamento e/ou controle de atributos farmacocinéticos específicos, tal como grau de níveis de células T CAR^+ ou exposição no paciente, por exemplo, ao longo do tempo ou no pico. Em alguns aspectos, esses parâmetros têm como objetivo estar dentro de uma janela ou intervalo terapêutico aceitável, tal como aquele observado como associado a pelo menos uma probabilidade desejada de uma resposta específica ou resultado de eficácia e abaixo de uma certa probabilidade ou risco de um ou mais efeitos adversos ou resultados de toxicidade, para uma composição terapêutica de células T administrada.

Exemplo 3 Identificação de Assinaturas Moleculares de Composições de Célula T CAR+ Associadas à Resposta Durável

[001170] Estudos de caracterização genômica, tal como análises transcriptômicas e epigenômicas, foram realizados além da avaliação de vários atributos funcionais para identificar assinaturas moleculares nas composições de célula T CAR+ que estão associadas à resposta clínica, por exemplo, resposta clínica duradoura na administração de células T CAR+.

[001171] As composições de células manipuladas geneticamente contendo células T CAR+ geradas como descrito acima no Exemplo 1, foram sujeitas a análise de aproximadamente 100 atributos fenotípicos e funcionais, avaliação da expressão de aproximadamente 20.000 transcritos por sequenciamento de RNA de alto rendimento (RNA-seq) e avaliação de acessibilidade de cromatina de aproximadamente 100.000 regiões reguladoras por ensaio para cromatina acessível por transposase usando sequenciamento (ATAC-seq). Os atributos foram analisados por análise parcial discriminante de mínimos quadrados (PLS-DA) para identificar variáveis que discriminam entre os objetos que apresentaram resposta completa (CR) e os que exibiram doença progressiva (PD) ou resposta parcial (PR), seis meses após administração da composição de célula T CAR+. Como mostrado nas FIGURAS 9A-9C, a avaliação dos atributos fenotípicos e funcionais e as análises transcriptômicas e epigenômicas podem ser usadas para identificar assinaturas moleculares de composições de células T CAR+ manipuladas geneticamente que estão associadas a resposta clínica durável (por exemplo, RC aos 6 meses), em objetos que foram administrados com as composições de células manipuladas geneticamente. Os resultados são consistentes com uma observação de que assinaturas moleculares que se correlacionam com eficácia e segurança podem ser identificadas com base na caracterização genômica de com-

posições de células manipuladas geneticamente.

Exemplo 4 Associação entre Atributos de Subtipo de Célula de Memória em Composições de Célula T Antes e Depois de Manipulação para Expressar um Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)

[001172] Vários atributos celulares, incluindo a expressão de marcadores indicativos de subtipos de memória, tal como CCR7, CD27 e/ou CD45RA, foram avaliados em composições de célula T de um objeto antes da manipulação e composições terapêuticas de célula manipulada geneticamente que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR). A associação entre os atributos nas duas populações foi avaliada.

[001173] As células T $CD4^+$ e $CD8^+$ foram selecionadas por enriquecimento baseado em imunoafinidade a partir da leucaférese de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) de uma pluralidade de objetos. Uma composição dessas células T selecionadas (antes da manipulação genética, designada "composição pré-manipulação") foi avaliada para vários atributos, incluindo a expressão de marcadores de superfície celular indicativos de certos subtipos de células T, tal como subtipos de células de memória, incluindo o receptor de quimiocina tipo C-C 7 (CCR7), CD27 e CD45RA, e a expressão de superfície de CD3, CD4, CD8, CD28 e/ou receptor truncado usado como marcador substituto, e a presença de caspase ativada 3 foi avaliada como uma medida de células apoptóticas. As células T selecionadas foram submetidas à manipulação genética para expressar um CAR anti-CD19, após ativação por incubação com contas revestidas de anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 na presença de citocinas, seguidas de transdução com um vetor lentiviral que codifica um anticorpo CAR anti-CD19, descrito no Exemplo 1.A acima. As composições celulares resultantes foram expandidas e crioconservadas (após manipulação genética, designadas "composição de célula manipulada geneticamen-

te") e avaliadas quanto aos atributos celulares, tal como descrito acima. Os coeficientes de correlação de Spearman por ordem de classificação para correlações em pares entre os atributos das células na composição de pré-manipulação e a composição de célula manipulada geneticamente foram determinados.

[001174] As FIGURAS 10A-10B mostram resultados exemplares da correlação entre a frequência de células $CD4^+$ $CCR7^+$ $CD27^+$ em composições pré-manipuladas geneticamente e a frequência de células $CD4^+$ CAR^+ $CCR7^+$ $CD27^+$ nas composições de células manipuladas geneticamente (FIG. 10A; coeficiente de correlação de ordem de classificação de Spearman: 0,591) e a frequência das células $CD8^+$ $CCR7^+$ $CD27^+$ nas composições pré-manipuladas geneticamente e a frequência das células $CD8^+$ CAR^+ $CCR7^+$ $CD27^+$ nas composições de células manipuladas geneticamente (FIG. 10B; coeficiente de correlação de ordem de classificação de Spearman: 0,357). Os resultados mostraram que a expressão de um ou mais marcadores indicativos de subtipos de células de memória, por exemplo, CCR7 e/ou CD27, na composição de célula manipulada geneticamente para administração em alguns casos, foi associada à expressão dos marcadores na composição de célula de pré-manipulação. Os resultados foram consistentes com a descoberta de que uma composição de célula modificada que contém um número ou porcentagem específica de células que expressam marcadores indicativos de subtipos de células de memória, por exemplo, CCR7 e/ou CD27, pode ser gerada com base no número ou porcentagem de células marcador (es) de expressão na composição de pré-manipulação.

Exemplo 5: Avaliação de Marcadores do tipo Puros em Composições de Célula T Modificadas Contendo Células T CAR^+.

[001175] As composições manipuladas geneticamente de células T primárias contendo células T que expressam receptores de antígeno

quiméricos (CARs) foram produzidas por dois processos paralelos que utilizaram um reagente estimulatório composto por contas revestidas de poliestireno paramagnético com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 anexados para ativar T células antes da transdução com um vetor viral. Nos dois processos, as células foram manipuladas geneticamente por transdução lentiviral para expressar o mesmo CAR anti-BCMA. O CAR continha um domínio de ligação a antígeno de scFv específico para BCMA, uma região transmembranar CD28, uma região de sinalização coestimulatória de 4-1BB, e um domínio de sinalização intracelular derivado de CD3-zeta. Os processos diferiram em sua duração e nas condições de expansão das células. As composições de célula T produzidas foram avaliadas quanto a marcadores de superfície celular.

[001176] Nos dois processos, composições separadas de células $CD4^+$ e $CD8^+$ foram selecionadas a partir de PBMCs isolados a partir de uma amostra de leucaférese de um doador humano, e as composições celulares selecionadas foram crioconservadas. As composições separadas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ foram subsequentemente descongeladas e misturadas na razão de 1:1 de células T $CD4^+$ viáveis para células T $CD8^+$ viáveis. Em ou cerca de 300 x 10^6 células T (150 x 10^6 células $CD4^+$ e 150 x 10^6 células $CD8^+$) da composição de célula de entrada mista foram estimuladas por incubação das células por 18 a 30 horas na presença de contas conjugadas com anticorpo anti-CD3/anti-CD28 em uma razão de 1:1 conta para célula em meio livre de soro. Os meios também continham IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes. Após a estimulação, as células foram lavadas e ressuspensas no meio livre de soro contendo aditivos, bem como IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes.

[001177] Em um processo (um processo exemplar não expandido), as células da composição de célula estimulada foram então transduzidas com um vetor lentiviral que codifica o CAR anti-BCMA por espino-

culação. Após a espinoculação, as células foram lavadas e ressuspensas no meio livre de soro contendo IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes. As células das composições ressuspensas foram incubadas a cerca de 37,0 ºC em uma incubadora. Cerca de 96 horas após o início da estimulação, as células foram lavadas duas vezes na presença de um campo magnético para remover as contas paramagnéticas conjugadas com anticorpo anti CD3/anti-CD28 e formuladas em uma solução contendo 10% de DMSO. A composição de célula formulada foi transferida para uma bolsa ou frasco e foi armazenada a em ou cerca de -80º C.

[001178] Em outro processo (um processo expandido exemplar), após a incubação, em ou cerca de 100 x 10^6 células viáveis da composição de célula estimulada foram concentradas no meio livre de soro contendo IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes. As células foram transduzidas com um vetor lentiviral que codifica o mesmo CAR anti-BCMA como descrito acima por spinoculação a aproximadamente 1600 g por 60 minutos. Após a espinoculação, as células foram ressuspensas no meio livre de soro contendo IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes e incubadas por cerca de 18 a 30 horas a cerca de 37 ºC. As células foram então cultivadas para expansão por transferência para um biorreator (por exemplo, um biorreator de movimento de balanço) em cerca de 500 mL do meio livre de soro exemplar contendo duas vezes a concentração de IL-2, IL-7 e IL-15, conforme usado durante as etapas de incubação e transdução. Quando uma densidade celular viável definida foi alcançada, a perfusão foi iniciada, onde o meio foi substituído por perfusão semicontínua com mistura contínua. As células foram cultivadas no dia seguinte no biorreator até alcançar uma densidade celular limite de cerca de 3 x 10^6 células/ml, o que normalmente ocorreu em um processo envolvendo 6-7 dias de expansão. As contas paramagnéticas conjugadas com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 foram removidas

da composição de célula por exposição a um campo magnético. As células foram então coletadas e formuladas e crioprotegidas como descrito acima.

[001179] As composições de célula T produzidas usando os processos expandidos e não expandidos exemplares foram coradas com reagentes que reconhecem marcadores de superfície incluindo CD4, CD8, CCR7 e CD27 e avaliados por citometria de fluxo. A porcentagem de superfície das células T $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+ positivas para ambas a coloração CCR7 e CD27 é mostrada na FIG. 11A. A FIG. 11B e FIG. 11C representam a porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ entre as células T $CD4^+$ CAR^+ e $CD8^+$ CAR^+, respectivamente, nas composições de célula T produzidas, em comparação com a porcentagem de células $CCR7^+$ $CD27^+$ nas composições de entrada antes da incubação com reagente estimulatório de conta conjugada com anticorpo anti-CD3/anti-CD28. Como mostrado, uma porcentagem maior de $CCR7^+$ $CD27^+$ foi observada nas composições de célula T produzidas a partir do processo não expandido exemplar em comparação com o processo expandido exemplar. Estes resultados são consistentes com composições de células manipuladas geneticamente geradas a partir de processos não expandidos exemplares com uma porção maior de células com um fenótipo menos diferenciado do tipo puro do que composições de células geradas pelo processo expandido exemplar.

[001180] Análise adicional de células geradas pelo processo expandido exemplar de um doador representativo em vários dias durante o processo de fabricação, incluindo na ativação, transdução ou em vários momentos após o início do cultivo (inoc +2, inoc +4 ou inoc +5), demonstra que a expansão das células está associada a um fenótipo mais diferenciado, conforme determinado por uma porcentagem reduzida de células $CCR7^+$ $CD27^+$ (FIG. 11D).

Exemplo 6: Avaliação de Clonalidade de Células T Usando Métodos de Sequenciação e Análise

[001181] As composições de célula T foram avaliadas quanto à abundância clonal de células T, usando o sequenciamento de células únicas de pares de receptores de células T (TCR), antes e depois da manipulação genética para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[001182] As células T autólogas foram isoladas dos objetos por leucaférese por seleção baseada em imunoafinidade para purificação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, resultando em duas composições, enriquecidas para células T $CD8^+$ e $CD4^+$, respectivamente. As células das composições $CD4^+$ e $CD8^+$ enriquecidas foram ativadas com contas paramagnéticas anti-CD3/anti-CD28 e depois foram submetidas separadamente à transdução lentiviral com um vetor que codifica um CAR anti-CD19. O CAR anti-CD19 continha um scFv anti-CD19 derivado de um anticorpo murino (região variável derivada de FMC63), um espaçador derivado de imunoglobulina, um domínio transmembranar derivado de CD28, uma região coestimulatória derivada de 4-1BB e um domínio de sinalização intracelular CD3-zeta. As populações transduzidas foram então incubadas separadamente na presença de reagentes estimulantes para expansão celular. As composições $CD8^+$ e $CD4^+$ expandidas contendo células T que expressam CAR foram formuladas e crioconservadas separadamente e armazenadas.

[001183] A clonalidade de células T das composições de célula T $CD4^+$ e $CD8^+$ isoladas antes da manipulação (CMAT) e das composições terapêuticas de células T CAR^+ $CD4^+$ e $CD8^+$ terapêuticas após a manipulação pelo processo descrito acima foi avaliada. Para avaliar a clonalidade das células T, as células foram sujeitas ao sequenciamento de TCR emparelhado com uma célula αβ, geralmente como descrito nos documentos WO2016044227, WO2016176322 e WO2012048340.

Com base no sequenciamento de célula única com código de barras dos genes TCR, a clonalidade de células T e a diversidade dos clones identificados em uma população de células foram determinadas. Em alguns casos, o índice de Shannon foi usado como um limite para filtrar clones ("clonalidade ajustada por Shannon"), o que preserva as relações entre amostras e elimina o ruído da amostra. Vide Chaara et al. (2018) Front Immunol 9: 1038).

[001184] A FIG. 12 mostra a clonalidade de cada amostra após a aplicação do índice de Shannon. Como mostrado na FIG. 12, a clonalidade das células CD4 e CD8 diferia entre as composições de célula T antes e após a manipulação genética, com as composições de células T CAR+ manipuladas geneticamente exibindo uma clonalidade reduzida em comparação com as células T nas composições antes do início do processo de manipulação das células.

[001185] As composições terapêuticas das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ CAR após a manipulação genética foram classificadas por expressão em citometria de fluxo de um fator indicativo de apoptose, tal como coloração da superfície com clivagem da Anexina V (Anexina V-) ou caspase 3 (indicando células não apoptóticas) e para a expressão de vários marcadores de superfície, incluindo CD45RA, CCR7, CD27, CD4 e CD8. O fenótipo das células foi correlacionado com o grau de clonalidade das células. Observou-se que, nas composições terapêuticas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ terapêuticas CAR^+, a presença de células marcadoras apoptóticas negativas que eram CCR7-/CD27- correlacionou-se positivamente com a clonalidade das células na composição. Da mesma forma, a presença de células marcadoras apoptóticas negativas que foram $CCR7^+$ ou $CCR7^+/CD27^+$ correlacionou-se negativamente com a clonalidade das células em cada uma das composições terapêuticas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ terapêuticas CAR^+. Estes resultados são consistentes com a observação de que a clonalidade das

células pode ser inversamente correlacionada com células menos diferenciadas e do tipo pura, tal como determinadas pela CCR7 e/ou positividade para CD27.

Exemplo 7 Avaliação da Relação Entre Atributos Celulares Fenotípicos e Funcionais e Resposta

[001186] Composições terapêuticas exemplares de células T contendo células T autólogas que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para CD19 foram geradas e administradas aos pacientes como descrito no Exemplo 1. Amostras iniciais, composições de célula T de entrada enriquecidas com $CD4^+$ ou $CD8^+$ e composições de célula T terapêutica geradas que expressam um CAR anti-CD19 foram avaliadas quanto a uma variedade de atributos, incluindo vários atributos fenotípicos, funcionais e relacionados à saúde celular, utilizando citometria de fluxo.

[001187] Os atributos das composições de célula T CAR^+ geradas foram analisados por análise univariada quanto à relação com o resultado da resposta, avaliada pela comparação da sobrevida livre de progressão (PFS) dos objetos administrados pelas composições terapêuticas de células T. Entre os principais atributos variáveis identificados, estava a capacidade das células T $CD4^+$ CAR^+ de produzir citocinas IL-2 e TNF-alfa de maneira não específica ao antígeno CAR, tal como em um método de coloração intracelular por citocinas (ICS) com base no fluxo, em resposta a PMA/ionomicina na presença de inibidor de Golgi. Em particular, as FIGURAS 13A e 13B mostram curvas de PFS (risco proporcional de Cox (superior) e divisão ideal (inferior)) para pacientes com uma porcentagem "alta" ou "baixa" de células que produzem produção de IL-2 e TNFα, respectivamente, nas células T $CD4^+$/ CAR^+ da composição terapêutica, conforme determinado usando estatísticas de classificação maximamente selecionadas. Como mostrado nas FIGURAS 13A e 13B, os grupos que administraram composições

terapêuticas de células T contendo níveis mais altos de produção de $CD4^+/CAR^+$ IL-2 ou TNFα apresentaram sobrevida melhorada em comparação com os objetos que administraram composições terapêuticas de células T contendo uma porcentagem menor de tais células.

[001188] Antes da administração das composições terapêuticas de células T CAR^+, os objetos foram avaliados quanto à carga tumoral, monitorando os níveis séricos basais da soma dos produtos (SPD), conforme descrito no Exemplo 2. Os níveis séricos basais de proteína C reativa (PCR) também foram determinados. Após a administração das composições de célula T que expressam CAR a objetos substancialmente como descrito no Exemplo 1, o resultado clínico foi determinado para cada objeto 6 meses após a administração e correlacionado com a carga da doença. A FIG. 14 mostra o resultado clínico correlacionado aos níveis de SPD ou PCR em objetos que exibem uma resposta completa (CR) (triângulos) ou perda de resposta/sem resposta (círculos)) em 6 meses. Como mostrado na FIG. 14, pacientes com menor carga de doença, tal como indicado pelo baixo SDP basal (menor que 50 cm^2) e baixos valores de PCR (menos de 20 mg/L nas amostras basais), apresentaram menor risco de perda de resposta em 6 meses em comparação aos pacientes com alta carga de doença, conforme indicado pelos valores basais mais altos de SPD e PCR. Para pacientes com alta carga de doença, as composições terapêuticas de células T com frequência aumentada de células T $CD4^+$ CAR^+ produzindo expressão de IL-2 correlacionaram-se com a resposta mantida em 6 meses (FIG. 15). Resultados semelhantes foram observados para TNF-alfa. Esses dados são consistentes com a observação de que certos atributos funcionais das células T que expressam CAR $CD4^+$, tal como a capacidade de produzir IL-2 e TNFα, se correlacionam positivamente com a resposta clínica mantida, particularmente em objetos com alta carga de doença ou níveis basais de SPD ou CRP em cerca de um

limite.

[001189] A saúde celular das composições de entrada selecionadas e enriquecidas para $CD4^+$ ou $CD8^+$ (antes da manipulação com o CAR anti-CD19) foi avaliada por citometria de fluxo para marcadores de apoptose (por exemplo, caspase ativada 3). A relação entre saúde celular e resposta foi avaliada. Como mostrado na FIG. 16 entre uma pluralidade de composições enriquecidas de entrada de células T, valores tercis de corte exemplares para células positivas para o marcador apoptótico (por exemplo, caspase ativada 3) nas composições de entrada demonstraram a relação entre porcentagem de células apoptóticas no material inicial da célula T usado para gerar a composição terapêutica das células T e a probabilidade de PFS. Os resultados são consistentes com uma correlação inversa entre a porcentagem de células de marcador apoptótico+ no material de partida e a melhora da sobrevida livre de progressão (PFS).

[001190] A FIG. 17 mostra a porcentagem de células positivas para um marcador apoptótico (por exemplo, caspase ativada 3) em composições de célula T de entrada enriquecidas usando um processo substancialmente descrito no Exemplo 1, em função da idade da amostra de aférese inicial, isto é, amostras variando no comprimento de tempo (por exemplo, em horas) entre a aférese e seu processamento posterior antes do enriquecimento das células T. Esses dados suportam uma correlação positiva entre a idade da aférese e a presença de células positivas para um marcador apoptótico.

[001191] A correlação entre a presença de células positivas para um marcador apoptótico (por exemplo, caspase ativada 3) no material inicial de células T $CD8^+$ ou $CD4^+$ enriquecidas e vários outros parâmetros ou atributos do material transduzido ou das características do processo ou do produto estão resumidos na Tabela E5. Estes dados suportam adicionalmente a descoberta de que o perfil apoptótico do ma-

terial da célula T inicial está correlacionado com a qualidade da composição terapêutica.

Tabela E5: Correlação de atributo indicada com caspase ativada 3 no material de células T inicial

Atributo	Coeficiente de Correlação	Valor P
Viabilidade de Material Transduzido	-0.49	3.32E-08
Desdobramentos Totais	0.46	1.00E-06
Viabilidade	-0.42	2.56E-06
Idade de Aférese	0.38	4.26E-05
Concentração de Viabilidade Celular	-0.37	3.31E-05
$CCR7^{+}$ $CD27^{+}$	-0.37	1.93E-05
Secreção de IL-2	-0.26	3.78E-03

[001192] Os resultados acima suportam um modelo no qual certas variáveis correlativas associadas a características de um processo e/ou composição de célula T terapêutica CAR^{+} gerada podem prever ou indicar a probabilidade de um objeto apresentar PFS durável. Utilizando árvores de inferência condicional para particionar recursivamente curvas de sobrevivência, nas quais as partições foram realizadas recursivamente até que nenhuma divisão adicional fosse significativa, conforme determinado usando permutações para inferir valores p ajustados pela multiplicidade (correção de Bonferroni), uma árvore de decisão de variáveis que se correlaciona com a durabilidade da PFS foi desenvolvida. O modelo inferiu uma probabilidade aumentada de durabilidade da resposta, na qual as variáveis incluíram um baixo nível de células marcadoras apoptóticas+/$CD3^{+}$/CAR^{+} no material inicial da célula T (por exemplo, células T $CD8^{+}$ enriquecidas), um número relativamente baixo de duplicação de células durante um processo para produzir as composições terapêuticas de células T e uma porcentagem relativamente baixa de células CAR^{+} $CD4^{+}$ entre células da composição terapêutica de células T negativas para citocinas (por exemplo, IL-2 ou TNF) após estimulação independente de antígeno (por

exemplo, responsivo a PMA/ionomicina em um teste de citocina intracelular).

[001193] A presente invenção não se destina a ser limitada em escopo às modalidades particulares divulgadas, as quais são fornecidas, por exemplo, para ilustrar vários aspectos da invenção. Várias modificações nas composições e nos métodos descritos se tornarão aparentes a partir da descrição e dos ensinamentos aqui contidos. Tais variações podem ser praticadas sem se afastar do verdadeiro escopo e espírito da descrição e pretendem se enquadrar no escopo da presente descrição.

Sequências

#	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
1	ESKYGPPCPPCP	espaçador (IgG4dobradiça) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT	espaçador (IgG4dobradiça) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK	dobradiça-CH3 espaçador
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Dobradiça-CH2-CH3 espaçador
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERE TKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQ APVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQ PGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-dobradiça-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRG ENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVE	tEGFR

#	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
	NSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWK YADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 de No. de Registro P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 de No. de Registro P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL a GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 zeta
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIL KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEIS DGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCW GPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTG RGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCT	tEGFR

#	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
	GPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG)5-P- em que P é prolina, G é glicina e S é serina	Ligante
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Ligante
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatccca	Sequência de sinal de cadeia alfa GMCSFR
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	Sequência de sinal de cadeia alfa GMCSFR
26	MALPVTALLLPLALLLHA	Peptídeo de sinal alfa CD8
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Dobradiça
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Dobradiça
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Dobradiça
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Dobradiça
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Dobradiça
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Dobradiça

#	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Dobradiça
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Dobradiça
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY YNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSV TVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGS GEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI WGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3

#	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGD TNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQG TTVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGV PDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Ligante
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGD TNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYN RYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggccag ccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccag ccggctgcacagcggcgtgcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctg gaacaggaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctgg	Sequência de codificação scFv

#	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
	aaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgc aggaaagcggccctggcctggtggcccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccc gactacggcgtgagctggatccggcagcccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagac cacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagat gaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatgga ctactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc	
58	X_1PPX_2P X_1 é glicina, citeína ou arginina X_2 é cisteína ou treonina	Dobradiça
59	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Ligante

REIVINDICAÇÕES

1. Composição terapêutica caracterizada pelo fato de que compreende células T que expressam um receptor recombinante, em que pelo menos em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

2. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos em ou cerca de 50% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

3. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos em ou cerca de 60% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

4. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

5. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos, em ou cerca de ou em ou cerca de 80% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27.

6. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que:

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD4^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$ e $CD4^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos em ou cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos em ou cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD4^+$; e/ou

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em aproximadamente 1:1 ou aproximadamente entre 1:3 e 3:1 ou aproximadamente entre 1:2 e 2:1, células T $CD4^+$:$CD8^+$.

7. Composição terapêutica caracterizada pelo fato de que compreende células T que expressam um receptor recombinante, em que pelo menos cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente em que:

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em células T $CD4^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor

recombinante compreendem ou consistem em células T $CD8^+$ e $CD4^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD8^+$;

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em pelo menos cerca de 30%, 50% 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou 99% ou 100% de células T $CD4^+$; e/ou

as células T na composição e/ou que expressam o receptor recombinante compreendem ou consistem em aproximadamente 1:1 ou aproximadamente entre 1:3 e 3:1 ou aproximadamente entre 1:2 e 2:1, células T $CD4^+$:$CD8^+$.

8. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7.

9. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o número total de células T na composição ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CD27.

10. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o número total de células T na composição, ou o número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e CD27.

11. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a composi-

ção compreende uma ou mais doses unitárias de células.

12. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11,

caracterizada pelo fato de que a dose unitária ou composição compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive; e/ou

em que a dose unitária ou composição compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais.

13. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que a composição ou dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais ou $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais.

14. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de que a dose unitá-

ria ou composição compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e, em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais, e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

15. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou composição, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou composição são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou composição ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou composição são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

16. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que a dose unitária ou composição compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

17. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o número ou razão definidos de cé-

lulas adicionalmente são de células $CD27^+$ ou $CD45RA^-$.

18. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que a dose unitária ou composição compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

19. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o número ou razão definidos de células adicionalmente são de células $CCR7^+$ ou $CD45RA^-$.

20. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizada pelo fato de que a dose unitária ou composição compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$; e/ou a dose unitária ou composição compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

21. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária ou composição, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células $receptor^+$ totais na dose unitária ou composição são $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/ CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ ou receptor ou $+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

22. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizada pelo fato de que a dose unitária ou o número de células que expressam o receptor recombinante

compreende entre pelo menos 1 x 10^5 e pelo ou cerca de 5 x 10^8, entre pelo menos 1 x 10^5 e pelo ou cerca de 1 x 10^8, entre pelo menos 5 x 10^5 e pelo menos 1 x 10^7, ou entre pelo menos 1 x 10^6 e pelo menos 1 x 10^7 células $CD3^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD3^+$) ou células $CD3^+$ totais, cada uma inclusive; e/ou a dose unitária ou o número de células que expressam o receptor recombinante compreende não mais do que cerca de 5 x 10^8, não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6, ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD3^+$ totais ou células $CD3^+$ totais.

23. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizada pelo fato de que o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/ CCR7^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/ CD45RA^-$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/ CD45RA^-$ é o número total de células vivas ou viáveis.

24. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo fato de que o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/ CD4^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/ CCR7^+/ CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$, número total de células re-

ceptor^{+}/CD4^{+}/ CD27^{+}, número total de células receptor^{+}/CD8^{+}/CCR7^{+}/ CD27^{+}, número total de células receptor^{+}/CD8^{+}/CCR7^{+}/CD45RA^{-} e/ou células receptor^{+}/CD8^{+}/CCR7^{+}/CD45RA^{-} é o número total de tais células que não expressam um marcador apoptótico e/ou é o número total de células que são negativas (-) para marcador apoptótico, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou Caspase 3 ativada.

25. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

26. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer.

27. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma da reivindicação 25 ou 26, caracterizada pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado a partir de integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecido como CAIX ou G250), antígeno de câncer de testículo, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina de Motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido

como homólogo 5 do receptor Fc ou FCRH5), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa-2 da IL-13 (IL-13Rα2), receptor do domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro 8 da família A (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos do membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de células neurais (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma preferivelmente expresso (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico de próstata, antígeno de células-tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor tirosina quinase tipo receptor 1 órfão (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecido como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecido como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno, ou um antígeno associado a uma

etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

28. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

29. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno e uma região de sinalização intracelular compreendendo um domínio de sinalização intracelular, e adicionalmente compreende um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

30. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

31. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que o fragmento compreende um scFv.

32. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ), ou uma porção de sinalização da mesma.

33. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, caracterizada pelo fato de que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

34. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma mo-

lécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

35. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização co-estimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

36. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 35, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

37. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizada pelo fato de que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

38. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizada pelo fato de que as células T são autólogas ao objeto.

39. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizada pelo fato de que as células T são alogênicas ao objeto.

40. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 39, caracterizada pelo fato de que o objeto tem um câncer, opcionalmente, em que o câncer é uma leucemia ou um linfoma.

41. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o objeto é um objeto que, no momento da obtenção das células, é identificado ou conhecido por ter uma alta carga tumoral.

42. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que:

o objeto tem alta carga tumoral se uma soma das dimensões do produto (SPD) de um tumor no objeto estiver acima ou em cerca de 30 cm^2, 40 cm^2, 50 cm^2, 60 cm^2 ou 70 cm^2; e/ou

o objeto tem alta carga tumoral se a proteína C reativa (PCR) em uma amostra biológica, opcionalmente uma amostra de soro, estiver acima de 5 miligramas por litro, 10 miligramas por litro, 15 miligramas por litro, 20 miligramas por litro, 25 miligramas por litro, 30 miligramas por litro, 40 miligramas por litro ou 50 miligramas por litro.

43. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que o objeto tem uma alta carga tumoral se a SPD de um tumor no objeto estiver acima ou em cerca de 50 cm^2.

44. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 42 ou 43, caracterizada pelo fato de que o objeto tem uma alta carga tumoral se a PCR estiver acima ou em cerca de 20 miligramas por litro na amostra biológica.

45. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende um recipiente compreendendo uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 44, e instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

46. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende:

um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitárias de células, presentes em uma ou mais composições terapêuticas, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ expressando (opcionalmente modificadas para expressar) um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor

recombinante que expressam (opcionalmente expressam superfície) receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/ CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/ CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

47. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende:

um recipiente, compreendendo uma ou mais doses unitárias de células, presentes em uma ou mais composições terapêuticas, a dose unitária compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ expressando (opcionalmente manipuladas geneticamente para expressar) um receptor recombinante, em que uma dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam (opcionalmente expressam superfície) um conjunto de diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/ CD8$^+$/ CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/ CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais

doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

48. Artigo de fabricação, de acordo com a reivindicação 46 ou reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 44.

49. Método, de tratamento, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um objeto tendo uma doença ou condição uma ou mais doses unitárias de uma composição terapêutica como definida na reivindicação 1 ou 7 ou uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ projetadas para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, opcionalmente em que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição; e/ou

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária variam em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+$; e/ou a dose unitária de células com-

preende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+$.

51. Método de tratamento, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um objeto tendo uma doença ou condição uma ou mais doses unitárias de uma composição terapêutica como definida na reivindicação 1 ou 7, ou uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ projetadas para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, opcionalmente em que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; e/ou

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CD27 (células $CD27^+$) na dose unitária varia não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CD27^+$; e/ou a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CD27^+$.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 52, caracterizado pelo fato de que:

a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e

em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais, ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive;

a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais; e/ou

a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6, ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais ou $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ totais.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 53, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ totais ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7 entre ou em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$ totais ou $receptor^+/CD4^+/CD27^+$

totais, cada uma inclusive.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 54, caracterizado pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49, 50 e 53 a 55, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 55, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ ou uma razão definida de células receptor$^+$/ CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

58. Método, de acordo com a reivindicação 56 ou reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/

CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$; e/ou a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/ CD8$^+$/ CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

59. Método, de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$; e/ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

60. Método de tratamento, caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um objeto tendo uma doença ou condição de uma ou mais doses unitárias de uma composição como definida na reivindicação 1 ou 7.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária variam em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

62. Método de tratamento, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um objeto tendo uma doença ou condição de uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ projetadas para expressar um receptor recombinante e/ou um volume correspondente a tais doses unitárias, em que:

a dose unitária de células compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; e

entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou a razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária variam em não mais do que 40%, não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 62, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+/CCR7^+/CD27^+$; e/ou a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD4^+/CCR7^+/CD27^+$.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 63, caracterizado pelo fato de que:

a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células receptor totais $+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$, cada uma inclusive;

a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais; e/ou

a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 64, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais; e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 65, caracterizado pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 66, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

68. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 67, caracterizado pelo fato de que o número definido de células expressa adicionalmente ou não expressa CD45RA, opcionalmente em que o número definido de células adicionalmente é células CD45RA$^-$.

69. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 68, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^8, entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8 entre ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD3$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD3$^+$) ou células CD3$^+$ totais, cada uma inclusive.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 69, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende não mais do que cerca de 5 x 10^8, não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x

10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD3$^+$ totais ou células CD3$^+$ totais.

71. Método, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/ CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 71, caracterizado pelo fato de que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de tais células que não expressam um marcador apoptótico e/ou é o número total de tais células que são negativas (-) par marcadores apoptóticos, em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase 3 ativada.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 72, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T $CD8^+$ e as células T $CD4^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T $CD8^+$ e as células T $CD4^+$.

75. Método, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a primeira composição compreende as células T $CD8^+$.

76. Método, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a primeira composição compreende as células T $CD4^+$.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 76, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias com não mais de 48 horas de intervalo.

78. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias das mesmas e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias são administrados não mais do que 36 horas de intervalo, não mais do que 24 horas de intervalo, não mais do que 12 horas de intervalo, não mais do que 6 horas de intervalo, não mais do que 4 horas de intervalo, não mais do que 2 horas de intervalo, não mais do que 1 hora de intervalo ou não mais do que 30 minutos de intervalo.

79. Método, de acordo com a reivindicação 77 ou reivindi-

cação 78, caracterizado pelo fato de que a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias é administrada não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

80. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 79, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias antes de administrar a composição contendo células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 73 a 79, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias antes de administrar a composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

82. Método para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente para tratar um objeto, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante

e CCR7 (receptor$^+$/CCR7$^+$); e

(b) com base no número, porcentagem ou razão de células receptor$^+$/CCR7$^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/ CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/ CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/ CD8$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

83. Método para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente para tratar um objeto, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CD27 (receptor$^+$/CD27$^+$); e

(b) com base no número, porcentagem ou razão de células receptor$^+$/CD27$^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam cluster de diferenciação 27 (CD27) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/

$CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ para outro subconjunto de células da posição.

84. Método para produzir uma composição compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica compreendendo uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e/ou CD27 ($receptor^+/CCR7^+$ e/ou $receptor^+/CD27^+$); e

(b) preencher um recipiente com toda ou uma porção da composição e, opcionalmente, outra solução para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) (células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ para células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/ CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição ou um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam cluster de diferenciação 27 (CD27) (células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+/ CD4^+/CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ para células $receptor^+/CD4^+/CD27^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+/CD8^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD4^+/ CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

85. Método para produzir uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, caracterizado pelo fato de que compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que liga especificamente um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) ($receptor^+$/ $CD8^+$/$CCR7^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (células $receptor^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+$/$CD8^+$/ $CCR7^+$ para células $receptor^+$/$CD4^+$/ $CCR7^+$ e/ou uma razão definida de células $receptor^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ e/ou células $receptor^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ para outro subconjunto de células na composição.

86. Método para produzir uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, caracterizado pelo fato de que compreende preencher um recipiente com toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que se liga especificamente um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam aglomerado de diferenciação 27 (CD27) ($receptor^+$/$CD8^+$/ Células $CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (células $receptor^+$/$CD4^+$/ $CD27^+$) e/ou uma razão definida de células $receptor^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ para células $receptor^+$/$CD4^+$/ $CD27^+$ e/ou uma razão definida de células re-

ceptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

87. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 a 86, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou a dose unitária de células compreende um número definido de células CD4$^+$/CCR7$^+$.

88. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 87, caracterizado pelo fato de que:

a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células CD8$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD8$^+$) ou células CD4$^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/CD4$^+$), células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais, ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive;

a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/CD8$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais, células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou

a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$ CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou recep-

tor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 88, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre cerca de 3 x 10^6 e cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre ou em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 89, caracterizado pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$; ou pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$.

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 90, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

92. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 82 a 91, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células $CD27^+$ ou $CD45RA^-$.

93. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 92, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente na composição terapêutica o número, porcentagem ou razão de células T que expressam ou não expressam CD27 e/ou CD45RA, opcionalmente o número, porcentagem ou razão de células T que são $CD27^+$ ou $CD45RA^-$.

94. Método, de acordo com a reivindicação 92 ou reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$ e/ou a dose unitária de células compreende um número definido de células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ e/ou células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

95. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92 a 95, caracterizado pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células $receptor^+$ totais na dose unitária são $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$, $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD45RA^-$, $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ ou $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD45RA^-$.

96. Método para determinar uma dose unitária de células T manipuladas geneticamente para tratar um objeto, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T $CD8^+$ e/ou $CD4^+$ manipuladas geneti-

camente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e CD27 (receptor$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$);

(b) com base no número, porcentagem ou razão de células receptor$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, determinar uma ou mais doses unitárias de células de células para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende um número definido de recombinantes células T CD8$^+$ que expressam receptores que expressam CCR7 e CD27 (células +/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

97. Método para produzir uma composição compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) avaliar, em uma composição terapêutica que compreende uma pluralidade de células T CD8$^+$ e/ou CD4$^+$ manipuladas geneticamente para expressar um receptor recombinante, o número, porcentagem ou razão de células T que expressam o receptor recombinante e CCR7 e CD27 (receptor$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$); e

(b) preencher um recipiente com toda ou uma porção da composição e, opcionalmente, outra solução para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células

receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

98. Método para produzir uma composição terapêutica compreendendo uma dose unitária de uma composição de célula T, caracterizado pelo fato de que compreende preencher toda ou uma porção de uma composição de célula T, a composição de célula T compreendendo células T compreendendo um receptor recombinante que liga especificamente um antígeno associado a uma doença ou condição, para alcançar uma dose unitária da composição de célula T, em que a dose unitária compreende um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/ CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou receptor$^+$/Células CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para outro subconjunto de células na composição.

99. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 98, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ e/ou a dose unitária de células compreende um número definido de células CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

100. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 99, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre ou cerca de 1 x

10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $CD8^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD8^+$) ou células $CD4^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD4^+$), células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais/ $CCR7^+/CD27^+$, cada uma inclusive; a dose unitária compreende não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células $receptor^+/CD8^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+$ totais, células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais ou células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais; e/ou a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ do receptor total.

101. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 100, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $receptor^+/CD8^+/CCR7^+/CD27^+$ totais e/ou entre ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre ou cerca de 4 x 10^6 e a ou em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células $receptor^+/CD4^+/CCR7^+/CD27^+$ totais, cada uma inclusive.

102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 103, caracterizado pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células $receptor^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células $receptor^+$ totais na dose unitária são recep-

tor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$.

103. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96-102, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

104. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 103, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células CD45RA.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 96 a 104, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente na composição terapêutica o número, porcentagem ou razão de células T que expressam ou não expressam CD45RA, opcionalmente o número, porcentagem ou razão de células T que são CD45RA$^-$.

106. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, caracterizado pelo fato de que compreende:

i) fornecer, a partir de uma amostra biológica de um objeto, uma composição de entrada compreendendo uma porcentagem alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem alvo de células T CD4$^+$ que expressam ou fazem não expressar CCR7, CD27 e/ou CD45RA;

ii) introduzir, na composição de entrada, de um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante; e

iii) estimular as células na composição de entrada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, em que a estimulação

compreende incubar as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, os referidos resultados estimulantes na ativação e/ou proliferação das células;

em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/$CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células receptor T +/$CD4^+$ que expressar ou não expressar CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

107. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, caracterizado pelo fato de que compreende a introdução, em uma composição de entrada, de um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, em que a composição de entrada compreende uma porcentagem-alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem-alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA fornecidos a partir de uma amostra biológica de um objeto, e a composição de entrada é estimulada antes de, durante e/ou subsequente à referida introdução por incubação das células na presença de um ou mais agentes estimulantes, a referida estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células; e em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/$CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7,

CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

108. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, caracterizado pelo fato de que compreende:

i) isolar, a partir de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um número alvo de células T CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, gerando assim uma composição de entrada;

ii) introduzir, na composição de entrada, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante; e

iii) estimular as células na composição de entrada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, em que a estimulação compreende incubar as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, os referidos resultados estimulantes na ativação e/ou proliferação das células;

em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/CD8$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

109. Método para gerar uma composição de célula compreendendo células geneticamente modificadas, caracterizado pelo fato de que compreende introduzir, em uma composição de entrada,

um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, em que a composição de entrada é gerada pelo isolamento de uma amostra biológica obtida de um objeto, um número alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou um número alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA, e a composição de entrada é estimulada, antes, durante e/ou subsequente à referida introdução, incubando as células na presença de um ou mais agentes estimulantes, a referida estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células; e em que o método produz uma composição de saída compreendendo uma razão definida de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante (receptor$^+$) que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma razão definida de células T receptor$^+$/$CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou células T receptor$^+$/$CD4^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA para outro subconjunto de células na composição.

110. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 109, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma porcentagem-alvo de células T $CD8^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou uma porcentagem-alvo de células T $CD4^+$ que expressam ou não expresse CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

111. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 110, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma porcentagem alvo de células $CD4^+$/$CCR7^+$, $CD4^+$/$CD27^+$, $CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$, $CD4^+$/$CCR7^+$/$CD45RA^-$, $CD4^+$/$CCR7^+$/CD45RA+, $CD8^+$/$CCR7^+$, $CD8^+$/$CD27^+$, $CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$, $CD8^+$/$CCR7^+$/$CD45RA^-$ e/ou $CD8^+$/$CCR7^+$/CD45RA+.

112. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106-111, caracterizado pelo fato de que a composição de saída compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+, para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+; ou

uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA+ e/ou receptor$^+$/ CD4$^+$/CCR7$^+$, células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$, receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA+ para outro subconjunto de células na composição.

113. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 112, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente determinar uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula T para administração a um objeto tendo uma doença ou condições, em que a dose unitária compreende toda ou uma porção da composição de saída que compreende:

um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam o receptor de quimiocina CC tipo 7 (CCR7) (células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$) e/ou um número definido de células T CD4$^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 (receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para outro subconjunto de células na composição;

um número definido de células T CD8$^+$ expressando receptor recombinante que expressam um cluster de diferenciação 27

(CD27) (células +/$CD8^+$/$CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CD27 (receptor$^+$/ $CD4^+$/Células $CD27^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/ $CD8^+$/$CD27^+$ para células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD8^+$/ $CD27^+$ e/ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição; ou

um número definido de células T $CD8^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/$CD8^+$/ $CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou um número definido de células T $CD4^+$ expressando receptor recombinante que expressam CCR7 e CD27 (células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$) e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ para células receptor$^+$/$CD4^+$/ $CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/$CD8^+$/ $CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ para outro subconjunto de células na composição.

114. Método, de acordo com a reivindicação 113, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células $CD8^+$/$CCR7^+$, células $CD4^+$/$CCR7^+$, células $CD8^+$/ $CD27^+$, células $CD4^+$/$CD27^+$, células $CD8^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ e/ou células $CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$.

115. Método, de acordo com a reivindicação 113 ou 114, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8, entre em ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7, cada uma inclusive, células receptor$^+$/$CD8^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/$CD27^+$ totais, células receptor$^+$/$CD4^+$/$CD27^+$ totais, células receptor$^+$/$CD8^+$/ $CCR7^+$/$CD27^+$ totais ou células receptor$^+$/$CD4^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$ totais.

116. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 113 a 115, caracterizado pelo fato de que:

a dose unitária compreende pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ totais ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou pelo menos cerca de 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6, 9 x 10^6 ou 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou

a dose unitária compreende entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 total células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ totais; e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ totais ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e entre ou em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais e/ou entre em ou cerca de 3 x 10^6 e em ou cerca de 2,5 x 10^7, entre em ou cerca de 4 x 10^6 e em ou cerca de 2 x 10^7, ou entre em ou cerca de 5 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ totais, cada uma inclusive.

117. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 113-116, caracterizado pelo fato de que:

pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%

ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20 % e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ ou receptores+/CD8$^+$/ CD27$^+$;

pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20 % e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$; e/ou

pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20 % e 80%, entre cerca de 30% e 70%, ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ ou receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$/CD27$^+$.

118. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 113 a 117, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$ para células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1; e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, cuja razão opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1; e/ou uma razão definida de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$ para células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$, cuja razão é opcionalmente ou é aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1.

119. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 113 a 118, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células que expressam ou não expressam CD45, opcionalmente em que a dose unitária compreende adicionalmente um número definido de células compreendendo células CD45RA.

120. Método, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que a dose unitária de células compreende um número definido de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 113 a 120, caracterizado pelo fato de que pelo menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% das células receptor$^+$ totais na dose unitária, ou entre cerca de 15% e 90%, entre cerca de 20% e 80%, entre cerca de 30% e 70% ou entre cerca de 40% e 60%, cada uma inclusive, das células receptor$^+$ totais na dose unitária são receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ ou receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$.

122. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 121, caracterizado pelo fato de que antes do fornecimento ou isolamento, o método compreende determinar o número, número por volume, número por peso e/ou porcentagem das células T CD8$^+$ que expressam ou não expressam células CCR7, CD27 e/ou CD45RA e/ou CD4$^+$ que expressam ou não expressam CCR7, CD27 e/ou CD45RA.

123. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 122, caracterizado pelo fato de que os um ou mais agentes estimulantes são capazes de ativar células T, células T CD4$^+$ e/ou células T CD8$^+$; é capaz de induzir um sinal através de um complexo TCR; e/ou é capaz de induzir a proliferação de células T, células T CD4$^+$ e/ou células T CD8$^+$.

124. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 106 a 123, caracterizado pelo fato de que os um ou mais agentes estimulantes compreendem um agente primário que se liga a um membro de um complexo de TCR, opcionalmente que se liga especificamente a CD3.

125. Método, de acordo com a reivindicação 124, caracterizado pelo fato de que os um ou mais agentes estimulantes compreendem adicionalmente um agente secundário que se liga especificamente a uma molécula coestimulatória de célula T.

126. Método, de acordo com a reivindicação 125, caracterizado pelo fato de que a molécula coestimulatória é selecionada a partir do grupo que consiste em CD28, CD137 (4-1BB), OX40 ou ICOS.

127. Método, de acordo com a reivindicação 125 ou 126, caracterizado pelo fato de que os agentes primário e secundário compreendem anticorpos, opcionalmente em que os um ou mais agentes estimulantes compreendem a incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28.

128. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 127, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes estimulantes estão presentes na superfície de um suporte sólido, opcionalmente uma conta.

129. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 106 a 128, caracterizado pelo fato de que os um ou mais agentes estimulantes são selecionados a partir do grupo que consiste em moléculas de ligação a CD3; moléculas de ligação a CD28; IL-2 recombinante; IL-15 recombinante; e IL-7 recombinante, uma vacina compreendendo um antígeno especificamente reconhecido pelo receptor de antígeno e um anticorpo anti-idiotipo que se liga especificamente ao receptor de antígeno ou suas combinações.

130. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 129, caracterizado pelo fato de que a composição terapêuti-

ca é uma composição como definida na reivindicação 1 ou reivindicação 7.

131. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 130, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a administração a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

132. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 131, caracterizado pelo fato de que, entre um grupo de objetos tratados de acordo com o método, o número ou razão de células que expressam CCR7 (células $CCR7^+$) na dose unitária varia em não mais de 40%, por não mais do que 30%, não mais do que 20%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%.

133. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 132, caracterizado pelo fato de que a dose unitária compreende entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 5×10^8, entre em ou cerca de 1×10^5 e em ou cerca de 1×10^8 entre ou cerca de 5×10^5 e em ou cerca de 1×10^7, ou entre em ou cerca de 1×10^6 e em ou cerca de 1×10^7 células $CD3^+$ totais que expressam o receptor recombinante (células $receptor^+/CD3^+$) ou células $CD3^+$ totais, cada uma inclusive; 82 - e/ou a dose unitária não compreende mais que 5×10^8, não mais do que 1×10^8, não mais do que 5×10^7, não mais do que cerca de 1×10^7, não mais do que cerca de 5×10^6, não mais do que cerca de 1×10^6, ou não mais do que cerca de 5×10^5 células $receptor^+/CD3^+$ totais ou células $CD3^+$ totais.

134. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 133, caracterizado pelo fato de que o número total de células $CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD3^+$, número total de células $receptor^+/CD8^+$, número total de células $receptor^+/CD4^+$, número

total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/ CD8$^+$/ CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/ CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/ CCR7$^+$/ CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/ CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de células vivas ou viáveis.

135. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 134, caracterizado pelo fato de que o número total de células CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD3$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD4$^+$/CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD27$^+$, número total de receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/ CD27$^+$, número total de células receptor$^+$/CD8$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ e/ou células receptor$^+$/CD4$^+$/CCR7$^+$/CD45RA$^-$ é o número total de tais células que não expressam um marcador apoptótico e/ou é o número total de tais células que são negativas (-) para marcadores apoptóticos , em que o marcador apoptótico é a Anexina V ou a Caspase 3 ativada.

136. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 131 a 135, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

137. Método, de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo uma das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T CD8$^+$ e as células T CD4$^+$.

138. Método, de acordo com a reivindicação 137, caracteri-

zado pelo fato de que a primeira composição compreende as células T $CD8^+$.

139. Método, de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que a primeira composição compreende as células T $CD4^+$.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 131 a 139, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias com não mais de 48 horas de intervalo.

141. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias das mesmas e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias são administrados com dentro de não mais do que 36 horas de intervalo, dentro de não mais do que 24 horas de intervalo, dentro de não mais do que 12 horas de intervalo, intervalo de não mais do que 6 horas, intervalo de não mais do que 4 horas, com intervalo de não mais do que 2 horas, intervalo de não mais do que 1 hora ou intervalo de não mais do que 30 minutos.

142. Método, de acordo com a reivindicação 140 ou 141, caracterizado pelo fato de que a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais as doses unitárias e/ou o volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias são administradas não

mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo ou simultaneamente.

143. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 136 a 142, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes de administrar a composição contendo células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

144. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 136 a 142, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes de administrar a composição contendo células $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

145. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 144, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

146. Método, de acordo com a reivindicação 145, caracterizado pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou um câncer.

147. Método, de acordo com a reivindicação 145 ou 146, caracterizado pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado a partir da integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conheci-

da como CAIX ou G250), um antígeno de testículo de câncer, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina de Motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinaB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo 5 do receptor Fc ou FCRH5), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Rα2), receptor do domínio de inserção da quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão celular L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos do membro D de grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA),

antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), Receptor tirosina quinase tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada ao tumor (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno, ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

148. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 147, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

149. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 148, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno e uma região de sinalização intracelular compreendendo um domínio de sinalização intracelular e adicionalmente compreende um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

150. Método, de acordo com a reivindicação 149, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

151. Método, de acordo com a reivindicação 150, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende um scFv.

152. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 149 a 151, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinaliza-

ção intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

153. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 149 a 152, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

154. Método, de acordo com a reivindicação 153, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

155. Método, de acordo com a reivindicação 153 ou 154, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

156. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153 a 155, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

157. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 156, caracterizado pelo fato de que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

158. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 137, caracterizado pelo fato de que as células T são autólogas ao objeto.

159. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 137, caracterizado pelo fato de que as células T são alogênicas ao objeto.

160. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 157 a 179, caracterizado pelo fato de que o objeto tem um cân-

$ % $ % ?5 K ; 5% 5 % 5 5% < % !

! - ; $ % $ 8

B < ?5 6 ; 5% 6 ?5 $ % % 68

; 5 $; < 5 D 5% 7

5% !

! - ; $ % $ 8

B < ?5 0

6 % 7 5% 5% % % 8

E 5 G# H 5% 5% 6 % 5 %

3 % $ 2 % $ % $ % 5 % N 5

6 7 5% I , 8

G , H % 5% % 6 7 $ % 5% %

$ 5% 6 % % 7 % $

% 7 % $ % 7 % $ % 7 % $

% 7 % $ 3 % 7 % $ 2 % 7 % 5

% 7 % 5 % 7 % !

3! - ; $ % $ 8

B < ?5 6 % 5% 7 5% #

5% 5% 6 % 5 % % !

2! - ; $ % 5 3$

B < ?5 6 % 5% 7 5%

, % 5 % % 7 % % 8

6 7 !

! , % I B < ?5 ;

5B %; % < % ?5 ?5 5% 8

E 2!

! 5 > B < ?5 ; 8

% 5 5B %; % < % ?5 ?5 5%

E 4 2!

! , % < % =5 B <

que compreende a dose unitária como definida na reivindicação 166.

168. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 167, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um veículo farmacêutico.

169. Método de tratamento, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um mamífero toda ou uma porção da composição de saída como definida na reivindicação 165, uma dose unitária como definida na reivindicação 166 ou uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 167 ou 168.

170. Uso de toda ou uma porção da composição de saída como definida na reivindicação 165, uma dose unitária como definida na reivindicação 166 ou uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 167 ou 168, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento de câncer.

171. Uso de toda ou uma porção da composição de saída como definida na reivindicação 165, uma dose unitária como definida na reivindicação 166 ou uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 167 ou 168, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para tratamento de câncer.

172. Composição de saída, de acordo com a reivindicação 165, uma dose unitária como definida na reivindicação 166 ou uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 167 ou 168, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de câncer.

173. Composição de célula terapêutica caracterizada pelo fato de que compreende células T que expressam um receptor recombinante que se liga a um antígeno, em que, após estimulação com um agente estimulatório:

pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expres-

sam o receptor recombinante são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa; e/ou

pelo menos em ou cerca de, em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

174. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 173, caracterizada pelo fato de que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2 (IL-2) e/ou TNF-alfa.

175. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 174, caracterizada pelo fato de que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

176. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 175, caracterizada pelo fato de que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de citocinas interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

177. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 176, caracterizada pelo fato de

que o agente estimulatório é um agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno.

178. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 177, caracterizada pelo fato de que o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno é um agente estimulatório policlonal.

179. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 178, caracterizada pelo fato de que o agente estimulatório não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina, anti-CD3/anti-CD28, fitohemaglutinina (PHA) ou concanavalina A (ConA).

180. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 177 a 179, caracterizada pelo fato de que o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina.

181. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 176, caracterizada pelo fato de que o agente estimulatório se liga especificamente ao receptor recombinante, opcionalmente, em que o agente estimulatório é um reagente estimulatório específico de antígeno e/ou compreende o antígeno ou uma porção do mesmo especificamente reconhecida pelo receptor recombinante.

182. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 181, caracterizada pelo fato de que a produção das citocinas é medida em um ensaio de citocina intracelular.

183. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 182, caracterizada pelo fato de que a composição compreende pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou no número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante é positivo para a superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente adicionalmente negativo para a expressão de superfície de CD45RA.

184. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 183, caracterizada pelo fato de que as células T são células primárias obtidas a partir de um objeto.

185. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 184, caracterizada pelo fato de que o objeto tem um câncer, opcionalmente, em que o câncer é uma leucemia ou um linfoma.

186. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 185, caracterizada pelo fato de que o objeto é um objeto que, no momento da obtenção das células, é identificado ou conhecido por ter uma alta carga tumoral.

187. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 186, caracterizada pelo fato de que:

o objeto tem alta carga tumoral se uma soma das dimensões do produto (SPD) de um tumor no objeto estiver acima ou em cerca de 30 cm^2, 40 cm^2, 50 cm^2, 60 cm^2 ou 70 cm^2; e/ou

o objeto tem alta carga tumoral se a proteína C reativa (PCR) em uma amostra biológica, opcionalmente uma amostra de soro, estiver acima de 5 miligramas por litro, 10 miligramas por litro, 15 miligramas por litro, 20 miligramas por litro, 25 miligramas por litro, 30 miligramas por litro, 40 miligramas por litro ou 50 miligramas por litro.

188. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 187, caracterizada pelo fato de que o objeto tem uma alta carga tumoral se a SPD de um tumor no objeto estiver acima de 50 cm^2 ou em ou cerca de.

189. Composição de célula terapêutica, de acordo com a reivindicação 187 ou 188, caracterizada pelo fato de que o objeto tem uma alta carga tumoral se a PCR estiver acima ou em cerca de 20 miligramas por litro na amostra biológica.

190. Composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 189, caracterizada pelo fato de que a composição de célula terapêutica é enriquecida em células T $CD4^+$ e/ou pelo menos em ou cerca de 60%, pelo menos em ou cerca de 70%, pelo menos em ou cerca de 80 %, pelo menos em ou cerca de 90%, pelo menos em ou cerca de 95%, pelo menos em ou cerca de 97% das células $receptor^+$ totais recombinantes na composição manipulada geneticamente, ou entre cerca de 60% e 99%, entre cerca de 75% e 99%, entre cerca de 85% e 99%, ou entre cerca de 90% e 99%, cada uma inclusive, do total de células na composição são $CD4^+$.

191. A composição de célula terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 189, caracterizada pelo fato de que a composição de célula terapêutica é enriquecida em células T $CD3^+$, é enriquecida em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e/ou pelo menos em ou cerca de 60%, pelo menos em ou em torno de 70%, pelo menos em ou cerca de 80%, pelo menos em ou cerca de 90%, pelo menos em ou cerca de 95%, pelo menos em ou cerca de 97% do total de células $receptor^+$ recombinantes na composição manipulada geneticamente ou entre cerca de 60% e 99%, entre cerca de 75% e 99%, entre cerca de 85% e 99%, ou entre cerca de 90% e 99%, cada uma inclusive, do total de células na composição são $CD3^+$ ou $CD4^+$ e $CD8^+$.

192. Composição de célula Terapêuticas, de acordo com a reivindicação 191, caracterizada pelo fato de que a composição de célula terapêutica compreende células T $CD4^+$ e $CD8^+$ na razão de células T $CD4^+$ para $CD8^+$ que está entre em ou cerca de 1:3 e aproximadamente 3:1, opcionalmente entre em ou cerca de 1:2 e 2:1.

193. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 192, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante.

194. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 193, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

195. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 194, caracterizada pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou câncer.

196. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 194 ou 195, caracterizada pelo fato de que o antígeno alvo é um antígeno tumoral.

197. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 194 a 196, caracterizada pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado a partir de a integrina αvβ6 (integrina avb6), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecido como CAIX ou G250), antígeno de testículo de câncer, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), ciclina, ciclina A2, ligando 1 de quimiocina de Motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinB2, receptor de efrina A2

(EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo 5 do receptor Fc ou FCRH5), uma proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor 5D acoplado a proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA -A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa de IL-13 (IL-13Rα2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, L1 molécula de adesão celular (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo membro A de família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE -A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos de membro D de grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão celular neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno do melanoma expresso preferivelmente (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico de próstata, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor tirosina quinase semelhante ao receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada ao tumor (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína relacionada à tirosinase 2 (TRP2, também conhecido como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), tumor de Wilms 1 (WT-1), um patógeno es-

pecífico ou antígeno expresso por patógeno, ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

198. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173-197, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou seu fragmento de ligação a antígeno.

199. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 198, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

200. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 199, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno e uma região de sinalização intracelular compreendendo um domínio de sinalização intracelular.

201. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 200, caracterizada pelo fato de que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

202. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 201, caracterizada pelo fato de que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

203. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 201 ou 202, caracterizada pelo fato de que o fragmento compreende um scFv.

204. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 200 a 203, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização

de um componente do receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

205. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 200 a 204, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

206. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 200 a 205, caracterizada pelo fato de que o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

207. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 200 a 206, caracterizada pelo fato de que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

208. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 207, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

209. Composição terapêutica, de acordo com a reivindicação 207 ou 208, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

210. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 207 a 209, caracterizada pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembra-

nar e o domínio de sinalização intracelular.

211. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 210, caracterizada pelo fato de que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

212. Composição terapêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 173 a 211, caracterizada pelo fato de que as células T são autólogas ao objeto.

213. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende um recipiente compreendendo uma composição de célula terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 173 a 212, e instruções para administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, a composição de célula terapêutica, opcionalmente uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

214. Artigo de fabricação, de acordo com a reivindicação 213, caracterizado pelo fato de que as instruções especificam administrar uma pluralidade de doses unitárias contidas em uma pluralidade de composições separadas.

215. Artigo, de acordo com a reivindicação 214, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de composições separadas compreende uma primeira composição compreendendo a composição de célula terapêutica compreendendo uma das células T $CD8^+$ e células T $CD4^+$ e uma segunda composição compreendendo a outra das células T $CD8^+$ e as células T $CD4^+$, a referida segunda composição compreendendo células que expressam o receptor recombinante ou um receptor recombinante específico para o antígeno ou para uma célula expressa pela doença ou condição opcionalmente, em que a segunda composição é uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 40.

216. Artigo de fabricação, de acordo com a reivindicação

215, caracterizado pelo fato de que as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias e a composição contendo células T $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias com dentro de não mais do que 48 horas de intervalo, dentro de não mais do que 36 horas de intervalo, dentro de não mais do que 24 horas de intervalo, dentro de não mais do que 12 horas de intervalo, dentro de não mais do que 6 horas de intervalo, dentro de não mais do que 2 horas de intervalo, dentro de não mais do que 1 hora de intervalo ou simultaneamente.

217. Artigo, de acordo com a reivindicação 215 ou 216, caracterizado pelo fato de que as instruções especificam administrar a composição contendo células T $CD8^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias, antes da administração da composição contendo células $CD4^+$ ou uma ou mais doses unitárias da mesma e/ou um volume correspondente a tais uma ou mais doses unitárias.

218. Método de tratamento, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um objeto tendo uma doença ou condição uma ou mais doses unitárias de uma composição de célula terapêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 173-212.

219. Método, de acordo com a reivindicação 218, caracterizado pelo fato de que a composição terapêutica é uma primeira composição de célula terapêutica compreendendo uma das células T $CD8^+$ e células T $CD4^+$ e as uma ou mais doses unitárias compreende adicionalmente uma segunda composição de célula terapêutica compreendendo a outra das células T $CD8^+$ e células $CD4^+$, a referida segunda composição compreendendo células que expressam o receptor recombinante ou um receptor recombinante específico para o antígeno

ou para uma célula expressa pela doença ou condição, opcionalmente em que a segunda composição é uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 173-212.

220. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que pelo menos em ou cerca de, ou em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na segunda composição de célula terapêutica ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27, opcionalmente adicionalmente negativos para a expressão de superfície de CD45RA.

221. Método, de acordo com a reivindicação 219 ou 220, caracterizado pelo fato de que a segunda composição de célula terapêutica é enriquecida em células T $CD8^+$ e/ou pelo menos em ou cerca de 60%, pelo menos em ou cerca de 70%, pelo menos em ou cerca de 80%, pelo menos em ou cerca de 90%, pelo menos em ou cerca de 95%, pelo menos em ou cerca de 97% das células $receptor^+$ totais recombinantes na composição manipulada geneticamente, ou entre cerca de 60% e 99%, entre cerca de 75% e 99%, entre cerca de 85% e 99%, ou entre cerca de 90% e 99%, cada uma inclusive, do total de células na composição são $CD8^+$.

222. Método, de acordo com a reivindicação 221, caracterizado pelo fato de que a primeira composição terapêutica e a segunda composição terapêutica são administradas dentro de ou em ou cerca de 48 horas, dentro de ou em ou cerca de 36 horas, dentro de ou em ou cerca de 24 horas, dentro de ou em ou cerca de 24 horas, dentro de ou em ou cerca de 12 horas, dentro de ou cerca de 6 horas, dentro de ou em ou cerca de 2 horas ou dentro de ou em ou cerca de 1 hora um da outra.

223. Método, de acordo com a reivindicação 221 ou 222,

caracterizado pelo fato de que a segunda composição de célula terapêutica compreendendo as células T $CD8^+$ é administrada antes da primeira composição compreendendo células T $CD4^+$.

224. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 223, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais doses unitárias de células compreende uma razão definida de células T $CD4^+$ para $CD8^+$, cuja razão é ou é aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1, opcionalmente que é ou é aproximadamente 1:2 e 2:1, opcionalmente é ou é aproximadamente 1:1.

225. Método para tratamento de um objeto, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) testar uma composição de célula manipuladas geneticamente compreendendo células T que expressam um receptor recombinante para um fator indicativo da função ou fenótipo de células manipuladas geneticamente na composição, o fator selecionado a partir de (i) a porcentagem de células T expressando o receptor recombinante que são positivas para superfície para CCR7 e/ou CD27 e, opcionalmente, negativas para superfície para CD45RA; e/ou (ii) a porcentagem de células T $CD4^+$ que expressam o receptor recombinante que são capazes de produzir IL-2, TNF-alfa e/ou IFN-gama após estimulação com um agente estimulatório; e

(b) administrar a um objeto tendo uma doença ou condicionar uma terapia, a administração selecionada a partir de:

(1) se um fator indicativo da função ou fenótipo de células da composição de célula T manipulada geneticamente estiver igual ou acima de um valor limite, administrar ao objeto uma ou mais doses unitárias de células, uma composição de célula manipuladas geneticamente compreendendo células T que expressam um receptor recombinante; ou

(2) se o fator indicativo da função ou fenótipo de células da

composição de célula T manipulada geneticamente estiver abaixo de um valor limite do fator, administrar uma terapia selecionada a partir de (a) uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula manipuladas geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia de T células da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, (b) uma dose aumentada de células da composição de célula manipulada geneticamente, opcionalmente aumentada em comparação com as uma ou mais doses unitárias administradas a um objeto similarmente situado tendo a mesma doença ou condição, mas exibindo o valor limite do fator ou maior; ou (c) um tratamento terapêutico alternativo para tratar a doença ou condição diferente de uma ou mais doses unitárias da composição de célula manipulada geneticamente,

em que o valor limite do fator é selecionado a partir de

(i) em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou

(ii) em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do total o número de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante é capaz de produzir interleucina 2 (IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou

(iii) em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório.

226. Método para tratamento de um objeto, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um objeto tendo uma doença ou condição, uma terapia, a administração selecionada a partir de:

(1) se um fator indicativo de uma função ou fenótipo de células de uma composição de célula manipulada geneticamente compreendendo células T que expressam um receptor recombinante estiver igual ou acima de um valor-limite, administrar ao objeto uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula T manipulada geneticamente; ou

(2) se o fator indicativo da função ou fenótipo das células da composição de célula T manipulada geneticamente estiver abaixo de um valor-limite do fator, administrar uma terapia selecionada a partir de (a) uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula manipulada geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia de células T da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, (b) uma dose aumentada de células da composição de célula manipulada geneticamente, opcionalmente aumentada em comparação com as uma ou mais doses unitárias administradas ao objeto similarmente situado tendo a mesma doença ou condição, mas exibindo o valor limite do fator ou superior; ou (c) um tratamento terapêutico alternativo para o tratamento da doença ou condição diferente de uma dose da composição de célula manipulada geneticamente,

em que o valor limite do fator é selecionado a partir de

(i) em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou

(ii) em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante é capaz de produzir interleucina 2 (IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou

(iii) em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório.

227. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 226, caracterizado pelo fato de que as células da composição de célula são autólogas ao objeto.

228. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 227, caracterizado pelo fato de que pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60% ou pelo menos 70% ou pelo menos 75% dos objetos tratados de acordo com o método obtém sobrevida livre de progressão por pelo menos 3 meses, pelo menos 4 meses, pelo menos 5 meses, pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses ou pelo menos 12 meses após a administração de uma ou mais doses unitárias.

229. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 228, caracterizado pelo fato de que pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60% ou pelo menos 70% ou pelo menos 75% dos objetos tratados de acordo com o método não alcança a progressão da doença por pelo menos em ou cerca de 3 meses, pelo menos em ou cerca de 4 meses, pelo menos em ou cerca de 5 meses, pelo menos em ou cerca de 6 meses, pelo menos em ou cerca de 9 meses ou pelo menos em ou cerca de ou cerca de 12 me-

ses após a administração de uma ou mais doses unitárias.

230. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 229, caracterizado pelo fato de que os objetos tratados de acordo com o método atingem uma propriedade farmacocinética das células da composição de célula em uma amostra biológica, opcionalmente uma amostra de sangue ou soro, que é melhorada, em média, em comparação com um grupo de objetos situados similarmente, tendo a mesma doença ou condição e administrados com uma dose similar de uma composição de célula autóloga compreendendo células T que expressam o receptor recombinante, mas no qual o fator indicativo de função ou fenótipo de células está abaixo do valor limite.

231. Método, de acordo com a reivindicação 230, caracterizado pelo fato de que a propriedade farmacocinética é a exposição total ao longo do tempo (AUC) ou número máximo de células na amostra biológica.

232. Método para prever a probabilidade de resposta a uma composição terapêutica de células T, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) testar uma composição de célula manipuladas geneticamente compreendendo células T que expressam um receptor recombinante para um fator indicativo da função ou fenótipo de células manipuladas geneticamente na composição, o fator selecionado a partir de (i) a porcentagem de células T expressando o receptor recombinante que são positivas para superfície para CCR7 e/ou CD27 e, opcionalmente, negativas para superfície para CD45RA; e/ou (ii) a porcentagem de células T $CD4^+$ que expressam o receptor recombinante que são capazes de produzir IL-2, TNF-alfa e/ou IFN-gama após estimulação com um agente estimulatório; e

(b) determinar a probabilidade de resposta após a administração de uma terapia celular compreendendo uma dose das células

manipuladas geneticamente, em que se o fator estiver em ou acima de um valor limite, identificar o objeto como provável de alcançar uma resposta durável ou sobrevivência livre de progressão, opcionalmente por pelo menos 3 meses, após a administração da terapia; ou se o fator estiver abaixo de um valor limite, identificar o objeto como não provável de exibir uma resposta durável ou sobrevida livre de progressão à terapia,

em que o valor limite do fator é selecionado a partir de:

(i) em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou

(ii) em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do total o número de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir interleucina 2 (IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou

(iii) em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório.

233. Método, de acordo com a reivindicação 232, caracterizado pelo fato de que as células da composição de célula são autólogas ao objeto.

234. Método, de acordo com a reivindicação 232 ou 233, caracterizado pelo fato de que se o objeto é identificado como provável de alcançar uma resposta durável ou sobrevida livre de progressão à

terapia, administrar ao objeto uma ou mais doses unitárias de células da composição de célula T manipulada geneticamente.

235. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 231, 233 e 234, caracterizado pelo fato de que uma ou mais doses unitárias compreendem entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 5 x 10^8, entre em ou cerca de 1 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^8, entre em ou cerca de 5 x 10^5 e em ou cerca de 1 x 10^7, ou entre em ou cerca de 1 x 10^6 e em ou cerca de 1 x 10^7 células T totais que expressam o receptor recombinante (células receptor$^+$/T) ou células T total, cada uma inclusive.

236. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 231 e 233 a 235, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais doses unitárias compreendem não mais do que cerca de 5 x 10^8, não mais do que cerca de 1 x 10^8, não mais do que cerca de 5 x 10^7, não mais do que cerca de 1 x 10^7, não mais do que cerca de 5 x 10^6, não mais do que cerca de 1 x 10^6 ou não mais do que cerca de 5 x 10^5 células receptor$^+$/T totais ou células T totais.

237. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 225 a 236, caracterizado pelo fato de que o valor limite do fator está em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante positivas para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou

238. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 225 a 237, caracterizado pelo fato de que o valor limite do fator está em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T CD4$^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir uma citocina selecionada a partir da interleucina 2

(IL-2) e/ou TNF-alfa .

239. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 225 a 238, caracterizado pelo fato de que o valor limite do fator está em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para produzir duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

240. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 225 a 239, caracterizado pelo fato de que o valor limite do fator está em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de citocinas interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa.

241. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 232 a 240, caracterizado pelo fato de que se o objeto é identificado como não provável de alcançar uma resposta durável ou sobrevivência livre de progressão, administrar ao objeto uma terapia selecionada a partir de (a) uma dose de células da composição de célula manipulada geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia das células T da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, (b) uma dose aumentada de células da composição de célula manipulada geneticamente, opcionalmente aumentada em comparação com uma dose administrada a um objeto similarmente situado tendo a mesma doença ou condição, mas exibindo uma probabilidade de alcançar sobrevida livre de progressão ou uma resposta durável à terapia celular; ou (c) um tratamento terapêutico alternativo para o tratamento da doença ou condição diferente de uma dose da composição de célula manipulada geneticamente.

242. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 225 a 231 e 241, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar uma terapia compreendendo uma dose de células da composição de célula manipulada geneticamente e um agente capaz de aumentar a expansão, proliferação ou eficácia das células T da composição de célula manipulada geneticamente no objeto, em que o agente é um anticorpo anti-idiotipo ou um fragmento de ligação a antígeno específico para o CAR, um inibidor do ponto de verificação imune, um modulador de uma via metabólica, um antagonista do receptor de adenosina, um inibidor de quinase, um anti-TGFβ anticorpo ou um anticorpo anti-TGFβR ou uma citocina.

243. Método, de acordo com a reivindicação 242, caracterizado pelo fato de que o agente é administrado antes, simultaneamente ou após a administração da composição terapêutica de células T.

244. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 242, caracterizado pelo fato de que o objeto é um objeto que, no momento da análise e/ou antes da administração, é identificado ou conhecido por apresentar uma alta carga tumoral.

245. Método, de acordo com a reivindicação 244, caracterizado pelo fato de que:

o objeto tem alta carga tumoral se uma soma das dimensões do produto (SPD) de um tumor no objeto estiver acima ou em cerca de 30 cm^2, 40 cm^2, 50 cm^2, 60 cm^2 ou 70 cm^2; e/ou

o objeto tem alta carga tumoral se a proteína C reativa (PCR) em uma amostra biológica, opcionalmente uma amostra de soro, estiver acima de 5 miligramas por litro, 10 miligramas por litro, 15 miligramas por litro, 20 miligramas por litro, 25 miligramas por litro, 30 miligramas por litro, 40 miligramas por litro ou 50 miligramas por litro.

246. Método, de acordo com a reivindicação 245, caracterizado pelo fato de que o objeto tem uma alta carga tumoral se a SPD de um tumor no objeto estiver acima ou em cerca de 50 cm^2.

247. Método, de acordo com a reivindicação 245 ou 246, caracterizado pelo fato de que o objeto tem uma alta carga tumoral se a PCR estiver acima ou em cerca de 20 miligramas por litro na amostra biológica.

248. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 225 a 247, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório é um agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno.

249. Método, de acordo com a reivindicação 248, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno é um agente estimulatório policlonal.

250. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 248 ou 249, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina, anti-CD3/anti-CD28, fito-hemaglutinina (PHA) ou concanavalina A (ConA).

251. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 248 a 250, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina.

252. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 225 a 247, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório se liga especificamente ao receptor recombinante, opcionalmente, em que o agente estimulatório é um reagente estimulatório específico de antígeno e/ou compreende o antígeno ou uma porção do mesmo especificamente reconhecida pelo receptor recombinante.

253. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 225 a 252, caracterizado pelo fato de que a produção das citocinas é medida em um ensaio de citocina intracelular.

254. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 253, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é ou compreende um receptor quimérico e/ou um receptor de antígeno recombinante.

255. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 254, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno alvo que é associado a, específico a e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

256. Método, de acordo com a reivindicação 255, caracterizado pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou um tumor ou câncer.

257. Método, de acordo com a reivindicação 255 ou 256, caracterizado pelo fato de que o antígeno alvo é um antígeno tumoral.

258. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 255 a 257, caracterizado pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado a partir de a integrina αvβ6 (integrina avb6), maturação de células B no antígeno (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de testículo de câncer, antígeno de câncer/testículo 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, ligando 1 da quimiocina de Motivo C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrinB2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estro-

gênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo do receptor Fc 5 ou FCRH5), uma proteína de ligação a folato (FBP), proteína de ligação a folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), receptor 5D acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (receptor tirosina quinase erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado a melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa IL-22 (IL-22Rα), receptor alfa-2 de IL-13 (IL-13Rα2), receptor de domínio de inserção de quinase (kdr), cadeia leve de capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítopo CE7 de L1-CAM, repetição rica em leucina contendo Membro A da família 8 (LRRC8A), Lewis Y, antígeno associado a melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligandos do membro D do grupo 2 de assassinas naturais (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de células neurais (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno do melanoma (PRAME) expresso preferivelmente, receptor de progesterona, um receptor específico de próstata antígeno, antígeno de células tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor tirosina quinase tipo receptor órfão 1 (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecido como 5T4), glicoproteína 72 associada ao tumor (TAG72), proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como tautomerase dopacromada, delta-isomerase dopacromada ou DCT), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor de Wilms 1 (WT-1), um antí-

geno específico de patógeno ou expresso por patógeno ou um antígeno associado a uma etiqueta universal e/ou moléculas biotiniladas, e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos.

259. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 258, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou ao TCR ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

260. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 259, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

261. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 260, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno e uma região de sinalização intracelular compreendendo um domínio de sinalização intracelular.

262. Método, de acordo com a reivindicação 261, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação a antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

263. Método, de acordo com a reivindicação 262, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

264. Método, de acordo com a reivindicação 262 ou 263, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende um scFv.

265. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 261 a 264, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um receptor de célula T (TCR) e/ou um domínio de sinalização compreendendo um

motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptora (ITAM).

266. Método, de acordo com a reivindicação 265, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ) ou uma porção de sinalização da mesma.

267. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 261 a 266, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante compreende adicionalmente um domínio transmembranar disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

268. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 261 a 267, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização intracelular compreende adicionalmente um domínio de sinalização coestimulatório.

269. Método, de acordo com a reivindicação 268, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

270. Método, de acordo com a reivindicação 268 ou 269, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos.

271. Método, de acordo com a reivindicação 269 ou 270, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização coestimulatório está entre o domínio transmembranar e o domínio de sinalização intracelular.

272. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 218 a 271, caracterizado pelo fato de que as células T são células T primárias obtidas a partir de um objeto.

273. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 218 a 272, caracterizado pelo fato de que as células T são autólogas ao objeto.

274. Método para produzir uma composição terapêutica de células T, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) incubar uma composição de entrada sob condições estimulantes, gerando assim uma composição estimulada, em que a composição de entrada compreende um número definido de células T que não expressam um marcador apoptótico (negativas (-) para marcador apoptótico); e

(b) introduzir um receptor recombinante nas células a partir da composição estimulada, gerando assim uma composição de célula manipulada geneticamente, em que a introdução compreende o contato das células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante.

275. Método, de acordo com a reivindicação 274, caracterizado pelo fato de que as células T negativas para marcador apoptótico são ou compreendem células $CD3^+$ negativas para marcador apoptótico, células $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico, células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico, células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico ou células $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico e células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico.

276. Método, de acordo com a reivindicação 274 ou 275, caracterizado pelo fato de que o marcador apoptótico é a Anexina V.

277. Método, de acordo com a reivindicação 274 ou reivindicação 275, caracterizado pelo fato de que o marcador apoptótico é ativado Caspase 3.

278. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 276, caracterizado pelo fato de que o número definido de células T compreende pelo menos 50 x 10^6 das células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente células T $CD4^+$ negativas

para marcador apoptótico e/ou células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico.

279. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 278, caracterizado pelo fato de que o número definido de células T compreende pelo menos 100 x 10^6 das células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico.

280. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 279, caracterizado pelo fato de que o número definido de células T compreende entre cerca de 100 x 10^6 e cerca de 500 x 10^6 células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente células T $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico.

281. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 280, caracterizado pelo fato de que o número definido de células T compreende cerca de 300 x 10^6 células T negativas para marcador apoptótico, opcionalmente células T $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico.

282. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 281, caracterizado pelo fato de que a porcentagem de células T negativas para marcador apoptótico como uma porcentagem do total de células T na composição de entrada é maior do que ou maior do que cerca de 70%, maior do que ou maior do que cerca de 80 %, maior do que ou maior do que cerca de 90%, ou maior do que ou maior do que cerca de 95%.

283. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 282, caracterizado pelo fato de que, antes de incubar, obter uma composição de entrada compreendendo o número definido de

células T negativas para marcadores apoptóticos.

284. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 283, caracterizado pelo fato de que, antes de incubar, isolar, selecionar ou enriquecer células T negativas com marcador apoptótico, opcionalmente células $CD4^+$ negativas com marcador apoptótico e/ou células T $CD8^+$ negativas com marcador apoptótico a partir de uma amostra biológica.

285. Método para produzir uma composição terapêutica de células T, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) isolar, selecionar ou enriquecer, a partir de uma amostra biológica, uma população de células T que não expressam um marcador apoptótico (negativas (-) para marcador apoptótico), opcionalmente células $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e/ou $CD8^+$ negativas marcador apoptótico, obtendo assim uma composição de entrada.

(b) incubar a composição de entrada sob condições estimulantes, gerando assim uma composição estimulada; e

(c) introduzir um receptor recombinante nas células a partir da composição estimulada, gerando assim uma composição de célula manipulada geneticamente, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante.

286. Método, de acordo com a reivindicação 284 ou 285, caracterizado pelo fato de que as células T primárias da amostra biológica obtidas a partir de um objeto.

287. Método, de acordo com a reivindicação 286, caracterizado pelo fato de que o objeto é um objeto humano.

288. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 284 a 287, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é ou compreende uma amostra de sangue total, uma amostra de buffy coat, uma amostra de células mononucleares do sangue periférico

(PBMC), uma amostra de célula T não fracionada, uma amostra de linfócitos, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aférese ou um produto de leucaférese.

289. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 284 a 288, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica compreende um produto de aférese ou um produto de leucaferese.

290. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 284 a 289, caracterizado pelo fato de que: as células T são isoladas, selecionadas ou enriquecidas a partir da amostra biológica não mais de 36 horas depois de serem obtidas a partir de um objeto.

291. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 284 a 289, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é criocongelada na presença de um crioprotetor não mais de 36 horas após ser obtida do objeto e descongelada antes de isolar, selecionar ou enriquecer as células, opcionalmente em que a amostra criocongelada é descongelada imediatamente antes ou dentro de não mais de 6 horas, não mais de 4 horas, não mais de 2 horas ou não mais de 1 hora antes de isolar, selecionar ou enriquecer as células.

292. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 291, caracterizado pelo fato de que a incubação é realizada na presença de uma ou mais citocinas, opcionalmente em um meio livre de soro.

293. Método, de acordo com a reivindicação 292, caracterizado pelo fato de que uma ou mais citocinas são selecionadas a partir de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante e/ou IL-15 recombinante.

294. Método, de acordo com a reivindicação 293, caracterizado pelo fato de que uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 UI/mL de IL-2 recombinante; entre 100 UI/mL e 1.000 UI/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 UI/mL de IL-15 recombinante.

295. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 274 a 294, caracterizado pelo fato de que o reagente estimulatório compreende um agente primário que se liga especificamente a um membro de um complexo TCR, opcionalmente que se liga especificamente a CD3, opcionalmente em que o agente primário é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

296. Método, de acordo com a reivindicação 295, caracterizado pelo fato de que o reagente estimulatório compreende adicionalmente um agente secundário que se liga especificamente a uma molécula coestimulatória de célula T, opcionalmente em que a molécula coestimulatória é selecionada a partir de CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 ou ICOS, opcionalmente, em que o agente secundário é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

297. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 296, caracterizado pelo fato de que o reagente estimulatório compreende a incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, ou um fragmento de ligação a antígeno.

298. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 295 a 297, caracterizado pelo fato de que o agente primário e/ou agente secundário estão presentes na superfície de um suporte sólido.

299. Método, de acordo com a reivindicação 298, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido é ou compreende uma conta.

300. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 295 a 299, caracterizado pelo fato de que o agente primário e o agente secundário são imobilizados ou reversivelmente ligados na superfície de um reagente de partículas oligoméricas compreendendo uma pluralidade de moléculas de estreptavidina ou estreptavidina-muteína

301. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 300, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada é incubada sob condições estimulantes por entre 12 horas e 36

horas, cada uma inclusive, opcionalmente, em ou cerca de 24 horas.

302. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 301, caracterizado pelo fato de que o contato é realizado por transdução viral, opcionalmente com um vetor retroviral, opcionalmente um vetor lentiviral.

303. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 302, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente cultivar a composição manipulada geneticamente sob condições para promover a proliferação e/ou expansão das células manipuladas geneticamente, produzindo assim uma composição de saída compreendendo as células T manipuladas geneticamente.

304. Método, de acordo com a reivindicação 303, caracterizado pelo fato de que o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas, opcionalmente em um meio livre de soro.

305. Método, de acordo com a reivindicação 304, caracterizado pelo fato de que uma ou mais citocinas são selecionadas a partir de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante e/ou IL-15 recombinante.

306. Método, de acordo com a reivindicação 304 ou 305, caracterizado pelo fato de que uma ou mais citocinas compreendem: entre 50 e 400 UI/mL de IL-2 recombinante; entre 100 UI/mL e 2.000 UI/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 50 e 400 UI/mL de IL-15 recombinante.

307. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 306, caracterizado pelo fato de que:

a composição de entrada compreende células T $CD4^+$ e células T $CD8^+$ a uma razão entre 2:1 e 1:2 de células T $CD4^+$ para $CD8^+$; ou

a composição de entrada compreende células T $CD4^+$ negativas para marcador apoptótico e células T $CD8^+$ negativas para marcador apoptótico a uma razão entre 2:1 e 1:2 de células T $CD4^+$

para $CD8^+$.

308. Método, de acordo com a reivindicação 307, caracterizado pelo fato de que as células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ são selecionadas separadamente, isoladas ou enriquecidas a partir da mesma amostra biológica ou de uma amostra e combinadas antes da incubação.

309. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 274 a 308, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

310. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 303 a 309, caracterizado pelo fato de que a composição de saída compreende:

pelo menos em ou cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T na composição ou do número total de células T na composição que expressam o receptor recombinante, são positivos para superfície para CCR7 e/ou CD27; e/ou

pelo menos em ou cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são capazes de produzir interleucina 2 (IL-2) ou TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório; e/ou

pelo menos em ou cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% ou mais do número total de células T $CD4^+$ na composição que expressam o receptor recombinante são polifuncionais para a produção de duas ou mais citocinas selecionadas dentre interferon-gama (IFN-gama), interleucina 2 (IL-2) e TNF-alfa após estimulação com um agente estimulatório.

311. Método, de acordo com a reivindicação 310, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório é um agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno.

312. Método, de acordo com a reivindicação 311, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno é um agente estimulatório policlonal.

313. Método, de acordo com a reivindicação 311 ou 312, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina, anti-CD3/anti-CD28, fito-hemaglutinina (PHA) ou concanavalina A (ConA).

314. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 311 a 313, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório de célula T não específico ou não dependente de antígeno compreende PMA/ionomicina.

315. Método, de acordo com a reivindicação 310, caracterizado pelo fato de que o agente estimulatório se liga especificamente ao receptor recombinante, opcionalmente em que o agente estimulatório é um reagente estimulatório específico de antígeno e/ou compreende o antígeno ou uma porção do mesmo especificamente reconhecida pelo receptor recombinante.

316. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 310 a 315, caracterizado pelo fato de que a produção das citocinas é medida em um ensaio de citocina intracelular.

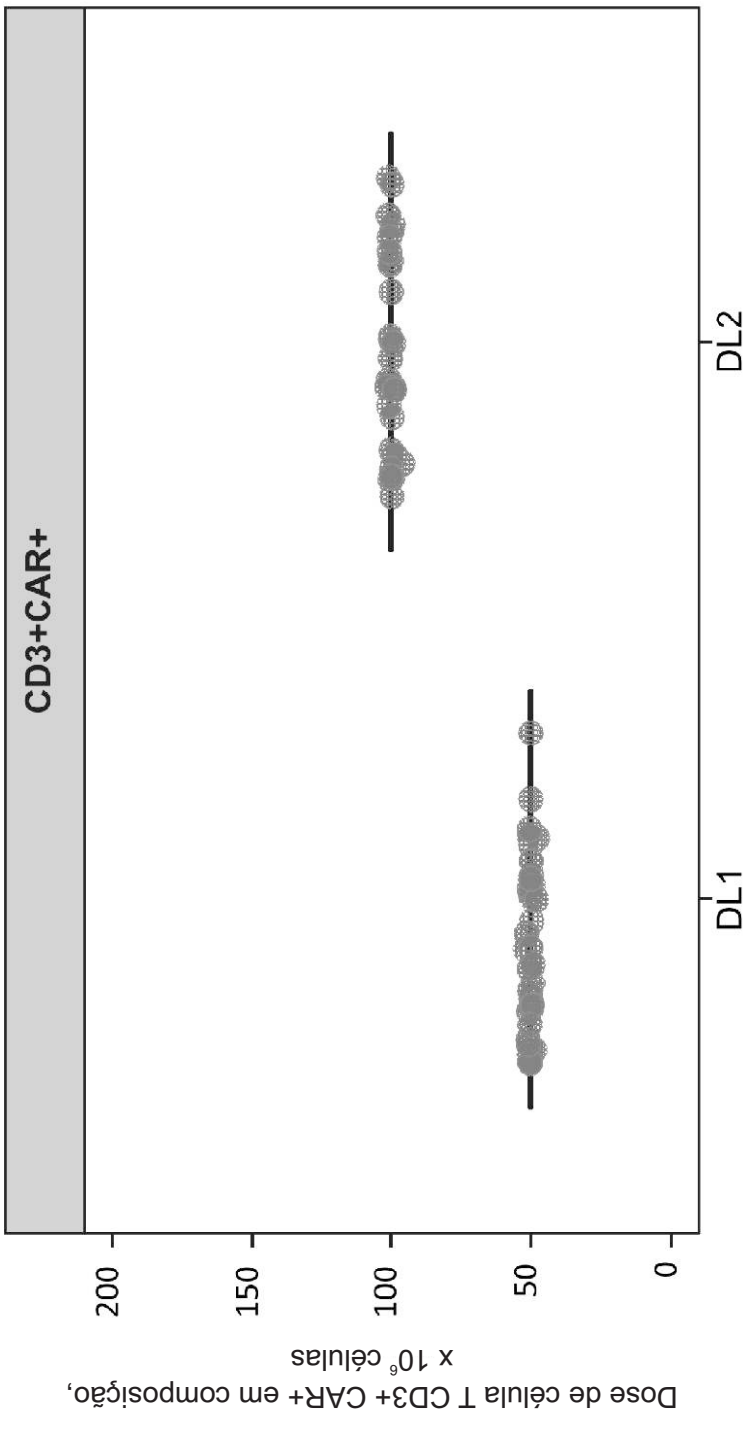
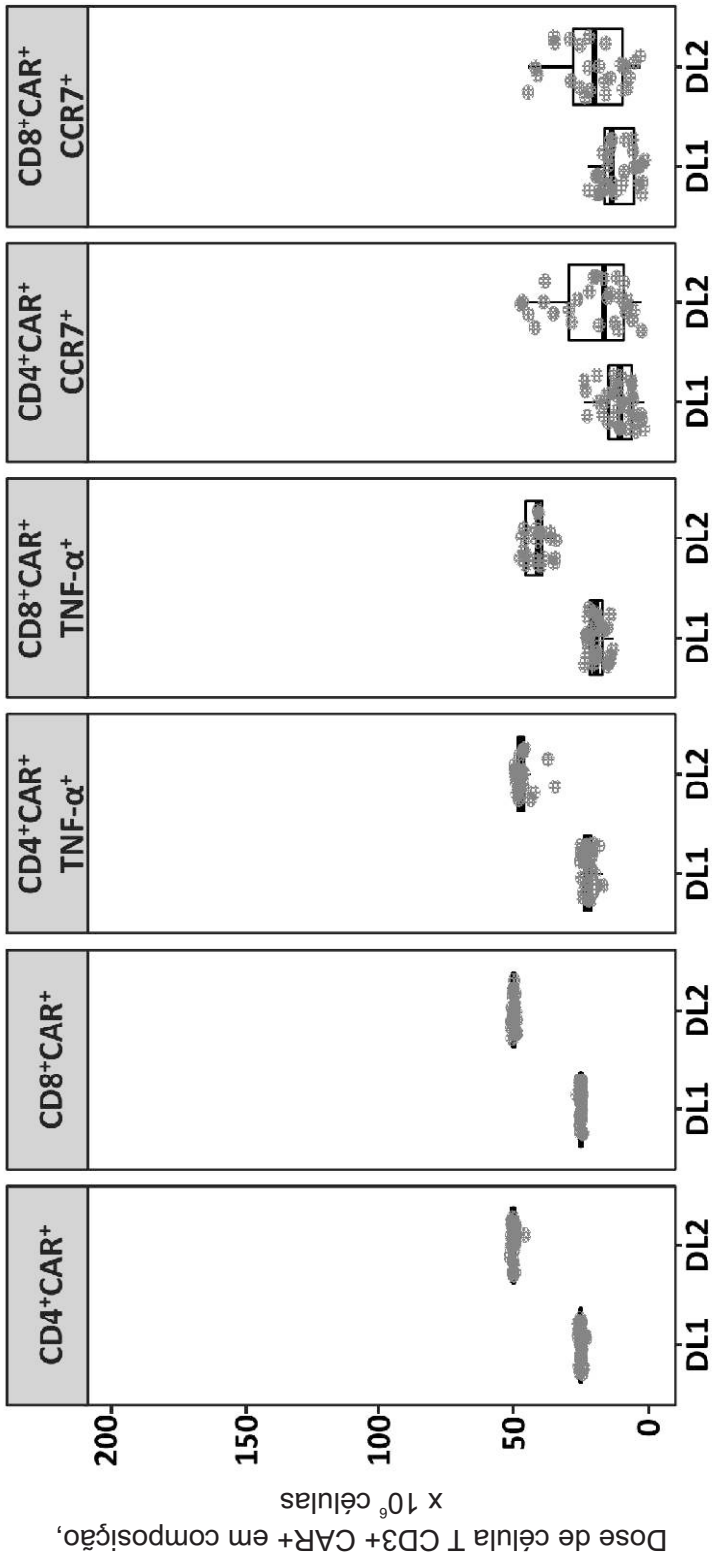

CD3+CAR+
Dose de célula T CD3+ CAR+ em composição, x 10^6 células
200
150
100
50
0
DL1
DL2

FIG. 1A

FIG. 1B


Dose de célula T CD3+ CAR+ em composição, x 10^6 células
200
150
100
50
0
CD4+CAR+
CD8+CAR+
CD4+CAR+ TNF-α+
CD8+CAR+ TNF-α+
CD4+CAR+ CCR7+
CD8+CAR+ CCR7+
DL1
DL2

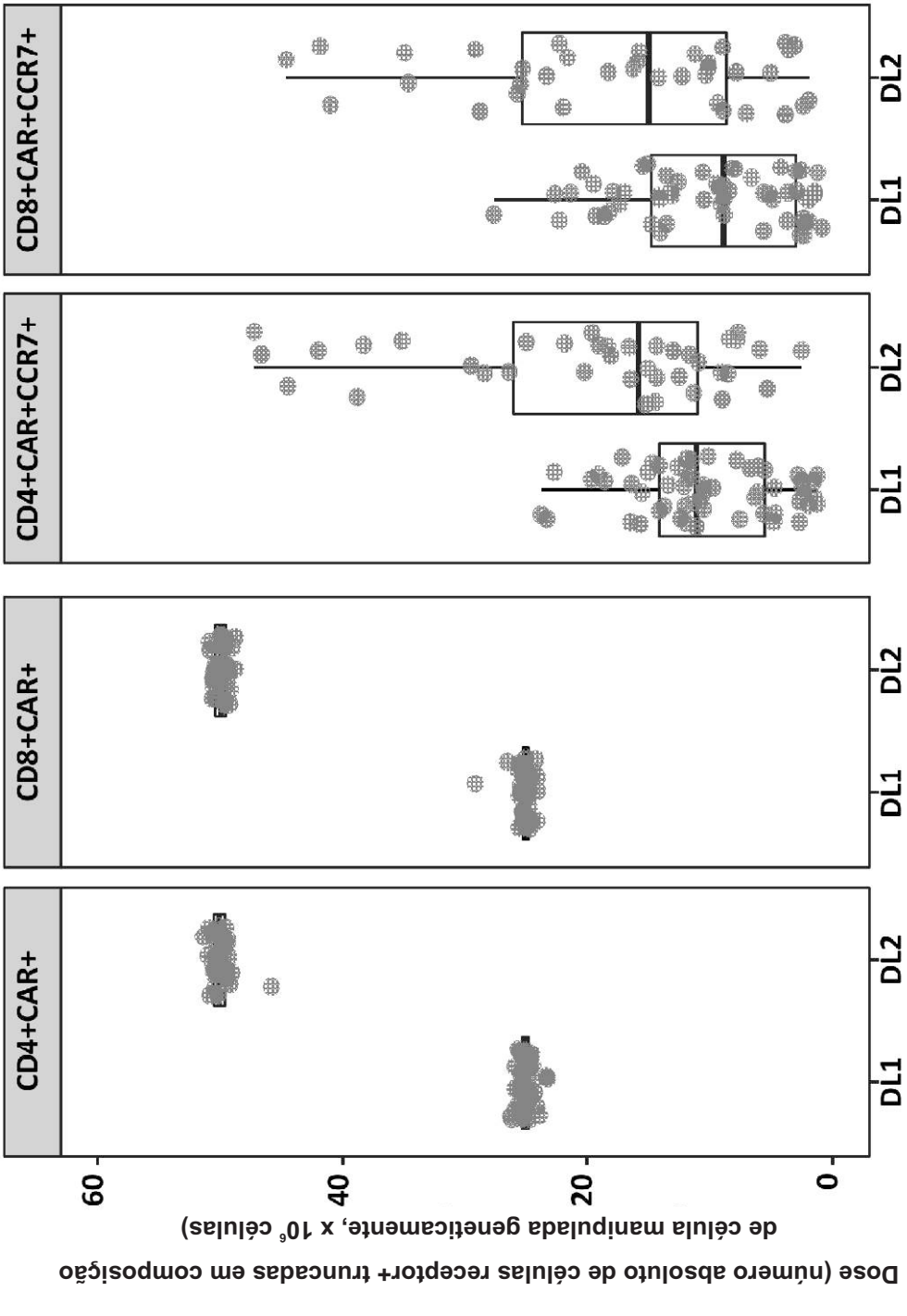

Dose (número absoluto de células receptor+ truncadas em composição de célula manipulada geneticamente, x 10⁶ células)
0
20
40
60
CD4+CAR+
CD8+CAR+
CD4+CAR+CCR7+
CD8+CAR+CCR7+
DL1
DL2

FIG. 1C

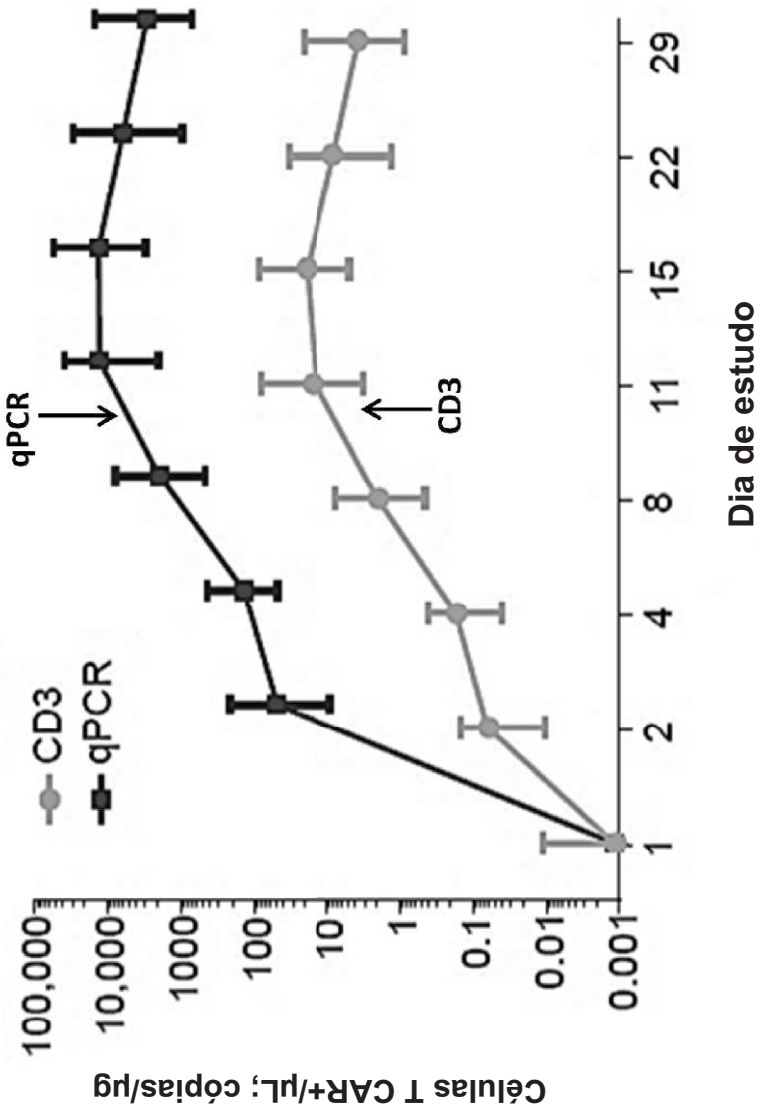
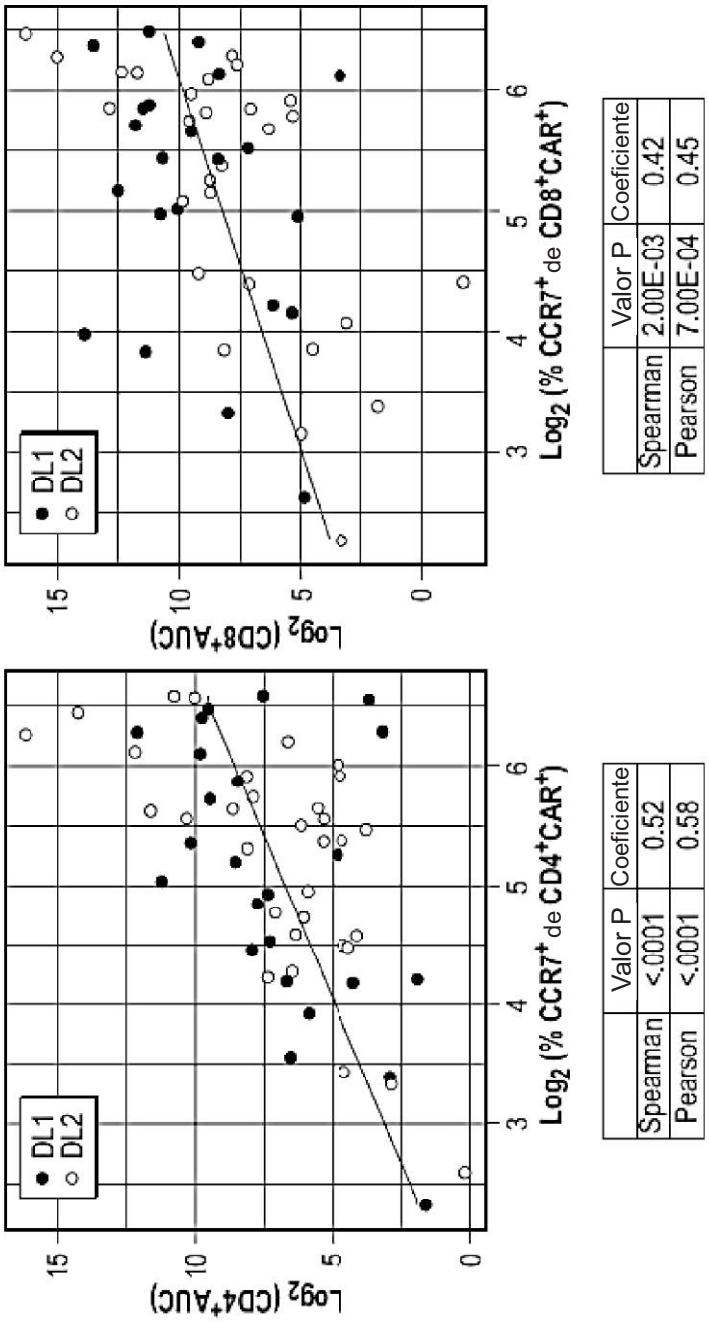

Células T CAR+/µL; cópias/µg
100,000
10,000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
1
2
4
8
11
15
22
29
Dia de estudo
CD3
qPCR
qPCR
CD3

FIG. 2

FIG. 3A



	Valor P	Coeficiente
Spearman	<.0001	0.52
Pearson	<.0001	0.58

	Valor P	Coeficiente
Spearman	2.00E-03	0.42
Pearson	7.00E-04	0.45

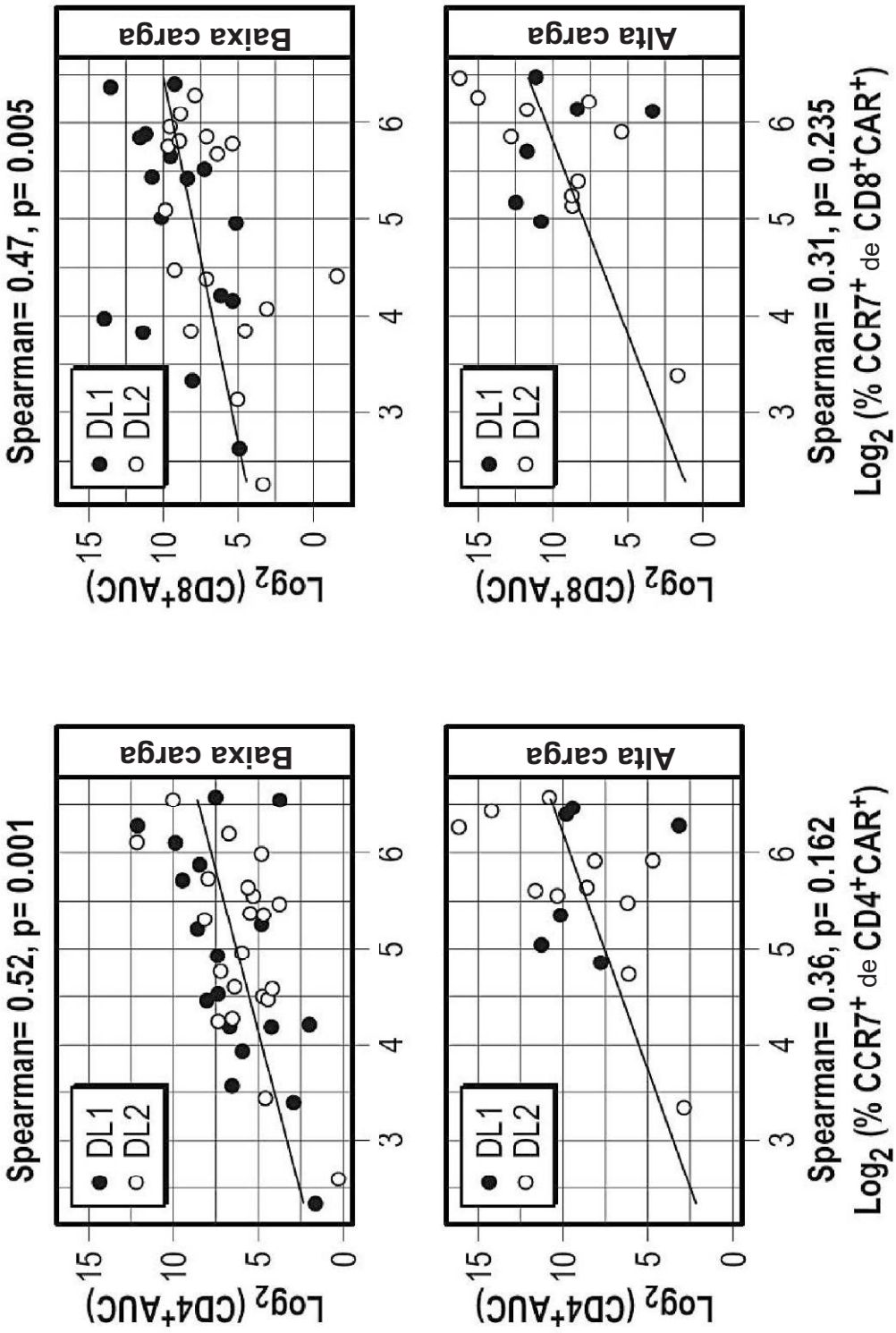
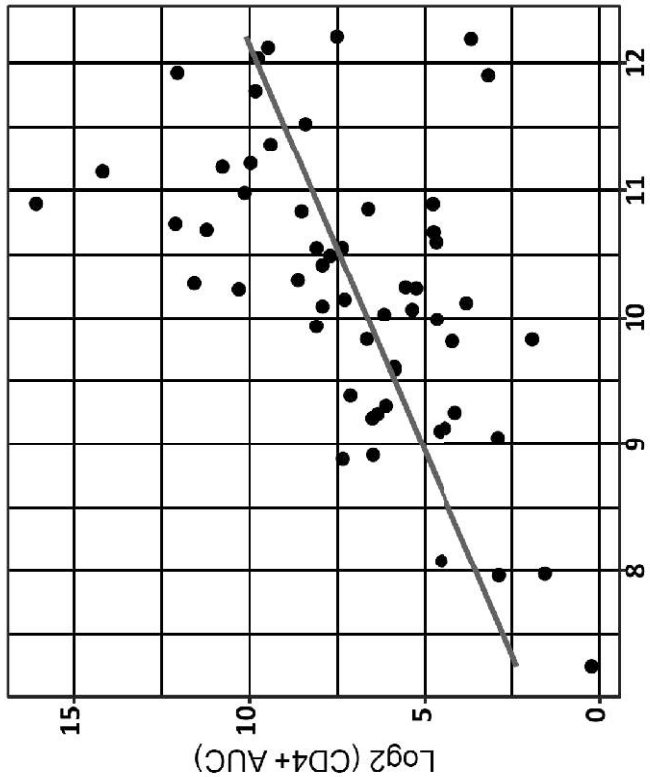
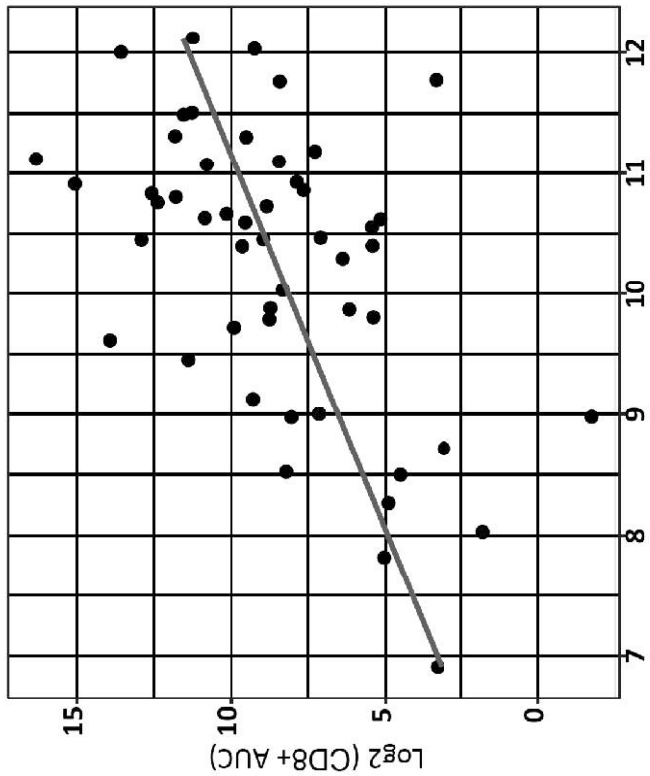

