



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

(21) BR 112020021660-7 A2



(22) Data do Depósito: 26/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 02/02/2021

(54) **Título:** MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR E PARA TRATAR UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, E, COMPOSIÇÃO DE CRIOPRESERVAÇÃO

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/17; C12N 5/09; C12N 15/90.

(30) **Prioridade Unionista:** 05/06/2018 US 62/680,821; 27/04/2018 US 62/663,885.

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

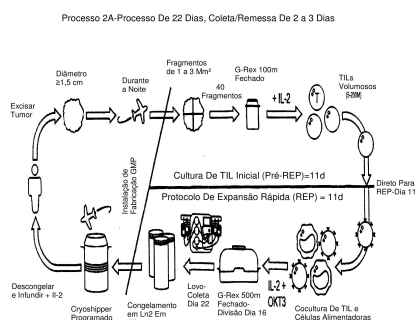
(72) **Inventor(es):** CECILE CHARTIER-COURTAUD; KRIT RITTHIPICHAJ.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019029286 de 26/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/210131 de 31/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 22/10/2020

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR E PARA TRATAR UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, E, COMPOSIÇÃO DE CRIOPRESERVAÇÃO. A presente invenção provê métodos melhorados e/ou encurtados para expandir TILs e produzir populações terapêuticas de TILs, incluindo novos métodos para expandir populações de TIL em um sistema fechado que leva à eficácia melhorada, fenótipo melhorado e saúde metabólica aumentada dos TILs em um período de tempo mais curto, enquanto permite contaminação microbiana reduzida assim como custos diminuídos. Os métodos podem compreender a edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs para realçar a sua eficácia terapêutica. Tais TILs encontram uso em regimes de tratamento terapêuticos.



MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR E PARA TRATAR UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, E, COMPOSIÇÃO DE CRIOPRESERVAÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Métodos para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e produzir populações terapêuticas de TILs são aqui descritos. Além disso, métodos para editar gene de TILs e usos de TILs editados no gene no tratamento de doenças tais como câncer são aqui divulgados.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O tratamento de cânceres volumosos, refratários usando a transferência adotiva de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) representa uma abordagem poderosa para terapia de pacientes com prognósticos insuficientes. Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 383-393. Um grande número de TILs é requerido para a imunoterapia bem sucedida e um processo robusto e confiável é necessário para a comercialização. Isto tem sido um desafio de se obter por causa de problemas técnicos, logísticos e reguladores com a expansão de célula. A expansão de TIL com base em IL-2 seguida por um “processo de expansão rápida” (REP) tem se tornado um método preferido para a expansão de TIL por causa da sua velocidade e eficiência. Dudley, *et al.*, *Science* 2002, 298, 850-54; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346-57; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233-39; Riddell, *et al.*, *Science* 1992, 257, 238-41; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* 2003, 26, 332-42. REP pode resultar em uma expansão de 1.000 vezes de TILs em um período de 14 dias, embora isto requeira um grande excesso (por exemplo, 200 vezes) de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, também conhecidas como células mononucleares (MNCs)) alogênicas, irradiadas, frequentemente a partir de doadores múltiplos, como células de alimentação, assim como anticorpo anti-CD3 (OKT3) e altas doses de IL-2. Dudley, *et al.*, *J.*

Immunother. 2003, 26, 332-42. TILs que passaram por um procedimento REP produziram terapia de célula adotiva bem sucedida a seguir da imunossupressão do hospedeiro em pacientes com melanoma. Parâmetros de aceitação de infusão correntes contam com as leituras da composição de TILs (por exemplo, positividade em CD28, CD8 ou CD4) e com as vezes de expansão e viabilidade do produto de REP.

[003] Os processos de fabricação de TIL correntes são limitados pela duração, custo, problemas de esterilidade e outros fatores aqui descritos tal que o potencial para comercializar tais processos é severamente limitado e por estas e outras razões, no presente momento nenhum processo comercial está disponível. Existe uma necessidade urgente quanto à provisão de processos de fabricação de TIL e terapias com base em tais processos que sejam apropriados para a fabricação na balança comercial e à aprovação regulatória para o uso em pacientes humanos em centros clínicos múltiplos. Além disso, existe uma necessidade forte quanto a terapias de TIL mais eficazes que possam aumentar uma taxa de resposta e robustez de resposta do paciente.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] A presente invenção provê métodos para expandir TILs e produzir populações terapêuticas de TILs. De acordo com modalidades exemplares, pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs são editadas no gene para realçar o seu efeito terapêutico.