Baixa carga
Alta carga
Baixa carga
Alta carga
DL1
DL2
Log2 (CD4+AUC)
Log2 (CD8+AUC)
Spearman= 0.52, p= 0.001
Spearman= 0.36, p= 0.162
Spearman= 0.47, p= 0.005
Spearman= 0.31, p= 0.235
Log2 (% CCR7+ de CD4+CAR+)
Log2 (% CCR7+ de CD8+CAR+)

FIG. 3B

FIG. 3C



	Valor P	Coeficiente de correlação
Spearman	<0.001	0.583
Pearson	<0.001	0.555



	Valor P	Coeficiente de correlação
Spearman	<0.001	0.510
Pearson	<0.001	0.537

FIG. 3D

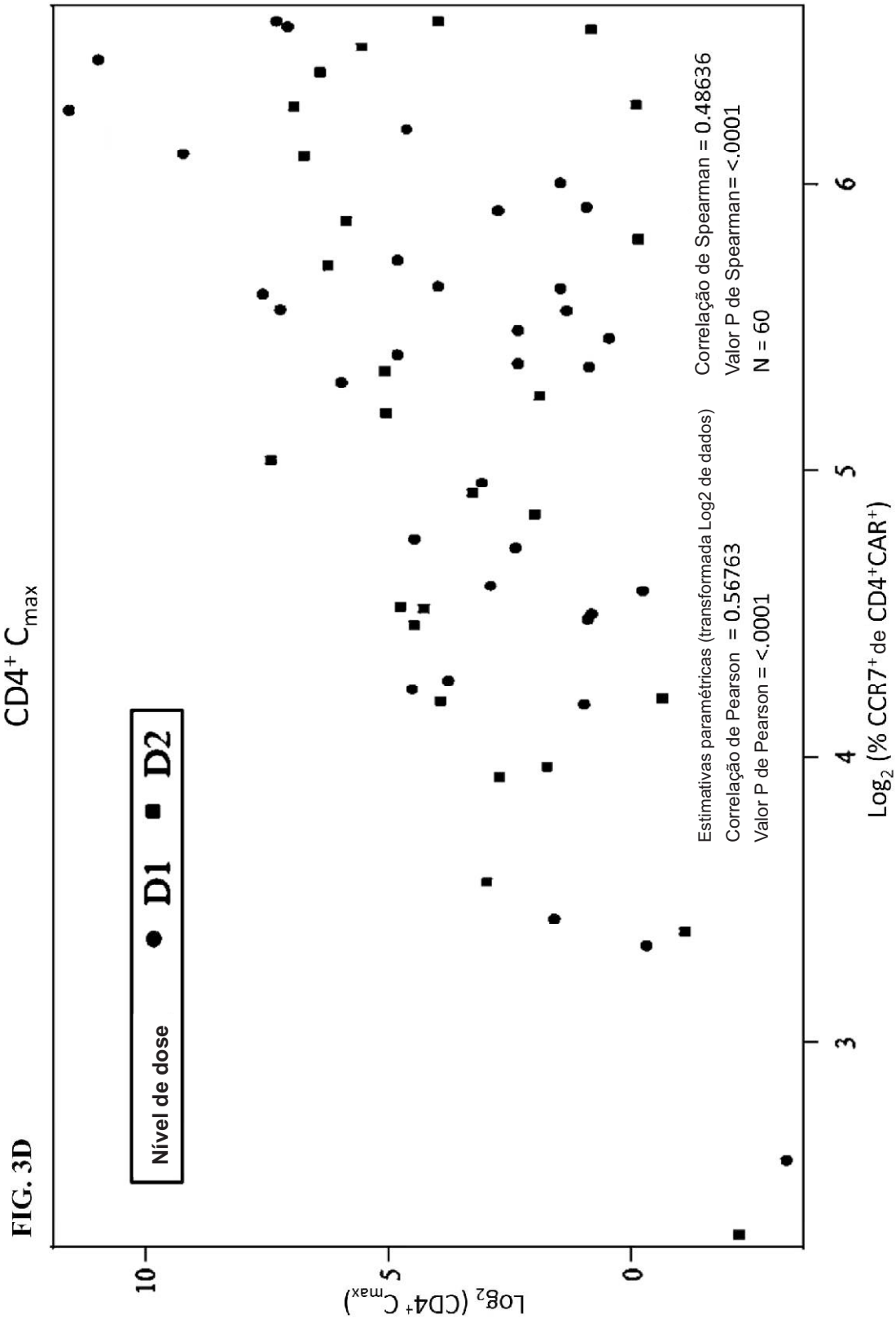

CD4+ Cmax
Nível de dose
D1
D2
Log2 (CD4+ Cmax)
10
5
0
3
4
5
6
Log2 (% CCR7+ de CD4+CAR+)
Estimativas paramétricas (transformada Log2 de dados)
Correlação de Pearson = 0.56763
Valor P de Pearson = <.0001
Correlação de Spearman = 0.48636
Valor P de Spearman= <.0001
N = 60

FIG. 3E

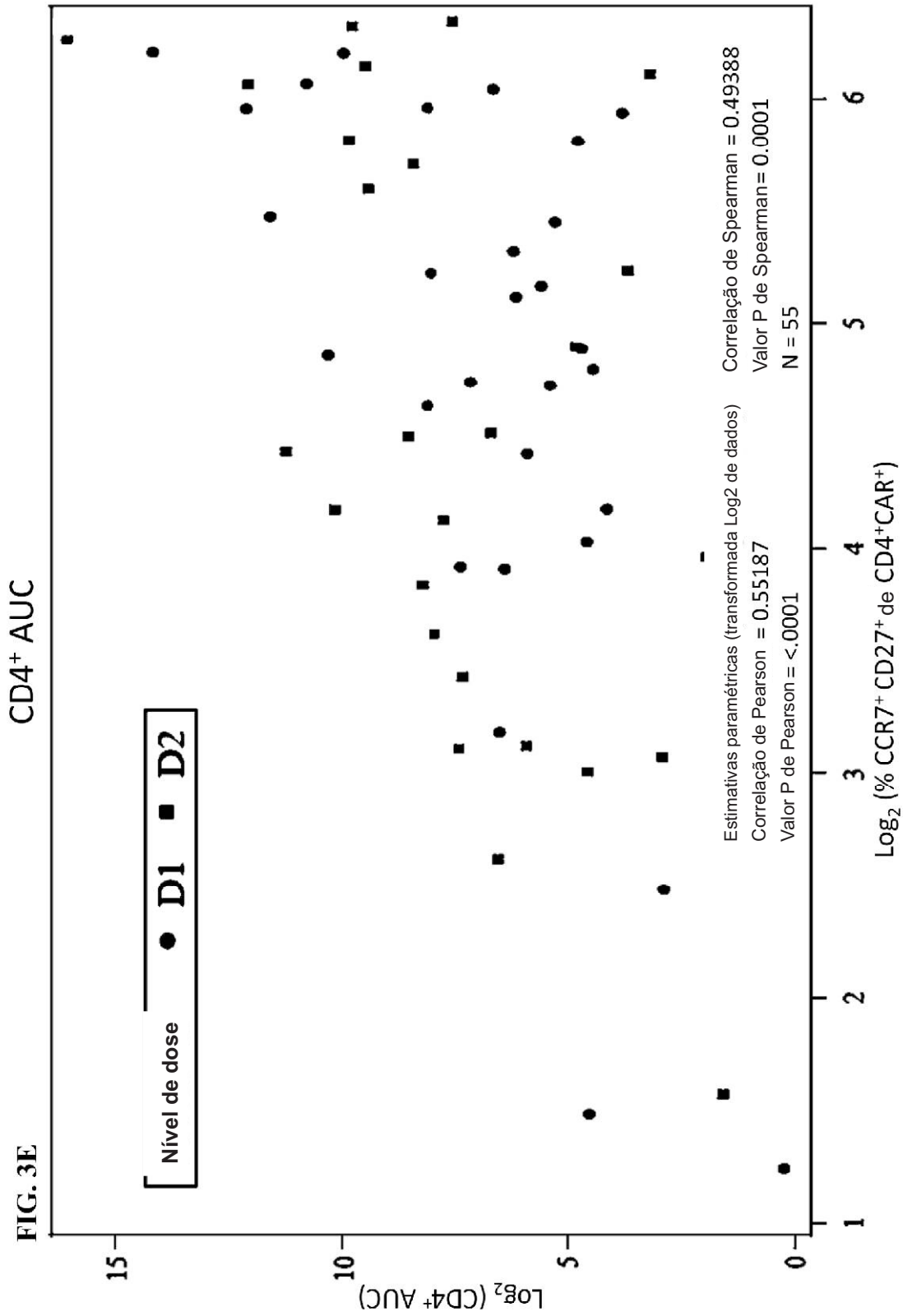
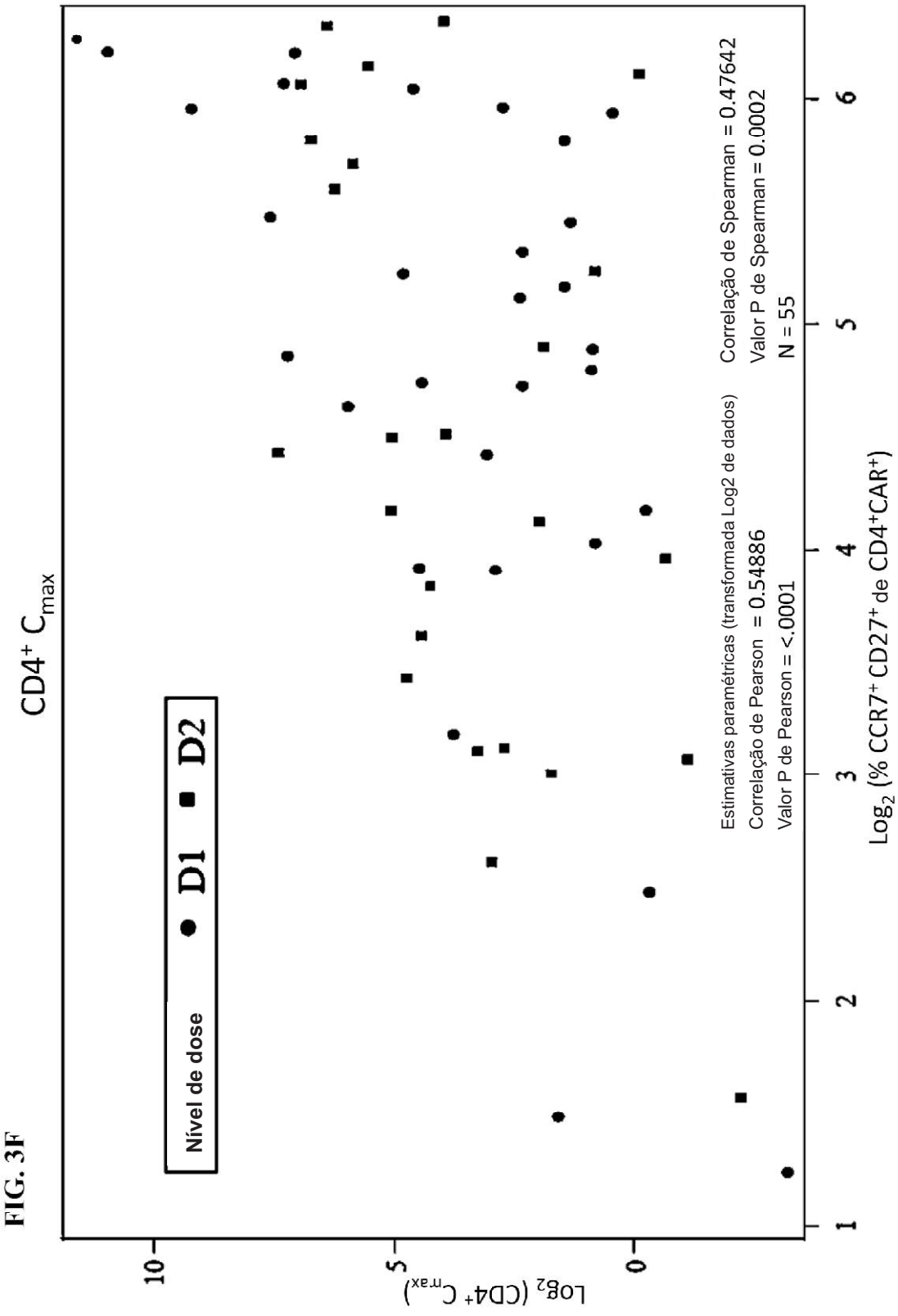
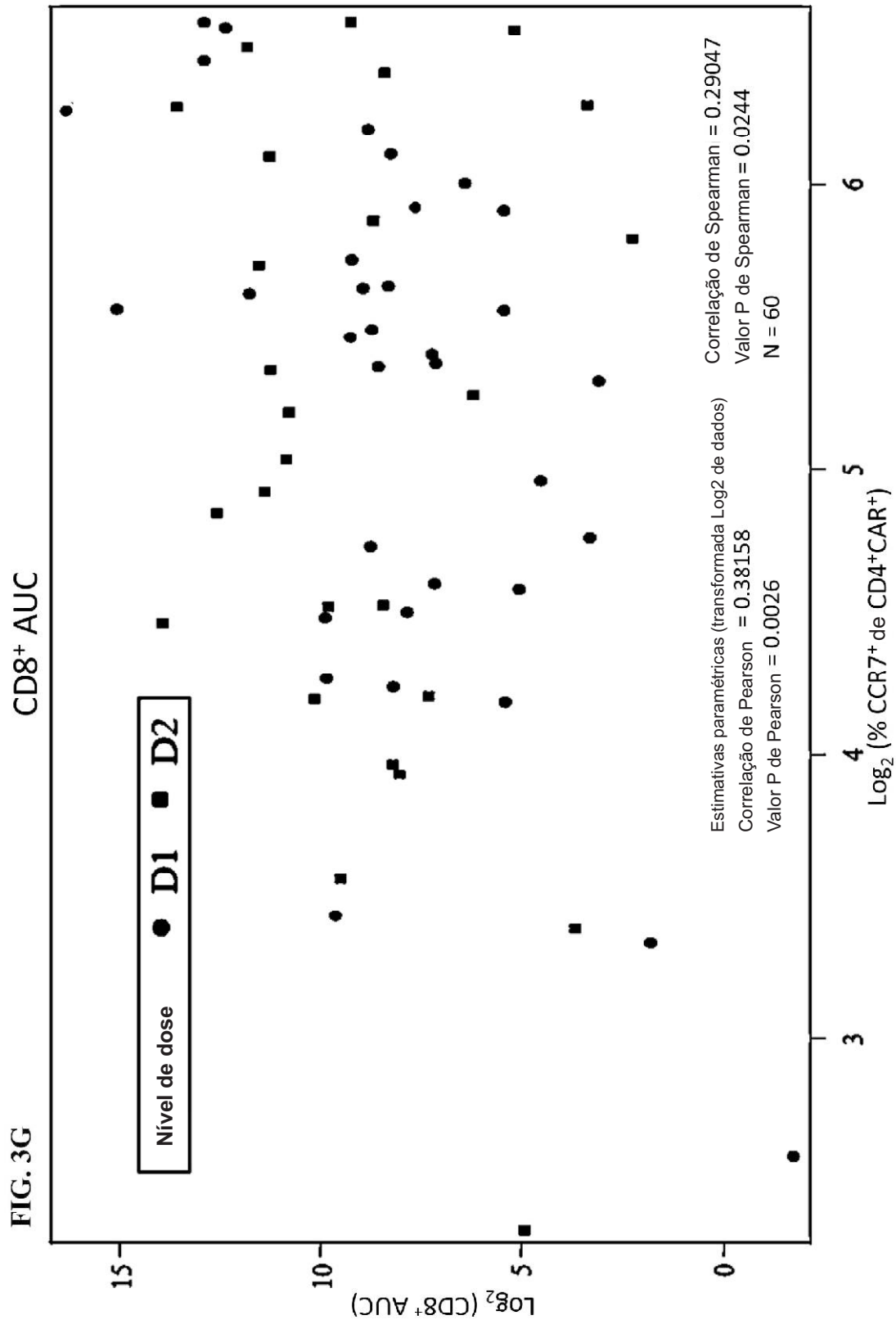

CD4+ AUC
Nível de dose
D1
D2
Log2 (CD4+ AUC)
Log2 (% CCR7+ CD27+ de CD4+CAR+)
Estimativas paramétricas (transformada Log2 de dados)
Correlação de Pearson = 0.55187
Valor P de Pearson = <.0001
Correlação de Spearman = 0.49388
Valor P de Spearman= 0.0001
N = 55

FIG. 3F


CD4+ Cmax
Nível de dose
D1
D2
Log2 (CD4+ Cmax)
10
5
0
1
2
3
4
5
6
Log2 (% CCR7+ CD27+ de CD4+CAR+)
Estimativas paramétricas (transformada Log2 de dados)
Correlação de Pearson = 0.54886
Valor P de Pearson = <.0001
Correlação de Spearman = 0.47642
Valor P de Spearman = 0.0002
N = 55


FIG. 3G
CD8+ AUC
Nível de dose
D1
D2
Log2 (CD8+ AUC)
15
10
5
0
3
4
5
6
Log2 (% CCR7+ de CD4+CAR+)
Estimativas paramétricas (transformada Log2 de dados)
Correlação de Pearson = 0.38158
Valor P de Pearson = 0.0026
Correlação de Spearman = 0.29047
Valor P de Spearman = 0.0244
N = 60

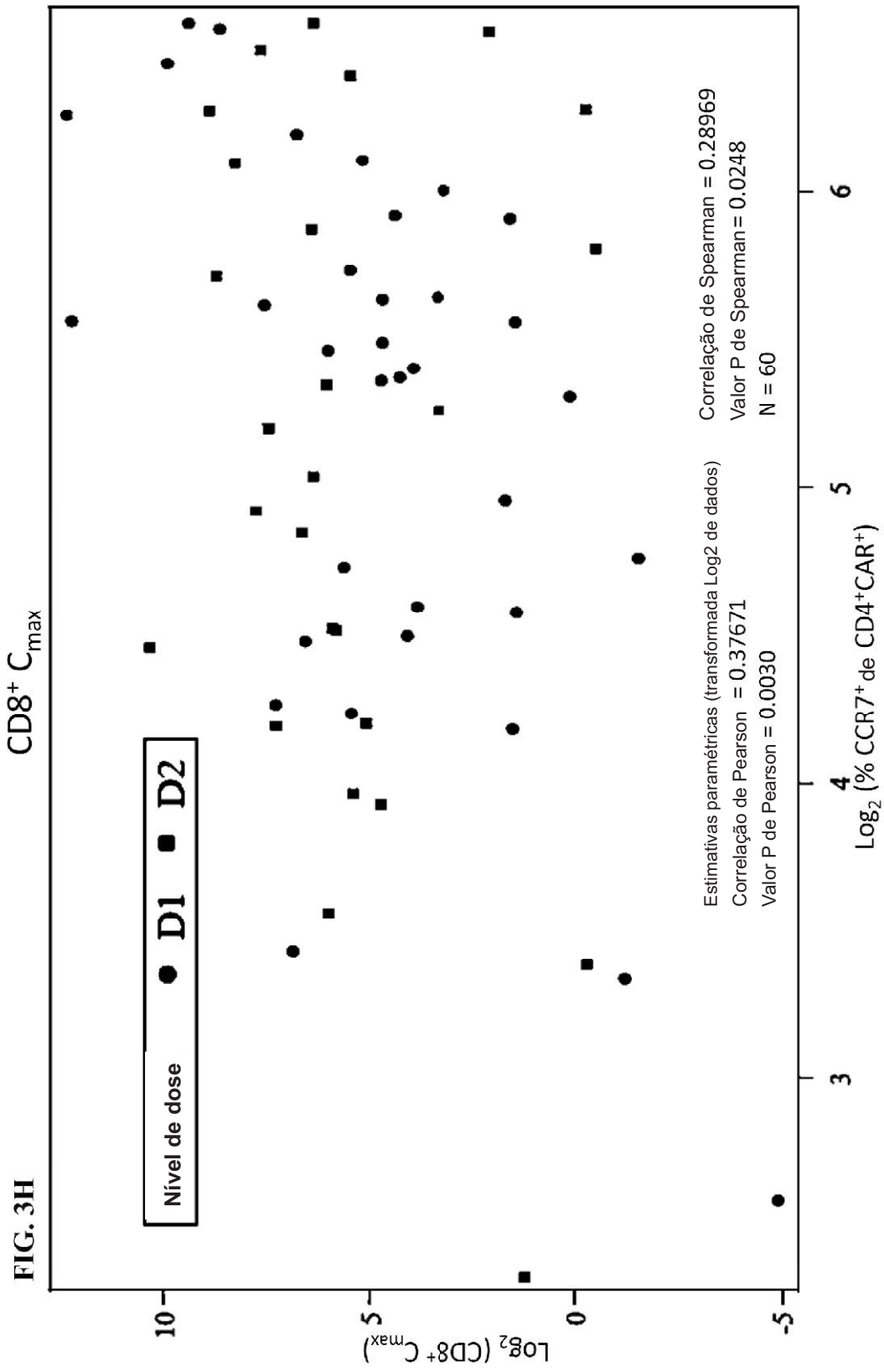
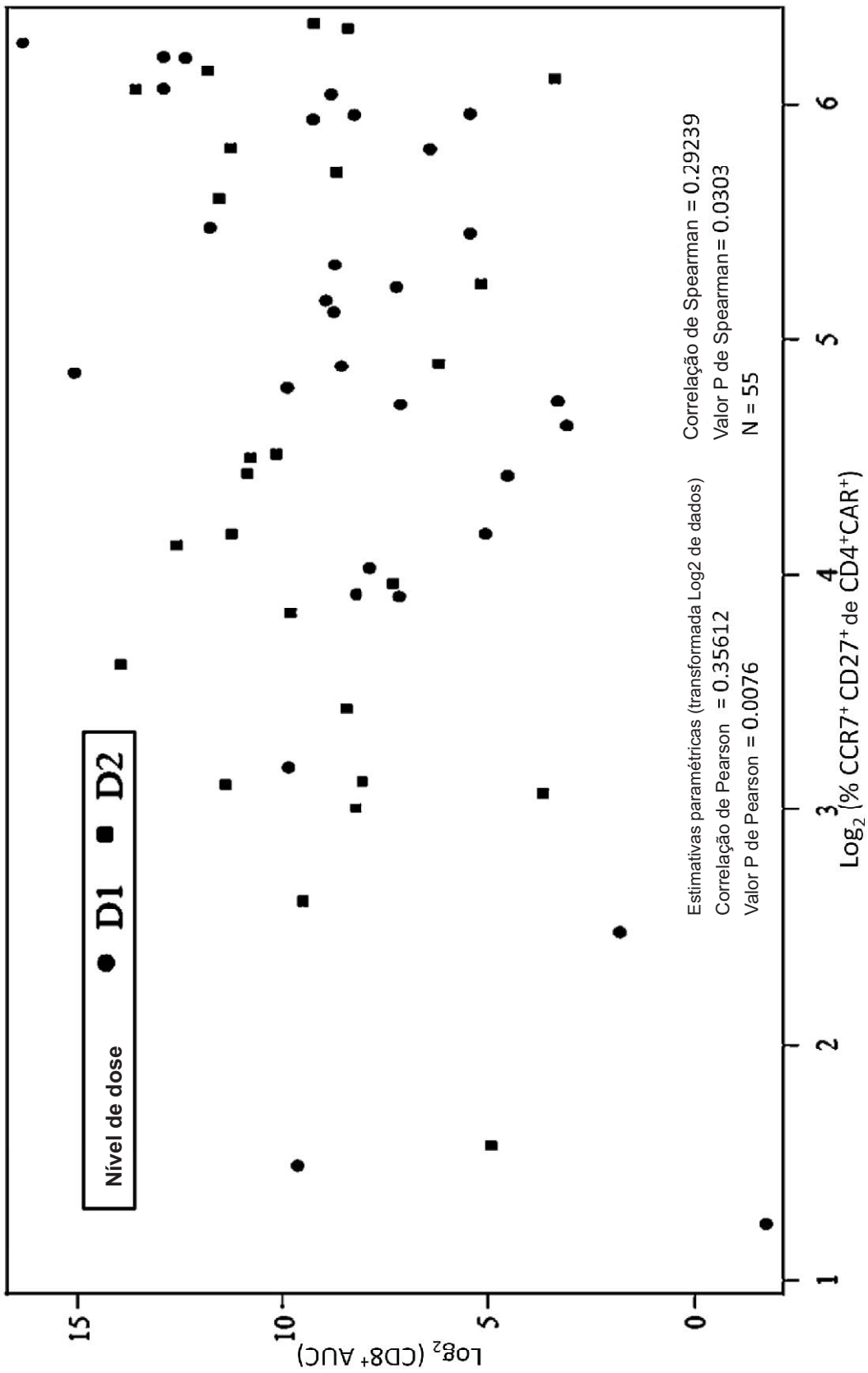

FIG. 3H
CD8+ Cmax
Nível de dose
D1
D2
Log2 (CD8+ Cmax)
10
5
0
-5
3
4
5
6
Log2 (% CCR7+ de CD4+CAR+)
Estimativas paramétricas (transformada Log2 de dados)
Correlação de Pearson = 0.37671
Valor P de Pearson = 0.0030
Correlação de Spearman = 0.28969
Valor P de Spearman = 0.0248
N = 60

FIG. 3I


CD8+ AUC
Nível de dose
D1
D2
Log2 (CD8+ AUC)
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
Log2 (% CCR7+ CD27+ de CD4+CAR+)
Estimativas paramétricas (transformada Log2 de dados)
Correlação de Pearson = 0.35612
Valor P de Pearson = 0.0076
Correlação de Spearman = 0.29239
Valor P de Spearman = 0.0303
N = 55

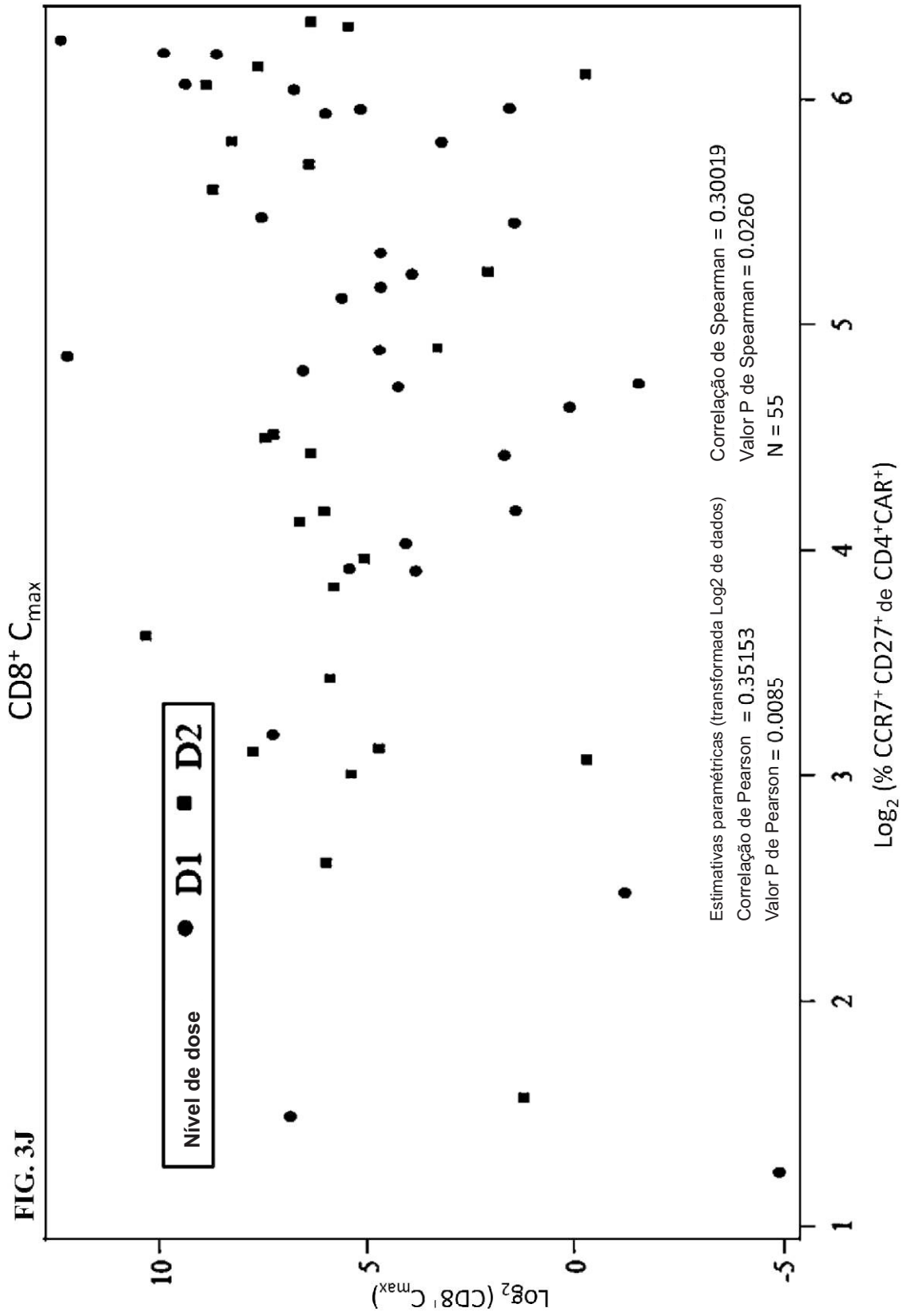
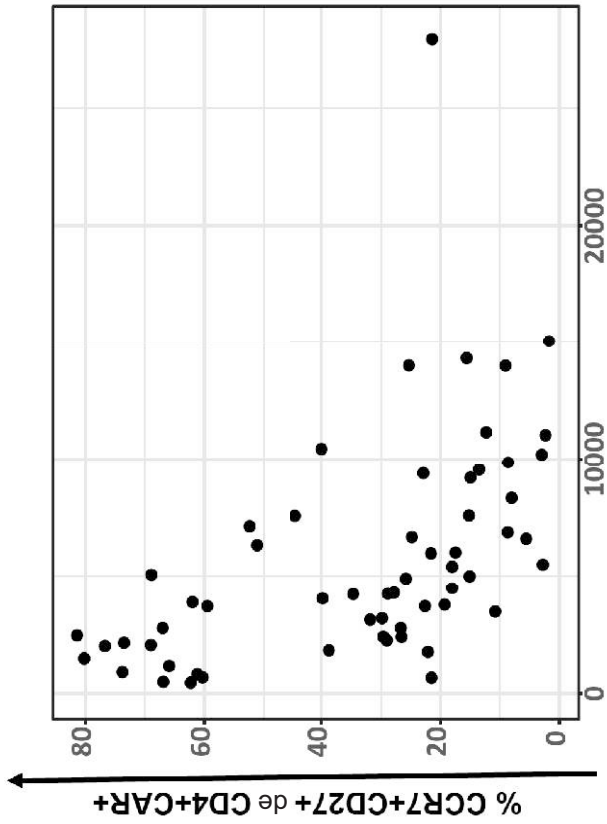
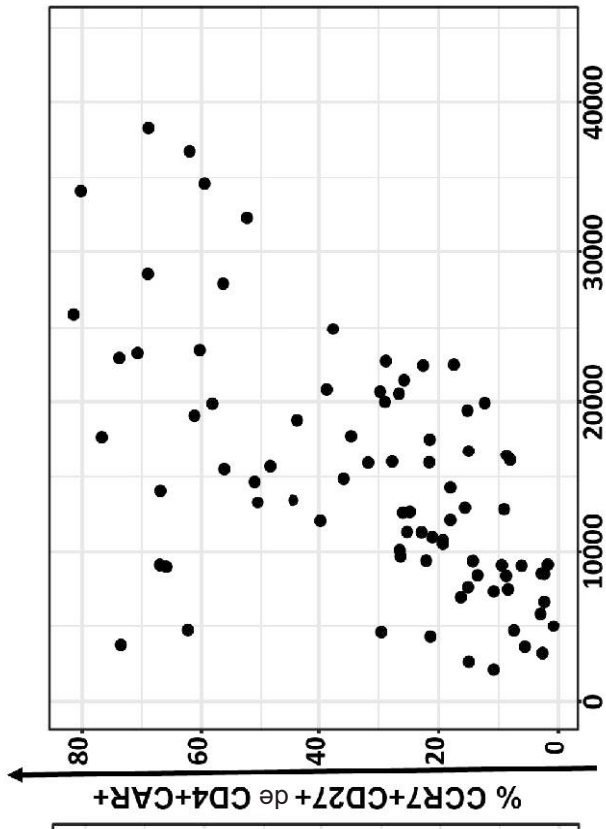

FIG. 3J
CD8+ Cmax
Nível de dose
D1
D2
Log2 (CD8+ Cmax)
10
5
0
-5
1
2
3
4
5
6
Log2 (% CCR7+ CD27+ de CD4+CAR+)
Estimativas paramétricas (transformada Log2 de dados)
Correlação de Pearson = 0.35153
Valor P de Pearson = 0.0085
Correlação de Spearman = 0.30019
Valor P de Spearman = 0.0260
N = 55

FIG. 4A



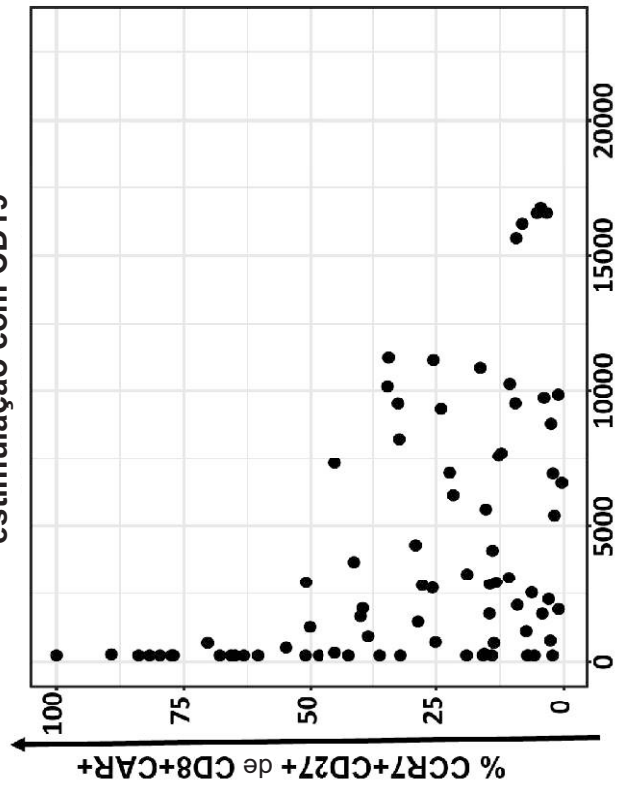
	Valor P	Coeficiente
Spearman	8.81E-09	-0.67
Pearson	2.55E-05	-0.51

FIG. 4B



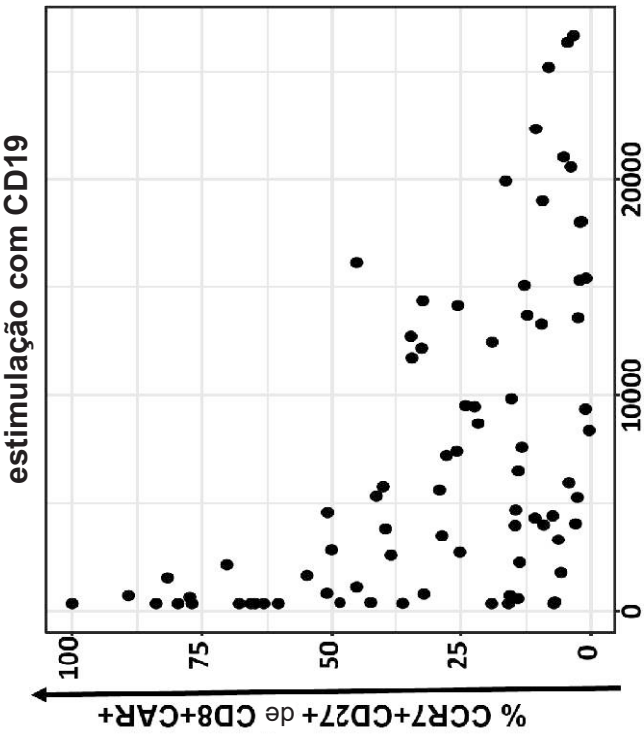
	Valor P	Coeficiente
Spearman	2.25E-08	0.55
Pearson	5.29E-08	0.54

FIG. 5A



	Valor P	Coeficiente
Spearman	9.96E-06	-0.47
Pearson	5.08E-05	-0.44

FIG. 5B



	Valor P	Coeficiente
Spearman	7.69E-09	-0.59
Pearson	4.25E-07	-0.53

FIG. 6A

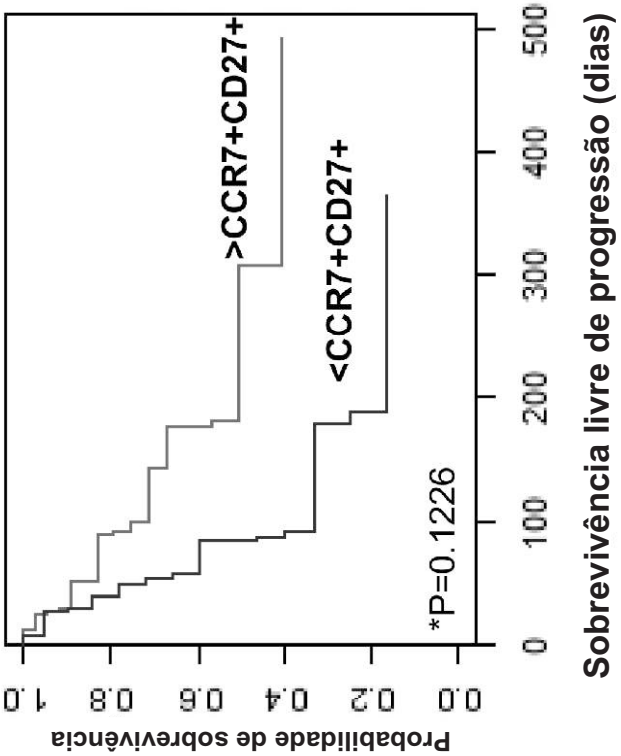

CD4+ CAR+
Probabilidade de sobrevivência
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
100
200
300
400
500
Sobrevivência livre de progressão (dias)
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.1226

FIG. 6B

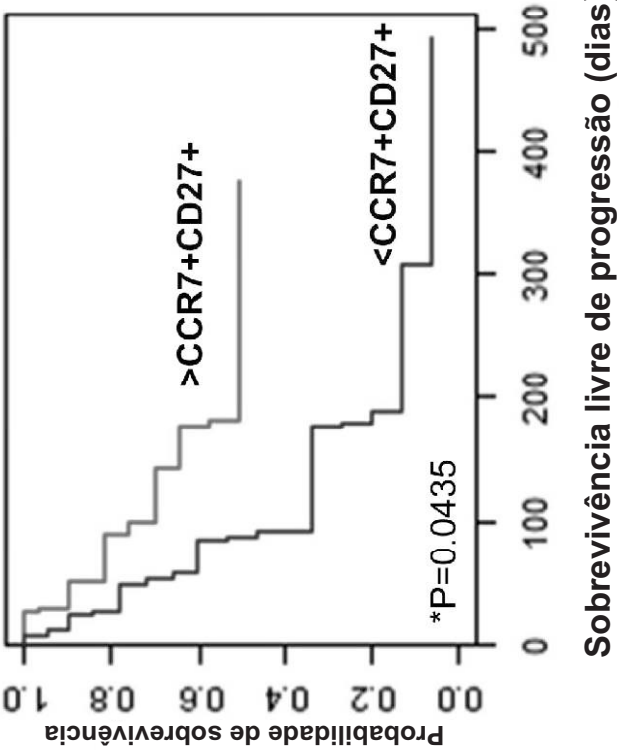

CD8+ CAR+
Probabilidade de sobrevivência
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
100
200
300
400
500
Sobrevivência livre de progressão (dias)
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.0435

FIG. 6D

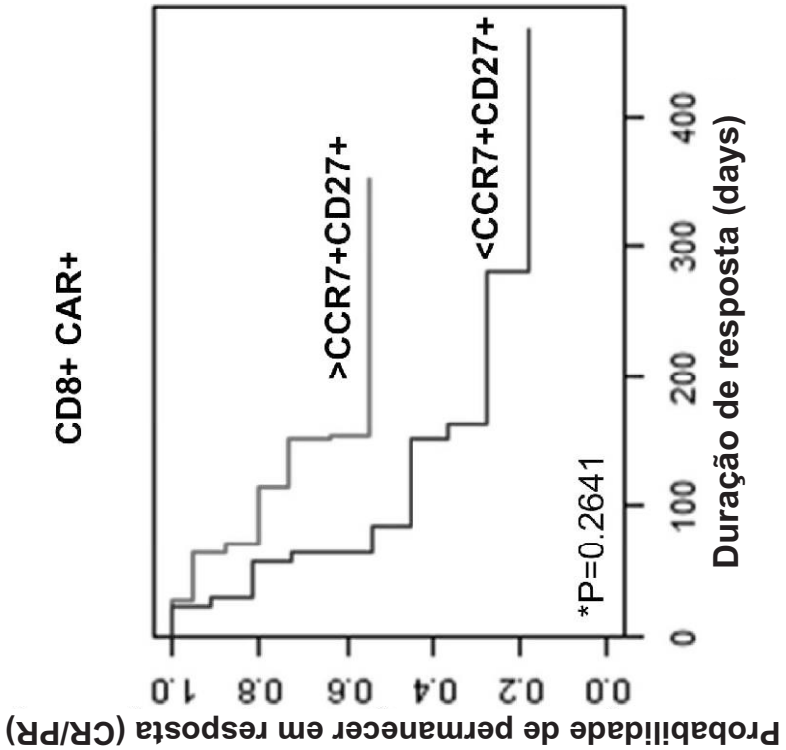

CD8+ CAR+
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.2641
Probabilidade de permanecer em resposta (CR/PR)
Duração de resposta (days)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
100
200
300
400

FIG. 6C

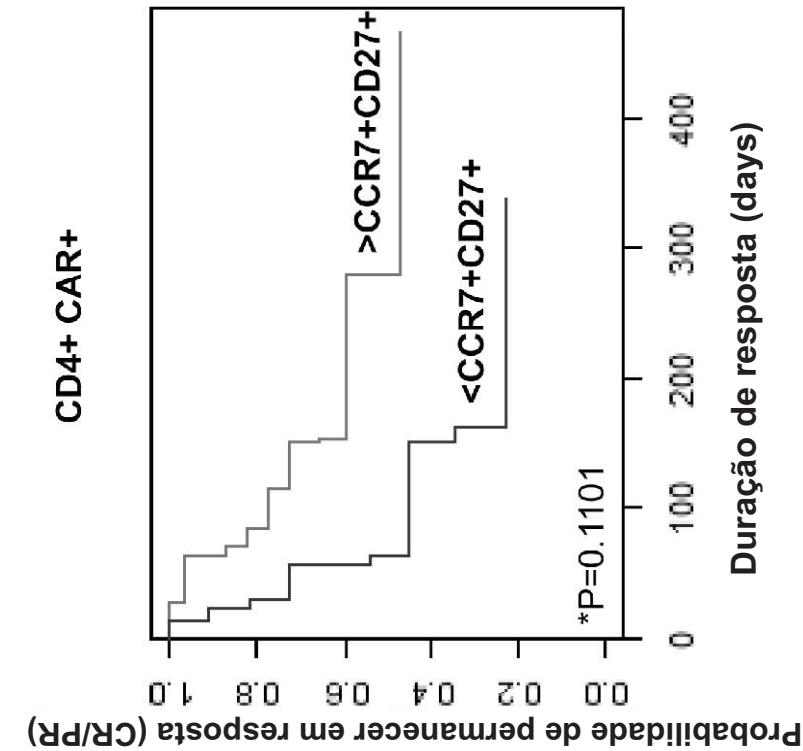

CD4+ CAR+
>CCR7+CD27+
<CCR7+CD27+
*P=0.1101
Probabilidade de permanecer em resposta (CR/PR)
Duração de resposta (days)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
100
200
300
400

FIG. 7A

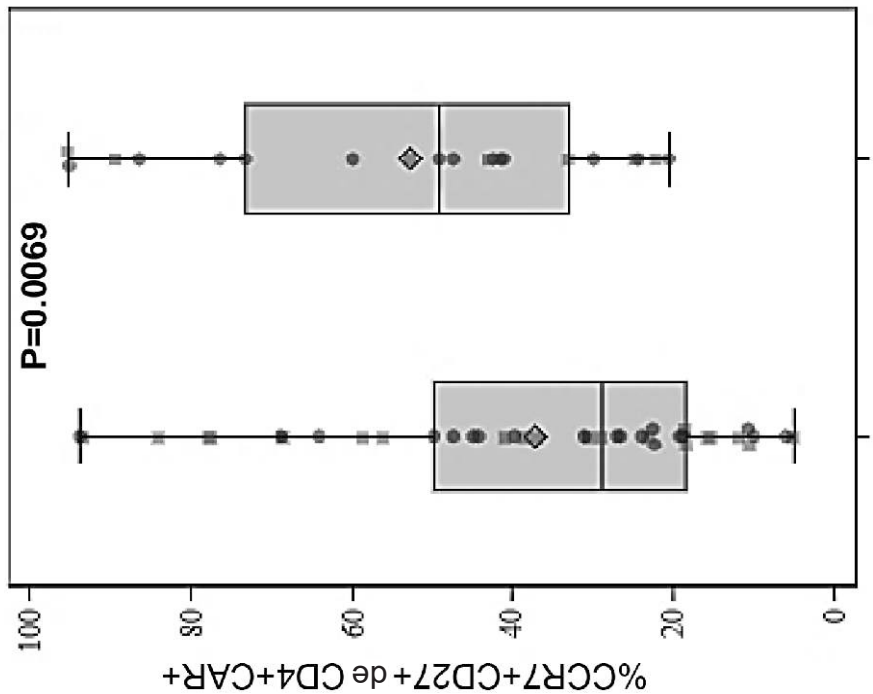

% CCR7+CD27+ de CD4+CAR+
P=0.0069
%CCR7+CD27+ de CD4+CAR+
100
80
60
40
20
0
Grau 0
Grau 1+
Síndrome de liberação de citocina 0 v. grau 1+

FIG. 7B

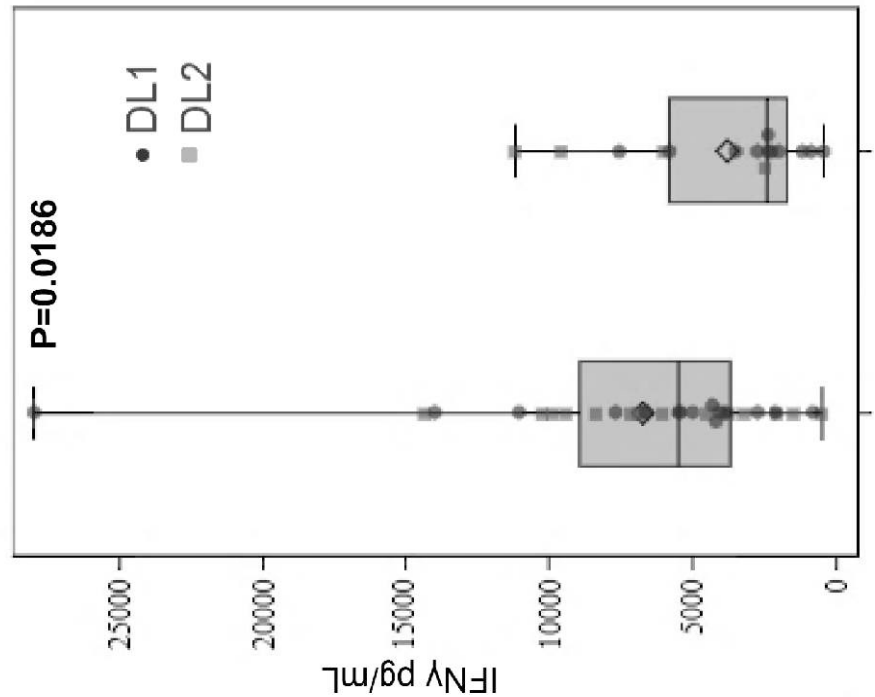

IFNγ ELISA CD4+CAR+
P=0.0186
DL1
DL2
IFNγ pg/mL
25000
20000
15000
10000
5000
0
Grau 0
Grau 1+
Síndrome de liberação de citocina 0 v. grau 1+

FIG. 7C

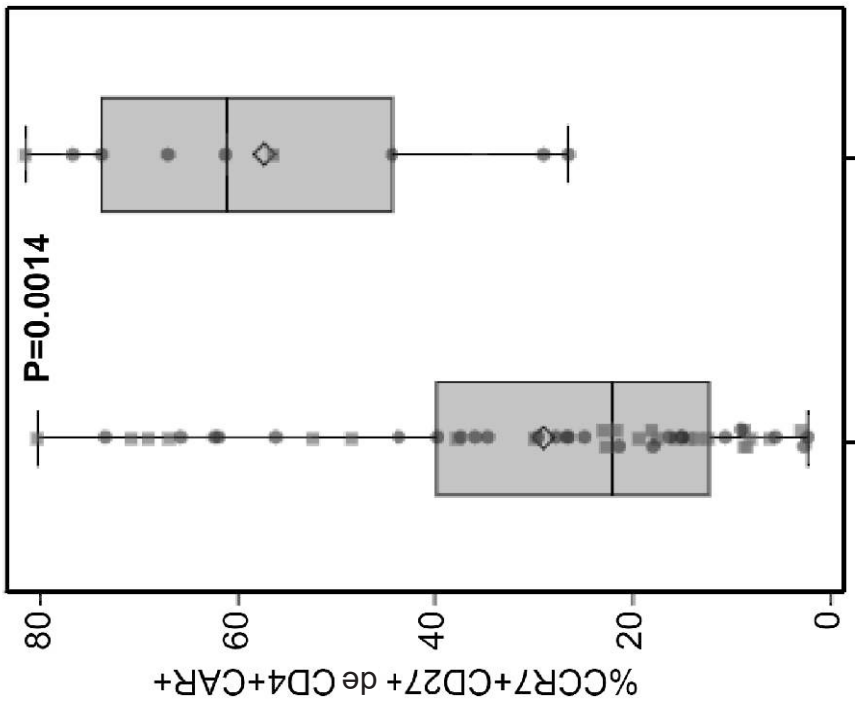
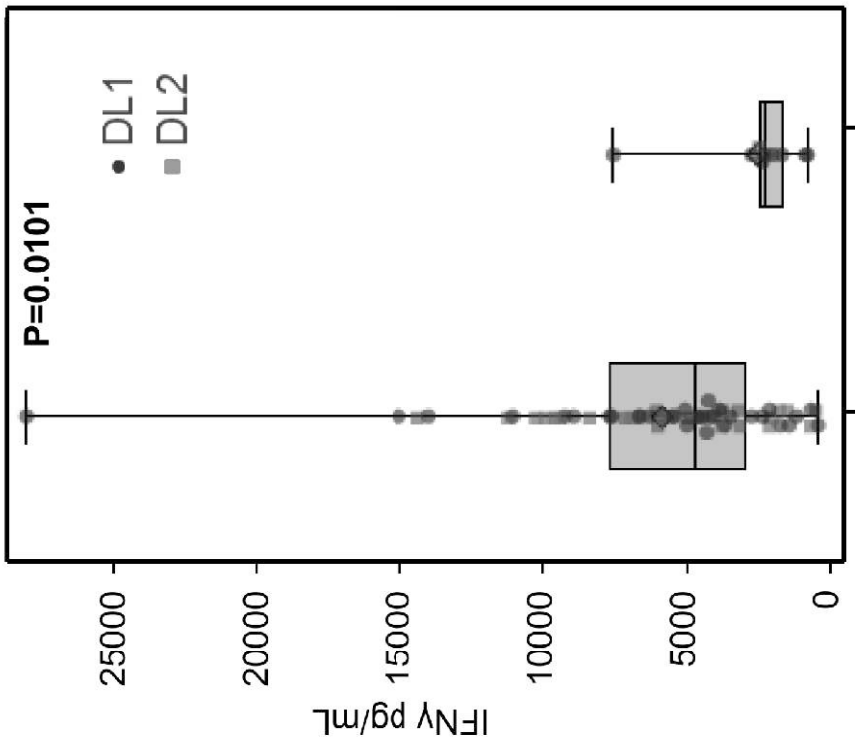