[005] Em uma modalidade, a presente invenção provê um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem abrir o sistema;

(f) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(g) em qualquer tempo durante o método, editar gene de pelo menos uma porção dos TILs.

[006] Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente a etapa de criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida na etapa (f) usando um processo de

criopreservação.

[007] Em algumas modalidades, o processo de criopreservação é realizado usando uma razão 1:1 da população de TIL colhida para o meio de criopreservação.

[008] Em algumas modalidades, as células apresentando antígeno são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs). Em algumas modalidades, as PBMCs são irradiadas e alogênicas. Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à cultura de célula em qualquer um dos dias 9 a 14 na etapa (d). Em algumas modalidades, as células apresentando antígeno são células apresentando antígeno artificiais.

[009] Em algumas modalidades, a colheita na etapa (e) é realizada usando um sistema de processamento de célula com base em membrana.

[0010] Em algumas modalidades, a colheita na etapa (e) é realizada usando um sistema de processamento de célula LOVO.

[0011] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 a cerca de 50 fragmentos, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm^3 .

[0012] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm^3 a cerca de 1500 mm^3 .

[0013] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1350 mm^3 .

[0014] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama.

[0015] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula é provido em um recipiente selecionado do grupo consistindo em um recipiente G e um Xuri cellbag.

- [0016] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula na etapa (d) compreende adicionalmente IL-15 e/ou IL-21.
- [0017] Em algumas modalidades, a concentração de IL-2 é de cerca de 10.000 IU/mL a cerca de 5.000 IU/mL.
- [0018] Em algumas modalidades, a concentração de IL-15 é de cerca de 500 IU/mL a cerca de 100 IU/mL.
- [0019] Em algumas modalidades, a concentração de IL-21 é de cerca de 20 IU/mL a cerca de 0,5 IU/mL.
- [0020] Em algumas modalidades, a bolsa de infusão na etapa (f) é uma bolsa de infusão contendo um HypoThermosol.
- [0021] Em algumas modalidades, o meio de criopreservação compreende sulfóxido de dimetila (DMSO). Em algumas modalidades, o meio de criopreservação compreende 7% a 10% de sulfóxido de dimetila (DMSO).
- [0022] Em algumas modalidades, o primeiro período na etapa (c) e o segundo período na etapa (e) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 10 dias, 11 dias ou 12 dias.
- [0023] Em algumas modalidades, o primeiro período na etapa (c) e o segundo período na etapa (e) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 11 dias.
- [0024] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 22 dias.
- [0025] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 20 dias a cerca de 22 dias.
- [0026] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 15 dias a cerca de 20 dias.
- [0027] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 20 dias.
- [0028] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas

dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 15 dias.

[0029] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas em 22 dias ou menos.

[0030] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas em 20 dias ou menos.

[0031] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas em 15 dias ou menos.

[0032] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) são realizadas em 10 dias ou menos.

[0033] Em algumas modalidades, as etapas de (a) a (f) e a criopreservação são realizadas em 22 dias ou menos.

[0034] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs colhida na etapa (e) compreende TILs suficientes para uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs.

[0035] Em algumas modalidades, o número de TILs suficiente para uma dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

[0036] Em algumas modalidades, as etapas (b) a (e) são realizadas em um único recipiente, em que realizar as etapas (b) a (e) em um único recipiente resulta em um aumento no rendimento de TIL por tumor ressecado quando comparado com a realização das etapas (b) a (e) em mais do que um recipiente.

[0037] Em algumas modalidades, as células apresentando antígeno são adicionadas aos TILs durante o segundo período na etapa (d) sem abrir o sistema.

[0038] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa (d) provê eficácia aumentada, produção de interferon-gama aumentada, uma dosagem terapeuticamente eficaz aumentada, IP-10 médio aumentado e/ou MCP-1 médio aumentado quando administrados a um indivíduo.

[0039] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa (d) provê pelo menos uma produção de interferon-gama de cinco vezes ou mais quando administrada a um indivíduo.

[0040] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa (d) é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efectoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efectoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas do grupo consistindo em expressar CD27+, expressar CD28+, telômeros mais longos, expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

[0041] Em algumas modalidades, as células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da terceira população de TILs exibem expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

[0042] Em algumas modalidades, o risco de contaminação microbiana é reduzido quando comparado com um sistema aberto.

[0043] Em algumas modalidades, os TILs da etapa (g) são infundidos dentro de um paciente.

[0044] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 fragmentos.

[0045] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

[0046] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 foram inseridos dentro do

meio de cultura de célula.

[0047] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 seja inserido dentro do meio de cultura de célula.

[0048] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

[0049] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

[0050] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

[0051] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes da etapa (c), antes da etapa (d) ou antes da etapa (e).

[0052] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o OKT-3 fosse inserido dentro do meio de cultura de célula.

[0053] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

[0054] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 começando no dia de início da primeira expansão e a edição de gene é realizada depois que os TILs foram expostos ao OKT-3.

[0055] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[0056] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-

4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[0057] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

[0058] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionado(s) do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

[0059] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune.

[0060] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

[0061] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método CRISPR.

[0062] Em algumas modalidades, o método CRISPR é um método CRISPR/Cas9.

[0063] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um

método TALE.

[0064] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método do dedo de zinco.

[0065] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê um método para tratar um indivíduo com câncer, o método compreendendo administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um indivíduo pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c)

para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem abrir o sistema; e

(f) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema;

(g) opcionalmente criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida da etapa (f) usando um processo de criopreservação;

(h) administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs da bolsa de infusão na etapa (g) ao paciente; e

(i) em qualquer tempo durante as etapas (a) a (f) do método, editar gene de pelo menos uma porção dos TILs.

[0066] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs colhida na etapa (e) compreende TILs suficientes para administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs na etapa (h).

[0067] Em algumas modalidades, o número de TILs suficiente para administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz na etapa (h) é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

[0068] Em algumas modalidades, as células apresentando antígeno (APCs) são PBMCs.

[0069] Em algumas modalidades, as PBMCs são adicionadas à cultura de célula em qualquer um dos dias 9 a 14 na etapa (d).

[0070] Em algumas modalidades, antes de administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz de células de TIL na etapa (h), um regime de linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao paciente.

[0071] Em algumas modalidades, o regime de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida em

uma dose de 60 mg/m²/dia durante dois dias seguidas pela administração de fludarabina em uma dose de 25 mg/m²/dia durante cinco dias.

[0072] Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente a etapa de tratar o paciente com um regime de alta dose de IL-2 começando no dia depois da administração das células de TIL ao paciente na etapa (h).

[0073] Em algumas modalidades, o regime de alta dose de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 IU/kg administrados como uma infusão de bolo intravenoso de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

[0074] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa (d) é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efectoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efectoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas do grupo consistindo em expressar CD27+, expressar CD28+, telômeros mais longos, expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

[0075] Em algumas modalidades, as células T efectoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

[0076] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, câncer ovariano, câncer cervical, câncer pulmonar de célula não pequena (NSCLC), câncer pulmonar, câncer de bexiga, câncer mamário, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço

(HNSCC)), câncer renal e carcinoma de célula renal.

[0077] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, HNSCC, cânceres cervicais e NSCLC.

[0078] Em algumas modalidades, o câncer é melanoma.

[0079] Em algumas modalidades, o câncer é HNSCC.

[0080] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer cervical.

[0081] Em algumas modalidades, o câncer é NSCLC.

[0082] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

[0083] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 foram inseridos dentro do meio de cultura de célula.

[0084] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 fossem inseridos dentro do meio de cultura de célula.

[0085] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

[0086] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

[0087] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

[0088] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes da etapa (c), antes da etapa (d) ou antes da etapa (e).

[0089] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o OKT-3 fosse inserido dentro do meio de cultura de célula.

[0090] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

[0091] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 começando no dia de início da primeira expansão e a edição de gene é realizada depois que os TILs foram expostos ao OKT-3.

[0092] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[0093] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[0094] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

[0095] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionado(s) do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

[0096] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune.

[0097] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

[0098] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método CRISPR.

[0099] Em algumas modalidades, o método CRISPR é um método CRISPR/Cas9.

[00100] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método TALE.

[00101] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método do dedo de zinco.