FIG. 7D



Neurotoxicidade Grau 0-2 v. grau 3+

FIG. 8A

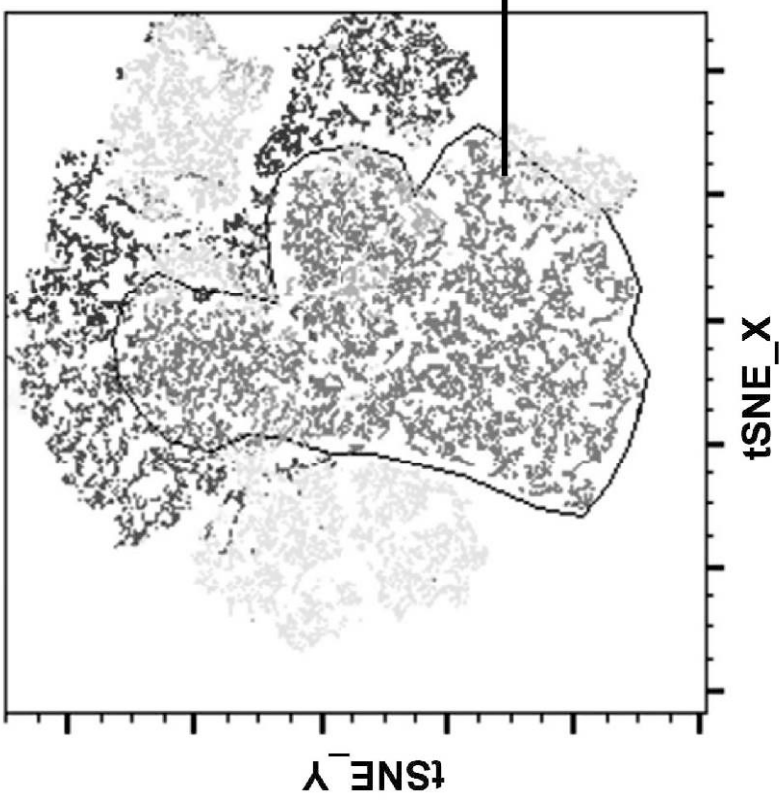
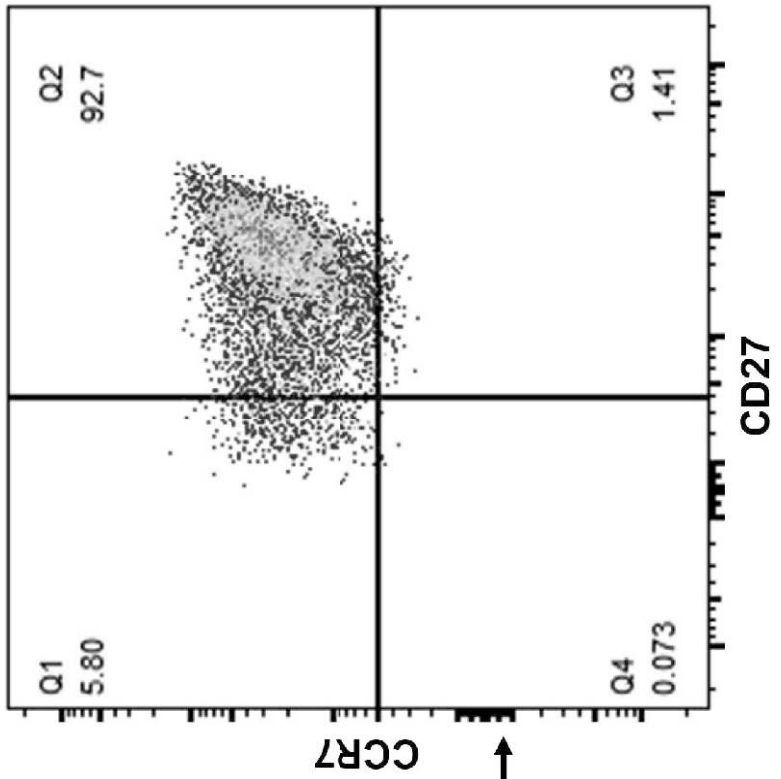


FIG. 8B



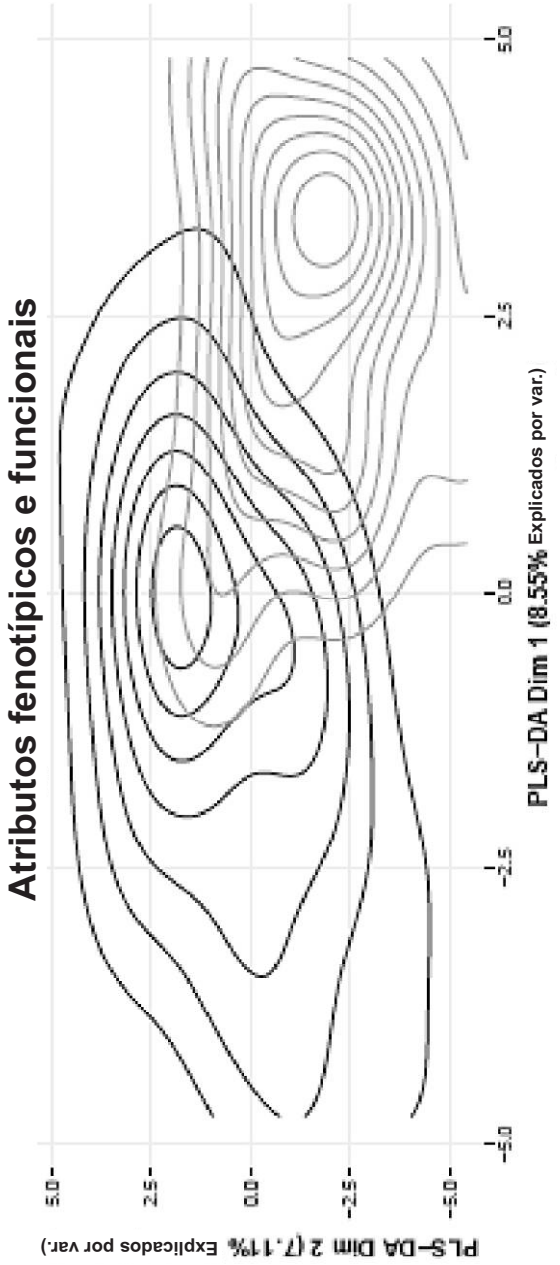

Atributos fenotípicos e funcionais
PLS-DA Dim 2 (7.11% Explicados por var.)
PLS-DA Dim 1 (8.55% Explicados por var.)
5.0
2.5
0.0
-2.5
-5.0

FIG. 9A

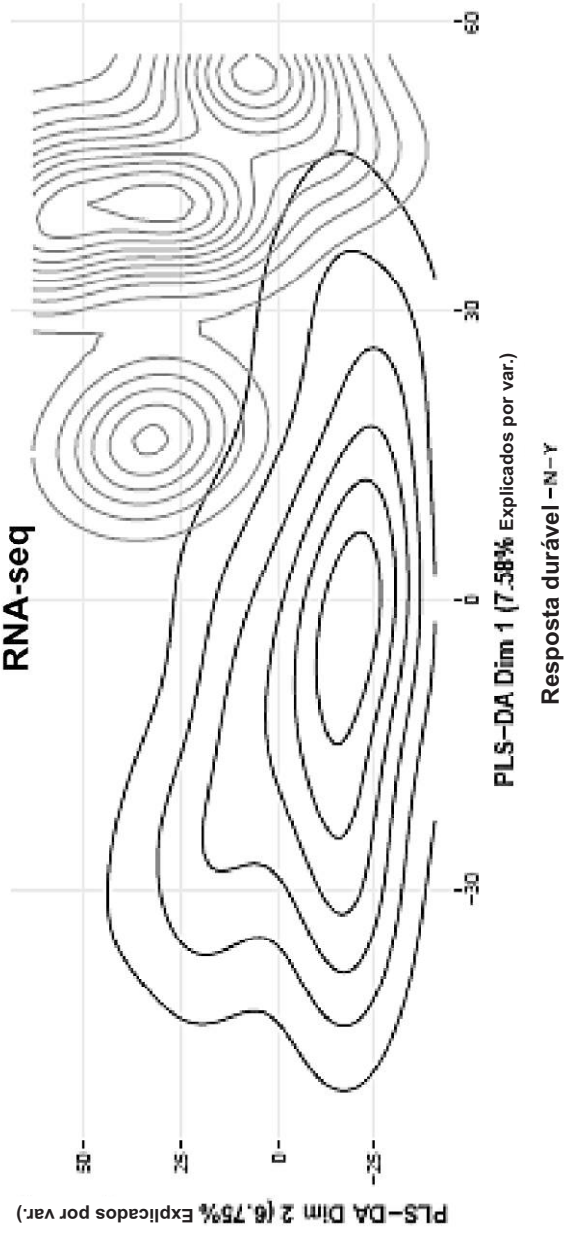

RNA-seq
PLS-DA Dim 2 (6.75% Explicados por var.)
PLS-DA Dim 1 (7.58% Explicados por var.)
Resposta durável - N - Y
60
30
0
-30
50
25
0
-25

FIG. 9B

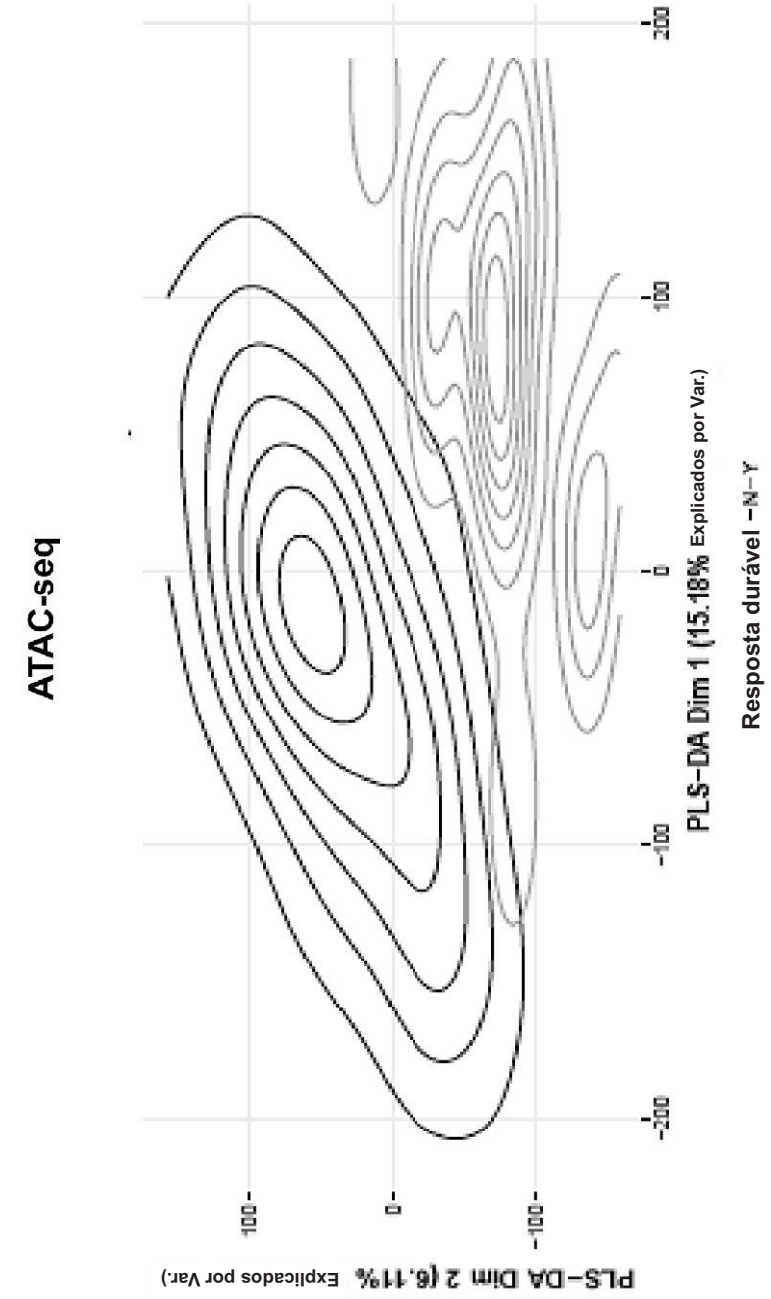

ATAC-seq
PLS-DA Dim 2 (6.11% Explicados por Var.)
100
0
-100
-200
-100
0
100
200
PLS-DA Dim 1 (15.18% Explicados por Var.)
Resposta durável - N - Y

FIG. 9C

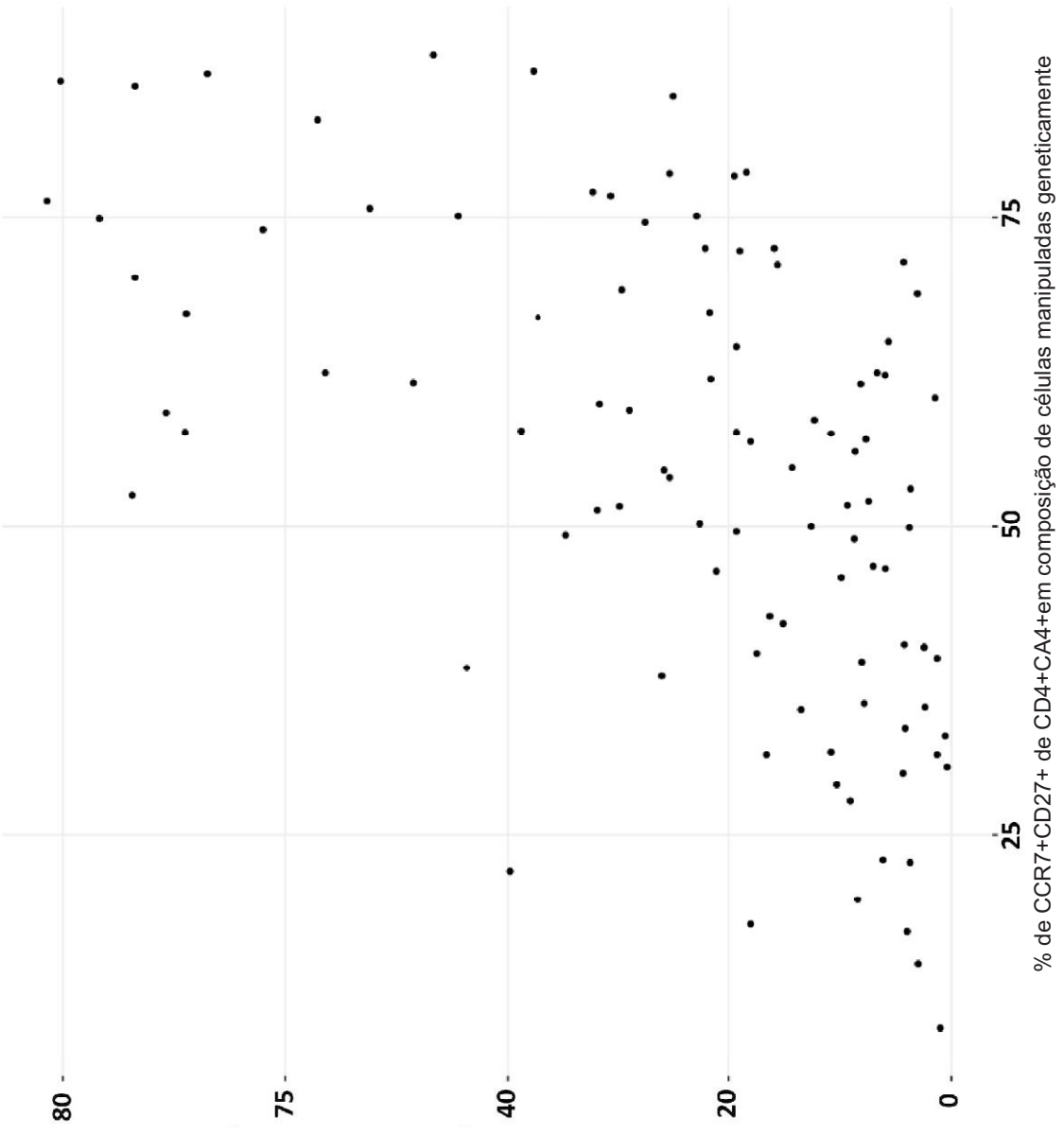

% de CCR7+CD27+ de CD4+CA4+em composição de células manipuladas geneticamente
25
50
75
% de CCR7+CD27+ de CD4+CAR+em composição de células manipuladas geneticamente
0
20
40
75
80

FIG. 10A

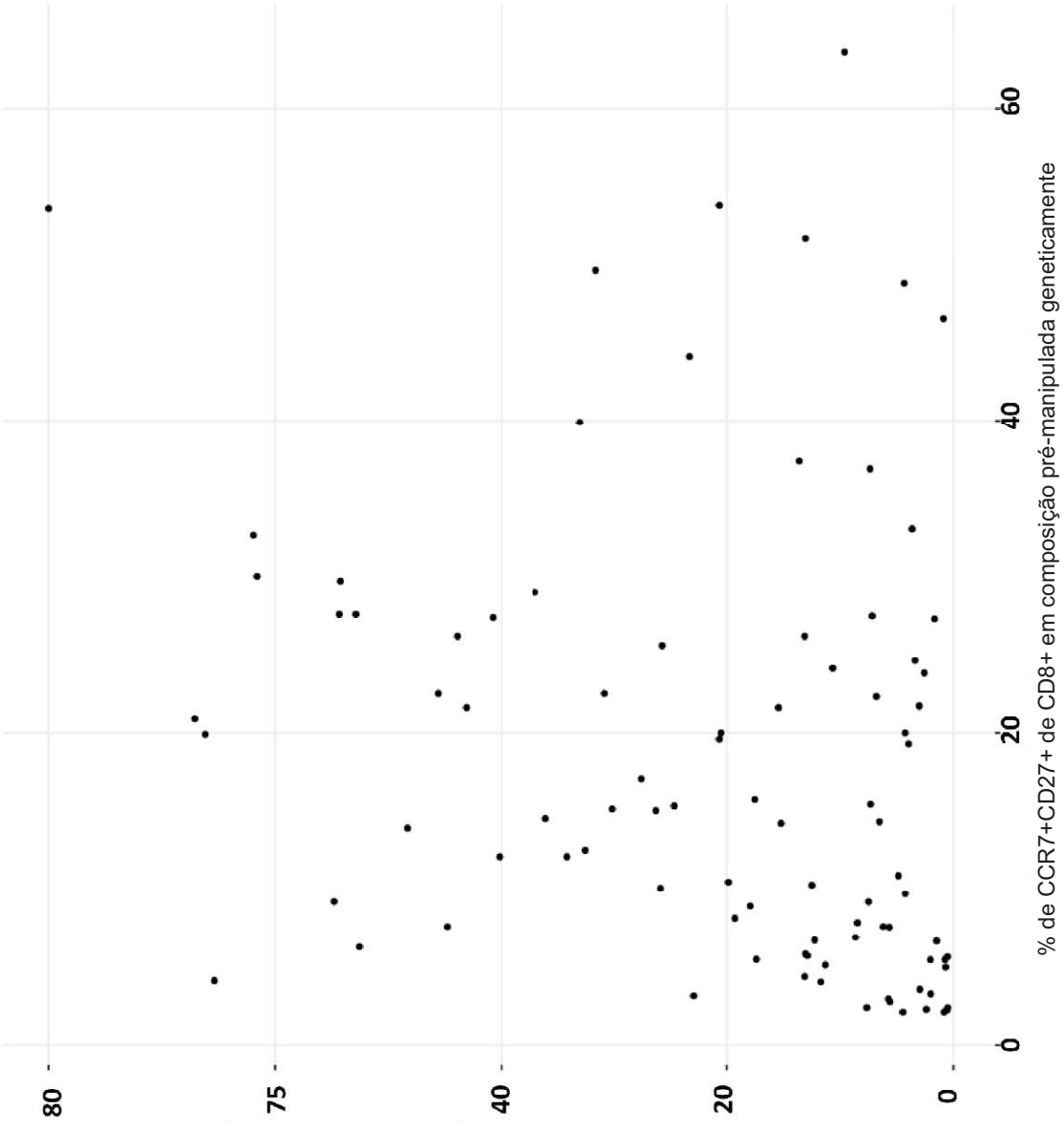

% de CCR7+CD27+ de CD8+CAR+ em composição pré-manipulada geneticamente
80
75
40
20
0
% de CCR7+CD27+ de CD8+ em composição pré-manipulada geneticamente
0
20
40
60

FIG. 10B

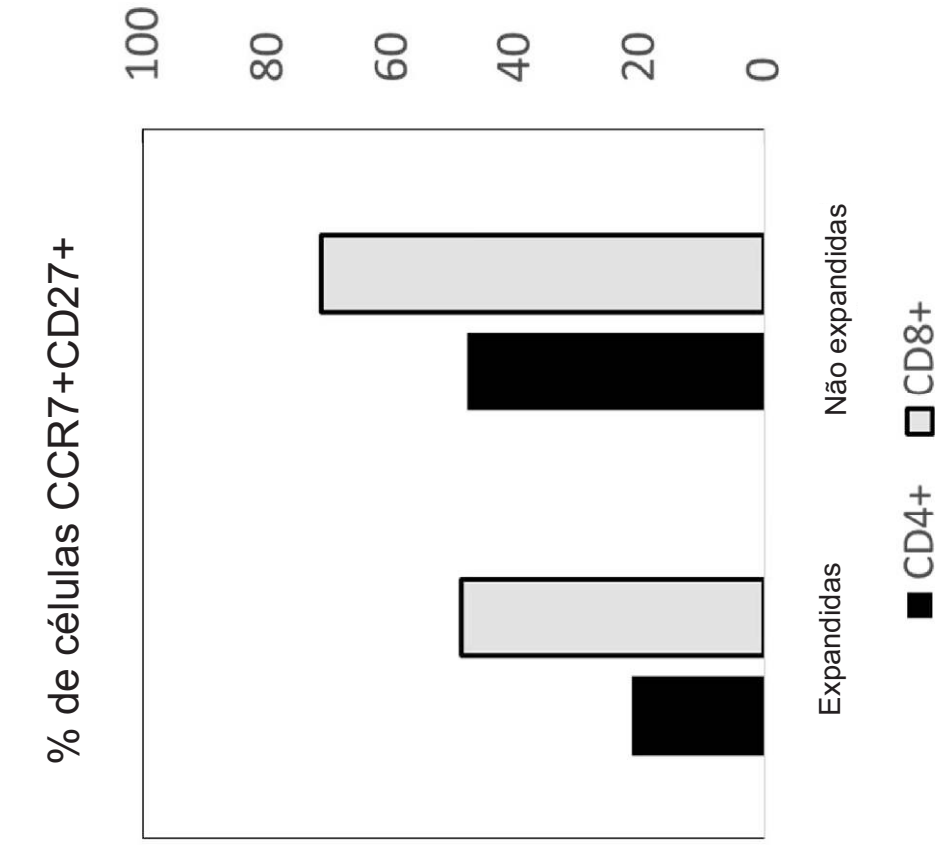

% de células CCR7+CD27+
100
80
60
40
20
0
Expandidas
Não expandidas
CD4+
CD8+

FIG. 11A

FIG. 11B

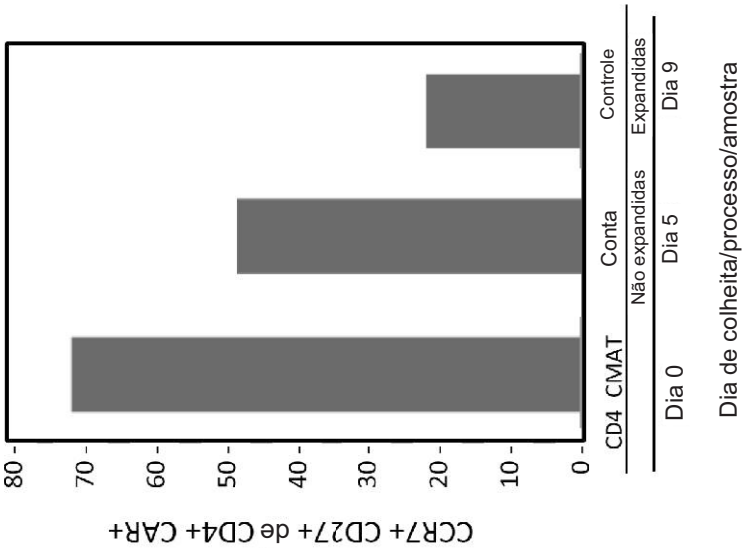
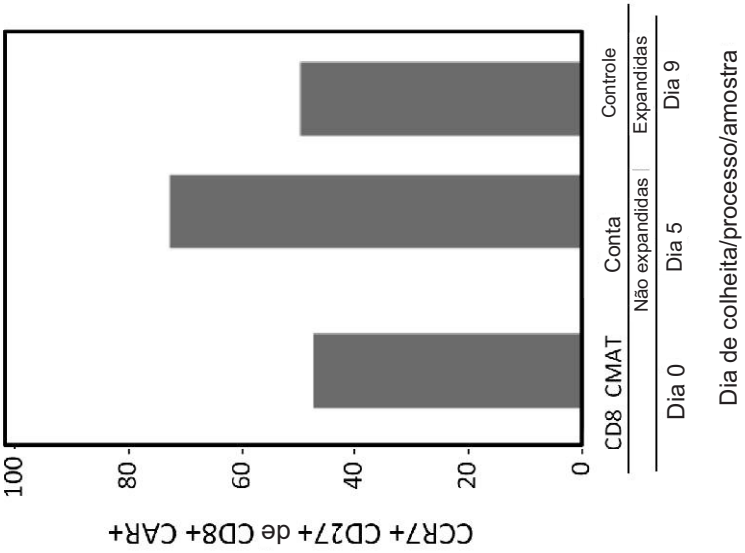


FIG. 11C



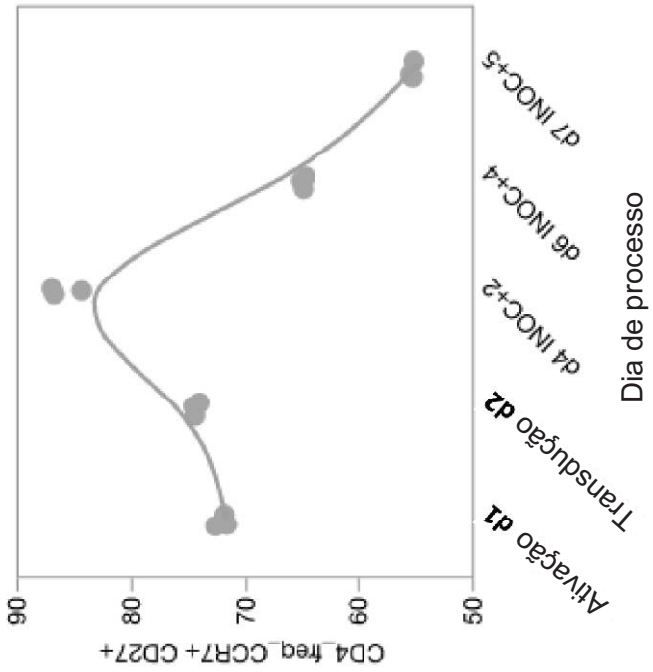

CD4_treg_CCR7+ CD27+
90
80
70
60
50
Ativação d1
Transdução d2
d4 INOC+2
d6 INOC+4
d7 INOC+5
Dia de processo