[00102] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreendendo:

(a) adicionar fragmentos de tumor processados a partir de um tumor ressecado de um paciente dentro de um sistema fechado para se obter uma primeira população de TILs;

(b) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa

(a) para a etapa (b) ocorre sem abrir o sistema;

(c) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (c), em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) transferir a população de TIL colhida da etapa (d) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (d) para (e) ocorre sem abrir o sistema; e

(f) em qualquer tempo durante o método, editar gene de pelo menos uma porção dos TILs.

[00103] Em algumas modalidades, a população terapêutica de TILs colhida na etapa (d) compreende TILs suficientes para uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs.

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

[00105] Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente a etapa de criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida usando um processo de criopreservação.

[00106] Em algumas modalidades, o processo de criopreservação é realizado usando uma razão 1:1 da população de TIL colhida para o meio de

criopreservação.

[00107] Em algumas modalidades, as células apresentando antígeno são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

[00108] Em algumas modalidades, as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

[00109] Método de acordo com a reivindicação 68, em que as PBMCs são adicionadas à cultura de célula em qualquer um dos dias 9 a 14 na etapa (c).

[00110] Em algumas modalidades, as células apresentando antígeno são células apresentando antígeno artificiais.

[00111] Em algumas modalidades, a colheita na etapa (d) é realizada usando um sistema de processamento de célula LOVO.

[00112] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 a cerca de 50 fragmentos, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm^3 .

[00113] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm^3 a cerca de 1500 mm^3 .

[00114] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1350 mm^3 .

[00115] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama.

[00116] Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 fragmentos.

[00117] Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de célula é provido em um recipiente selecionado do grupo consistindo em um recipiente G e um Xuri cellbag.

[00118] Em algumas modalidades, a bolsa de infusão na etapa (e) é uma bolsa de infusão contendo um HypoThermosol.

[00119] Em algumas modalidades, o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 10 dias, 11 dias ou 12 dias.

[00120] Em algumas modalidades, o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 11 dias.

[00121] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (e) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 22 dias.

[00122] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (e) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 20 dias.

[00123] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (e) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 15 dias.

[00124] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (e) são realizadas em 22 dias ou menos.

[00125] Em algumas modalidades, as etapas (a) a (e) e a criopreservação são realizadas em 22 dias ou menos.

[00126] Em algumas modalidades, as etapas (b) a (e) são realizadas em um único recipiente, em que realizar as etapas (b) a (e) em um único recipiente resulta em um aumento no rendimento de TIL por tumor ressecado quando comparado com a realização das etapas (b) a (e) em mais do que um recipiente.

[00127] Em algumas modalidades, as células apresentando antígeno são adicionadas aos TILs durante o segundo período na etapa (c) sem abrir o sistema.

[00128] Em algumas modalidades, a terceira população de TILs na etapa (d) é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória

central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central obtida na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas do grupo consistindo em expressar CD27+, expressar CD28+, telômeros mais longos, expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

[00129] Em algumas modalidades, as células T efetoras e/ou células T de memória central obtida na população terapêutica de TILs exibem expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

[00130] Em algumas modalidades, o risco de contaminação microbiana é reduzido quando comparado com um sistema aberto.

[00131] Em algumas modalidades, os TILs da etapa (e) são infundidos dentro de um paciente.

[00132] Em algumas modalidades, o recipiente fechado compreende um único biorreator.

[00133] Em algumas modalidades, o recipiente fechado compreende um G-REX-10.

[00134] Em algumas modalidades, o recipiente fechado compreende um G-REX-100.

[00135] Em algumas modalidades, na etapa (d) as células apresentando antígeno (APCs) são adicionadas à cultura de célula da segunda população de TILs a uma razão de APC:TIL de 25:1 a 100:1.

[00136] Em algumas modalidades, a cultura celular tem uma razão de $2,5 \times 10^9$ APCs para 100×10^6 TILs.

[00137] Em algumas modalidades, na etapa (c) as células apresentando antígeno (APCs) são adicionadas à cultura de célula da segunda população de

TILs em uma razão de APC:TIL de 25:1 a 100:1.

[00138] Em algumas modalidades, a cultura celular tem razão de $2,5 \times 10^9$ APCs a 100×10^6 TILs.

[00139] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

[00140] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 foram inseridos dentro do meio de cultura de célula.