FIG. 11D

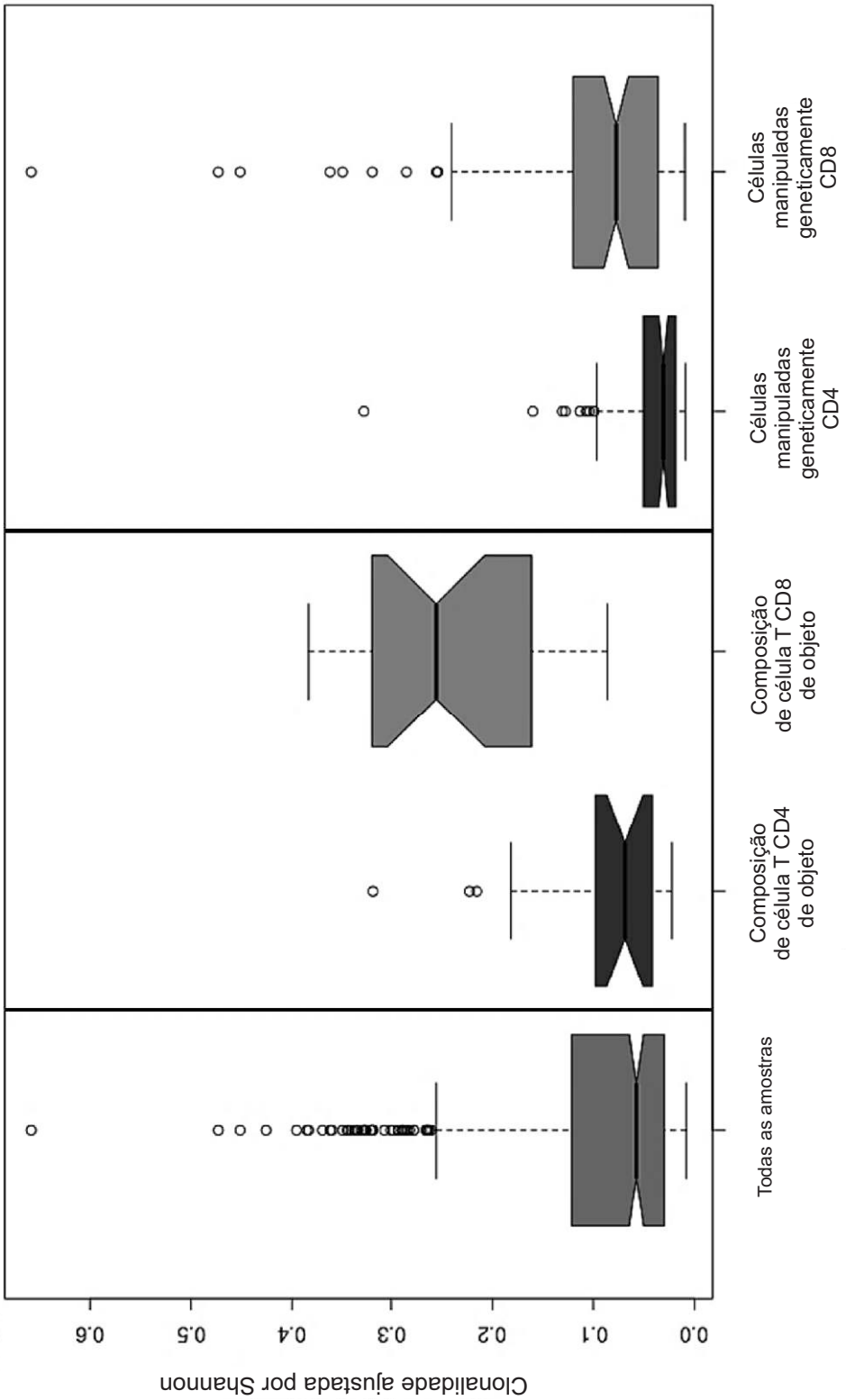
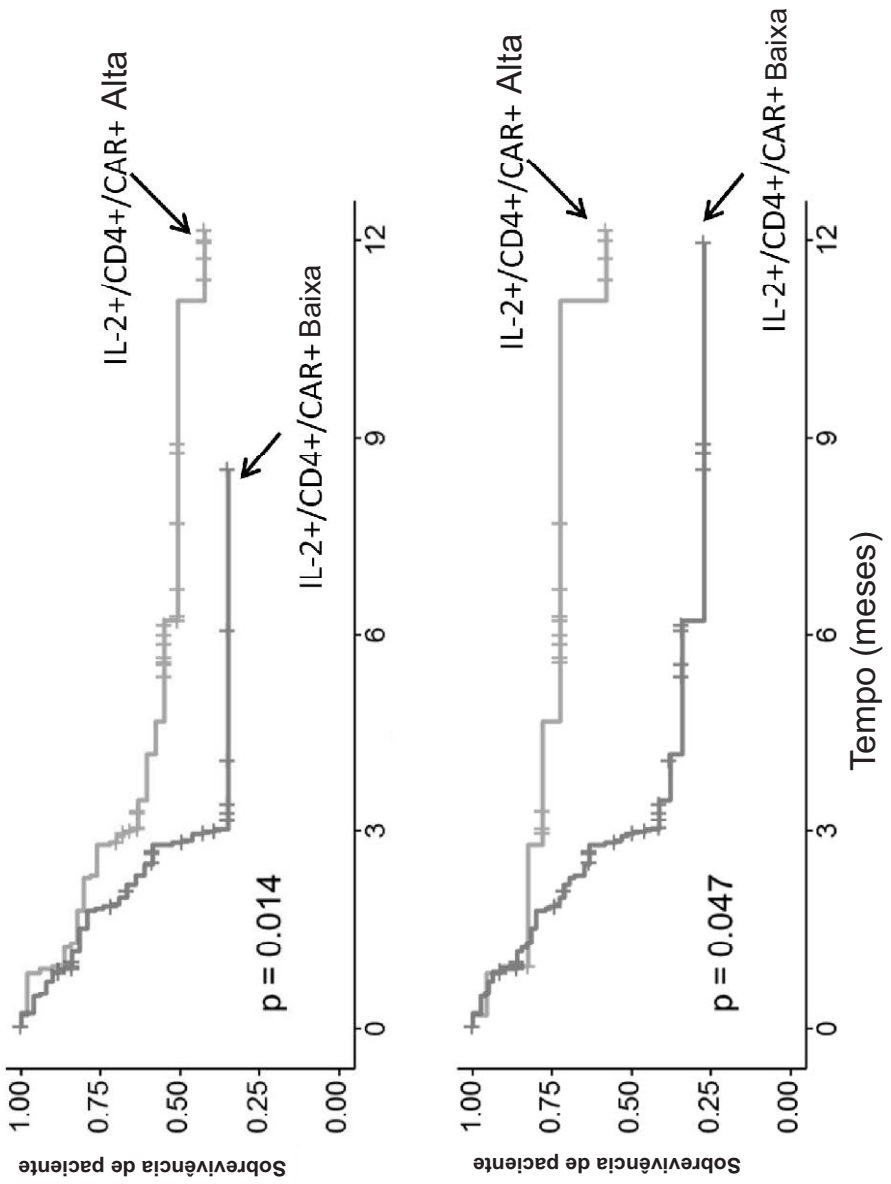

Clonalidade ajustada por Shannon
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
Todas as amostras
Composição de célula T CD4 de objeto
Composição de célula T CD8 de objeto
Células manipuladas geneticamente CD4
Células manipuladas geneticamente CD8

FIG. 12

FIG. 13A


IL-2+/CD4+/CAR+ Alta
IL-2+/CD4+/CAR+ Baixa
p = 0.014
p = 0.047
Sobrevivência de paciente
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
3
6
9
12
Tempo (meses)

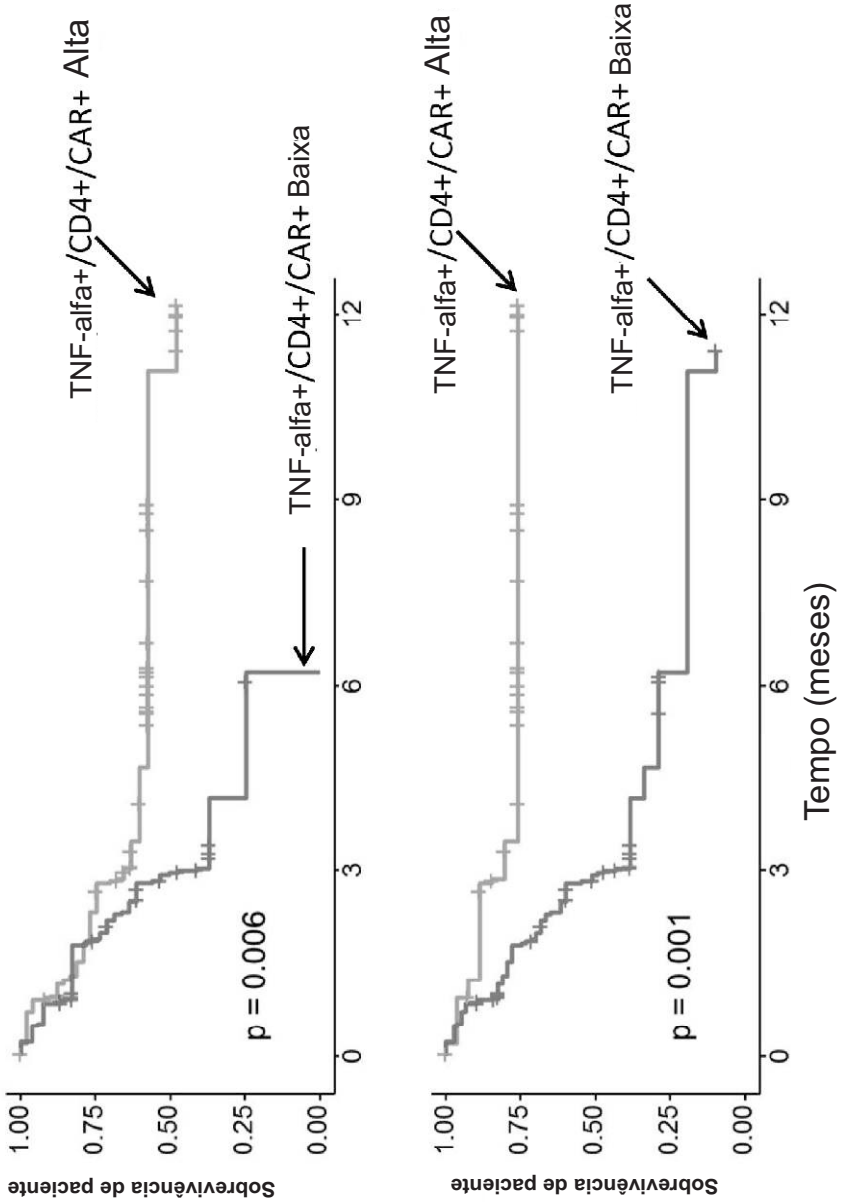

TNF-alfa+/CD4+/CAR+ Alta
TNF-alfa+/CD4+/CAR+ Baixa
p = 0.006
Sobrevivência de paciente
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
3
6
9
12
TNF-alfa+/CD4+/CAR+ Alta
TNF-alfa+/CD4+/CAR+ Baixa
p = 0.001
Sobrevivência de paciente
Tempo (meses)

FIG. 13B

FIG. 14

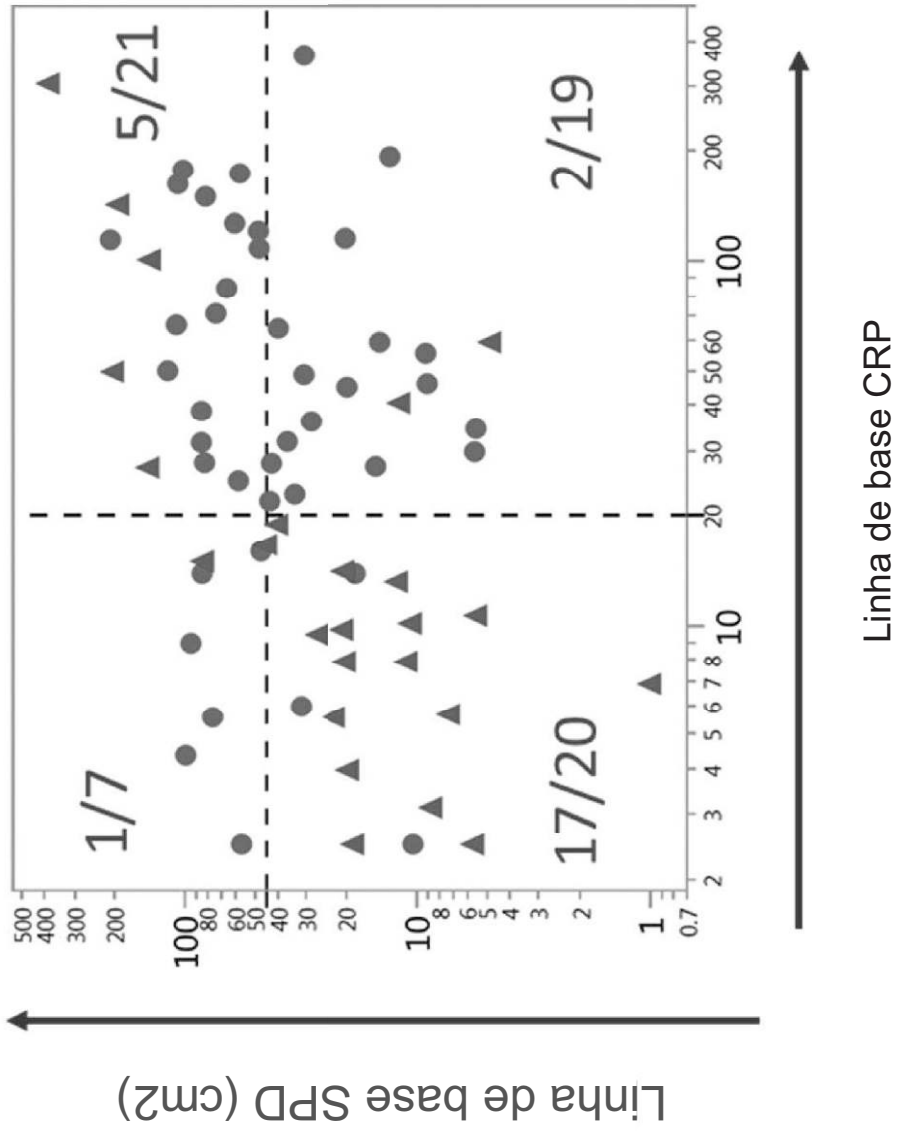

CRM6
0
1
Círculo (0):
Perda de resposta/sem reposta
Triângulo (1):
Permanece em resposta no mês 6
1/7
5/21
17/20
2/19
Linha de base SPD (cm2)
Linha de base CRP

FIG. 15

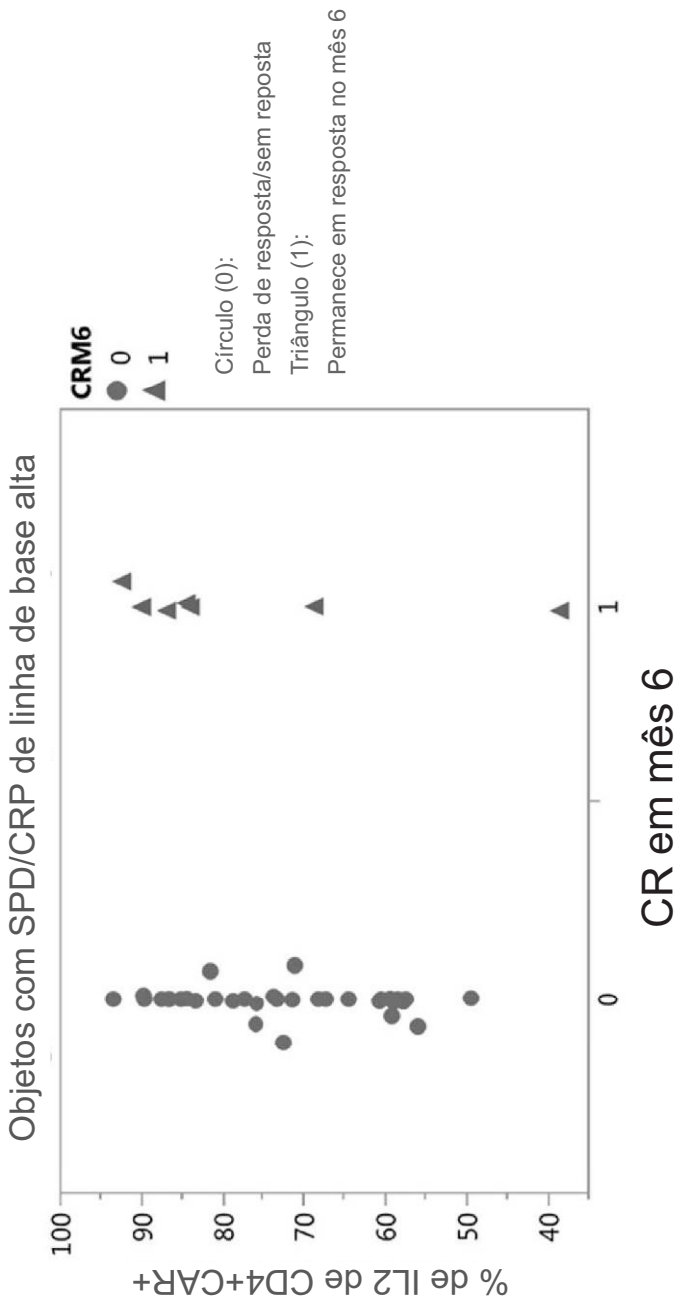

Objetos com SPD/CRP de linha de base alta
% de IL2 de CD4+CAR+
100
90
80
70
60
50
40
0
1
CR em mês 6
CRM6
0
1
Círculo (0):
Perda de resposta/sem reposta
Triângulo (1):
Permanece em resposta no mês 6

FIG. 16

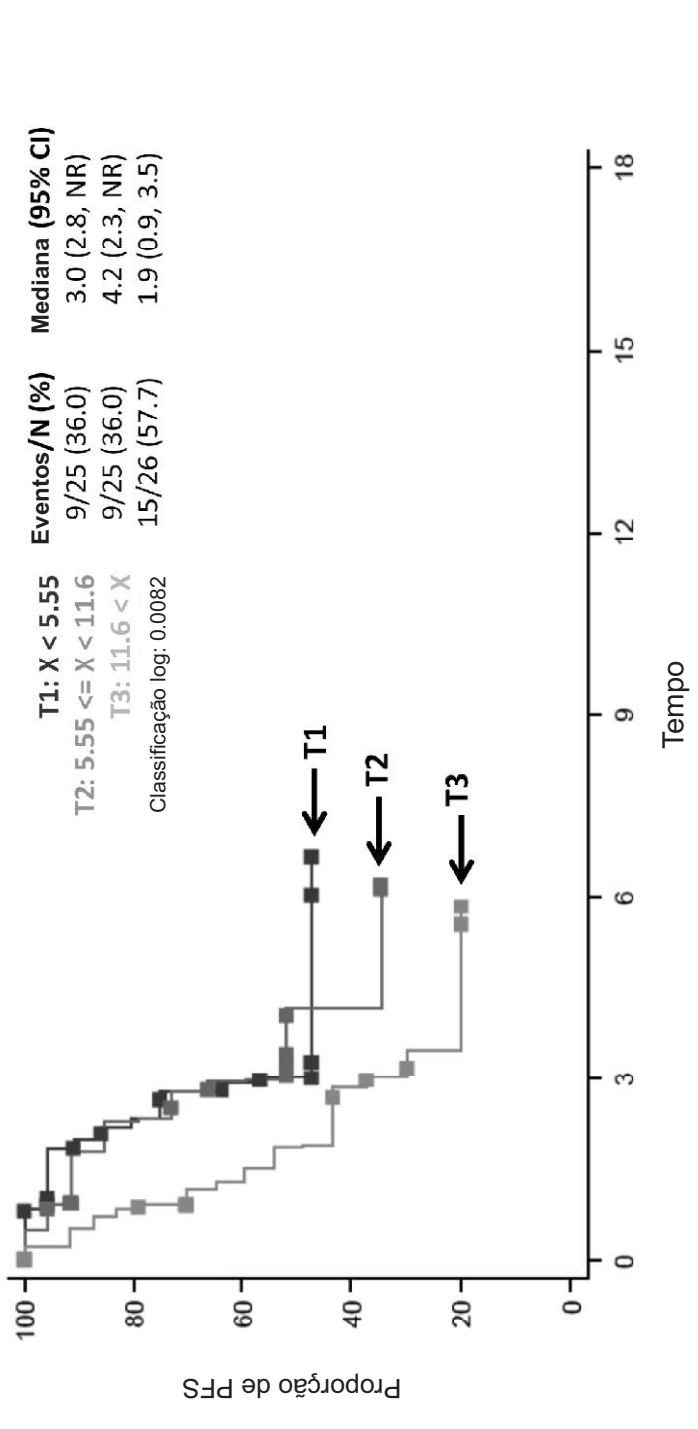
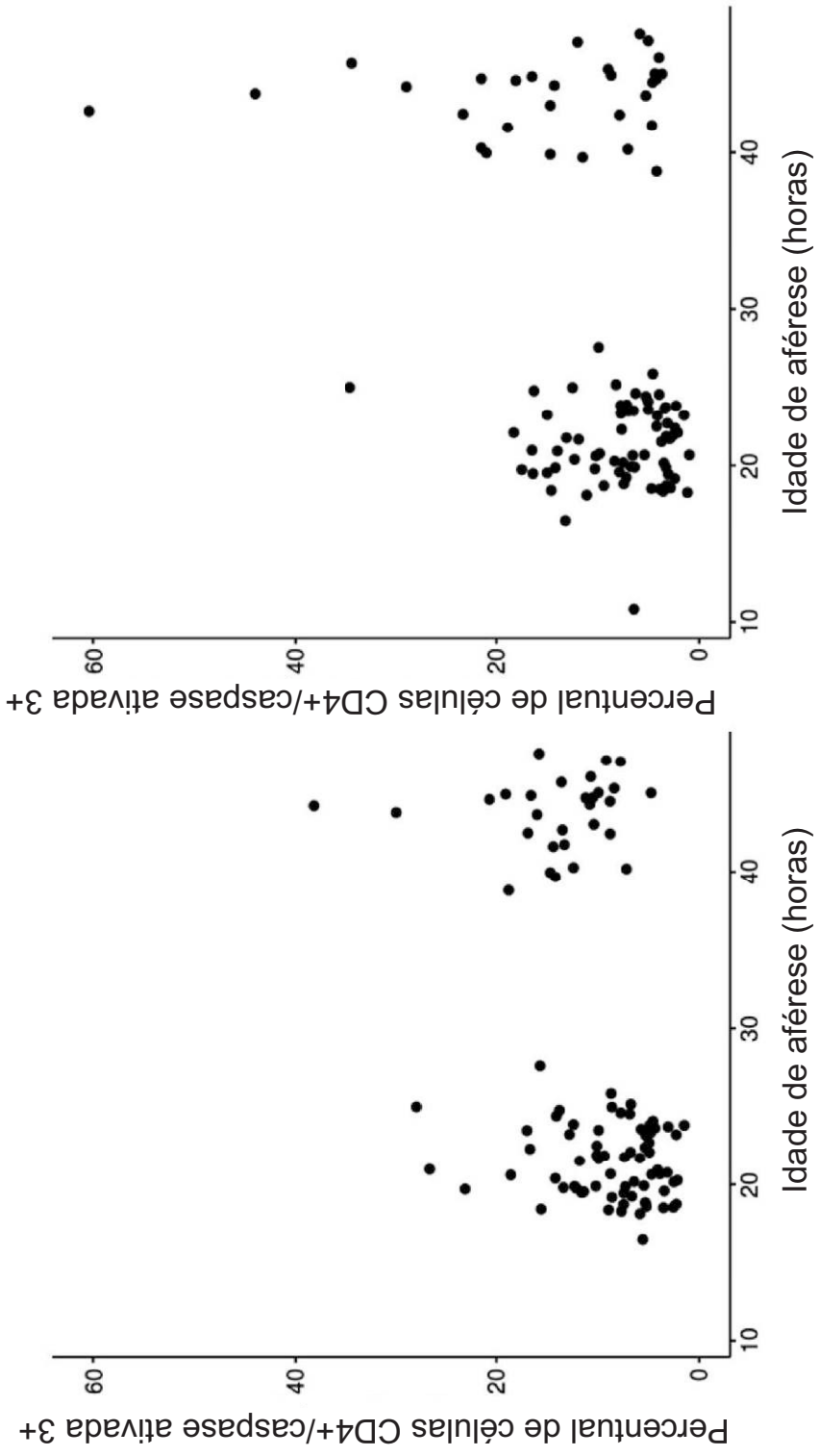

Sobrevivência livre de progressão em tertis de caspase 3 ativada de composição de entrada
T1: X < 5.55
T2: 5.55 <= X < 11.6
T3: 11.6 < X
Classificação log: 0.0082
Eventos/N (%)
9/25 (36.0)
9/25 (36.0)
15/26 (57.7)
Mediana (95% CI)
3.0 (2.8, NR)
4.2 (2.3, NR)
1.9 (0.9, 3.5)
T1
T2
T3
Proporção de PFS
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
Tempo

FIG. 17


Percentual de células CD4+/caspase ativada 3+
0
20
40
60
10
20
30
40
Idade de aférese (horas)
Percentual de células CD4+/caspase ativada 3+
0
20
40
60
10
20
30
40
Idade de aférese (horas)

RESUMO

Patente de Invenção: **"MARCADORES FENOTÍPICOS PARA TERAPIA CELULAR E MÉTODOS RELACIONADOS".**

A presente invenção refere-se a métodos, composições e artigos de fabricação para uso em terapia celular envolvendo a administração de uma ou mais doses de uma composição terapêutica de células T, e métodos, composições e artigos de fabricação para uso na mesma. As células da composição de célula T expressam receptores recombinantes, tais como receptores quiméricos, por exemplo, receptores antigênicos quiméricos (CARs) ou outros receptores transgênicos, tal como receptores de células T (TCRs). As características das modalidades da presente divulgação, incluindo a dose de células ou unidades de células administradas e/ou o fenótipo de células administradas, fornecem várias vantagens, tais como dosagem consistente, menor risco de toxicidade e/ou maior resposta em objetos administrados com as composições de célula T.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA EMENDAS P247519.TXT
- Data de Geração do Código: 03/07/2020
- Hora de Geração do Código: 09:04:54
- Código de Controle:
  - Campo 1: 5D6CF574B6CFC34C
  - Campo 2: 5FD460F7B894F355