[00141] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 fossem inseridos dentro do meio de cultura de célula.

[00142] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

[00143] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

[00144] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

[00145] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes da etapa (b), antes da etapa (c) ou antes da etapa (d).

[00146] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o OKT-3 fosse inserido dentro do meio de cultura de célula.

[00147] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

[00148] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 começando no dia de início da primeira expansão e a edição de gene é realizada depois que os TILs foram expostos ao OKT-3.

[00149] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[00150] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[00151] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

[00152] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionado do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

[00153] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune.

[00154] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

[00155] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método CRISPR.

[00156] Em algumas modalidades, o método CRISPR é um método CRISPR/Cas9.

[00157] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método TALE.

[00158] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método do dedo de zinco.

[00159] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê uma população de TILs terapêuticos que foram expandidos de acordo com qualquer um dos métodos de expansão aqui descritos (por exemplo, para o uso no tratamento de um câncer do indivíduo), em que a população de TILs terapêuticos foi permanentemente editada no gene.

[00160] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê uma população de TILs expandidos para o uso no tratamento de um indivíduo com câncer, em que a população de TILs expandidos é uma terceira população de TILs obteníveis por um método compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um indivíduo pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma

primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem abrir o sistema;

(f) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema;

(g) opcionalmente criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida da etapa (f) usando um processo de criopreservação; e

(h) em qualquer tempo durante o método, editar gene de pelo menos uma porção dos TILs.

[00161] Em algumas modalidades, o método acima compreende adicionalmente um ou mais traços citados em qualquer um dos métodos e composições aqui descritos.

[00162] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula

compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

[00163] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 foram inseridos dentro do meio de cultura de célula.

[00164] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 fossem inseridos dentro do meio de cultura de célula.

[00165] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

[00166] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

[00167] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

[00168] Em algumas modalidades, a edição de gene é realizada antes da etapa (c), antes da etapa (d) ou antes da etapa (e).

[00169] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o OKT-3 fosse inserido dentro do meio de cultura de célula.

[00170] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

[00171] Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 começando no dia de início da primeira expansão e a edição de gene é realizada depois que os TILs foram expostos ao OKT-3.

[00172] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a

expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[00173] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[00174] Em algumas modalidades, o um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

[00175] Em algumas modalidades, a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionado do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

[00176] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune.

[00177] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

[00178] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um

método CRISPR.

[00179] Em algumas modalidades, o método CRISPR é um método CRISPR/Cas9.

[00180] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método TALE.

[00181] Em algumas modalidades, a edição de gene compreende um método do dedo de zinco.

[00182] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo OKT-3 e/ou um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) opcionalmente adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas.

[00183] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê um método para tratar um indivíduo com câncer, o método compreendendo administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos

compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo OKT-3 e/ou um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) opcionalmente adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem

abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema;

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila; e

(k) administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL colhida da bolsa de infusão ao paciente;

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas.

[00184] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê uma população de TILs expandidos para o uso no tratamento de um indivíduo com câncer, em que a população de TILs expandidos é uma população de TILs colhida obtível por um método compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira

população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo OKT-3 e/ou um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) opcionalmente adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o

sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas.

[00185] Em algumas modalidades, o método compreende realizar a primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2, OKT-3 e um anticorpo agonista de 4-1BB, em que o OKT-3 e o anticorpo agonista de 4-1BB estão opcionalmente presentes no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1.

[00186] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê uma composição de criopreservação compreendendo a população de TILs para o uso para tratar um indivíduo com câncer, um meio crioprotetor compreendendo DMSO e uma solução de eletrólito.

[00187] Em algumas modalidades, a composição de criopreservação pode compreender adicionalmente um ou mais estabilizantes (por exemplo, HSA) e um ou mais fatores de crescimento de linfócito (por exemplo, IL-2).

[00188] Em algumas modalidades, o meio crioprotetor compreendendo DMSO e a solução de eletrólito estão presentes em uma razão de cerca de 1,1:1 a cerca de 1:1,1.

[00189] Em algumas modalidades, a composição de criopreservação compreende o meio crioprotetor compreendendo DMSO em uma quantidade de cerca de 30 mL a cerca de 70 mL, a solução de eletrólito em uma

quantidade de cerca de 30 mL a cerca de 70 mL, HSA em uma quantidade de cerca de 0,1 g a cerca de 1,0 g e IL-2 em uma quantidade de cerca de 0,001 mg a cerca de 0,005 mg.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00190] **Figura 1:** Mostra um diagrama de uma modalidade do processo 2A, um processo de 22 dias para a fabricação de TIL.

[00191] **Figura 2:** Mostra uma comparação entre o processo 1C e uma modalidade do processo 2A para a fabricação de TIL.

[00192] **Figura 3:** Mostra o cronograma do processo 1C.

[00193] **Figura 4:** Mostra o processo de uma modalidade de terapia de TIL usando o processo 2A para a fabricação de TIL, incluindo as etapas de administração e coterapia, para contagens de célula mais altas.

[00194] **Figura 5:** Mostra o processo de uma modalidade da terapia de TIL usando o processo 2A para a fabricação de TIL, incluindo as etapas de administração e coterapia, para contagens de célula mais baixas.

[00195] **Figura 6:** Mostra um esquemático detalhado para uma modalidade do processo 2A.

[00196] **Figuras 7a, 7b e 7c:** Representam as etapas principais de uma modalidade do processo 2A incluindo as etapas de criopreservação.

[00197] **Figura 8:** Representa o projeto de teste clínico incluindo grupos tratados com o processo 1C e uma modalidade do processo 2A.

[00198] **Figura 9:** Mapa esquemático do Processo Exemplar 2A provendo uma vista geral das Etapas A a F.

[00199] **Figura 10:** Mapa Esquemático do Fluxo de Processo do Plano de Colheita de Dados do Processo 2A

[00200] **Figura 11:** Esquema de uma modalidade exemplar do Protocolo de Expansão Rápida (REP). Na chegada o tumor é fragmentado, colocado dentro de frascos G-Rex com IL-2 para a expansão de TIL (expansão pré-REP), por 11 dias. Para os estudos de coquetel triplo, IL-2/IL-

15/IL-21 são adicionadas no início da pré-REP. Para o Protocolo de Expansão Rápida (REP), TILs são cultivados com alimentadoras e OKT3 para expansão de REP por um adicional de 11 dias.

[00201] **Figura 12:** Mostra um diagrama de uma modalidade do processo 2A, um processo de 22 dias para a fabricação de TIL.

[00202] **Figura 13:** Tabela de comparação das Etapas A a F das modalidades exemplares do processo 1C e processo 2A.

[00203] **Figura 14:** Comparação detalhada de uma modalidade do processo 1C e uma modalidade do processo 2A.

[00204] **Figura 15:** Esquema detalhado de uma modalidade de um processo de terapia de TIL.

[00205] **Figura 16:** Representação de uma modalidade de um processo de fabricação de TIL criopreservado (22 dias).

[00206] **Figura 17:** Tabela de melhorias de processo de Gen 1 para Gen 2.

[00207] **Figura 18:** Uma modalidade de um processo de fabricação de TIL da presente invenção.

[00208] **Figura 19:** Mapa Esquemático do Fluxo de Processo do Processo 2A.

[00209] **Figura 20:** Representação de uma modalidade de um processo de fabricação de TIL incluindo a etapa de eletroporação para o uso com processos de edição de gene (incluindo TALEN, nuclease dedo de zinco e métodos CRISPR como aqui descritos).

[00210] **Figura 21:** Representação de modalidades de processos de fabricação de TIL incluindo a etapa de eletroporação para o uso com processos de edição de gene (incluindo TALEN, nuclease dedo de zinco e métodos CRISPR como aqui descritos).

[00211] **Figura 22:** Representação das estruturas I-A e I-B, os cilindros se referem a domínios de ligação de polipeptídeo individuais. As estruturas I-

A e I-B compreendem três domínios de ligação de TNFRSF linearmente ligados derivados por exemplo, de 4-1BBL ou um anticorpo que liga 4-1BB, que dobra para formar uma proteína trivalente, que é depois ligada a uma segunda proteína trivalente através de IgG1-Fc (incluindo os domínios CH3 e CH2) é depois usada para ligar duas das proteínas trivalentes juntas através de ligações de dissulfeto (ovais alongados pequenos), estabilizando a estrutura e provendo um agonista capaz de juntar os domínios de sinalização intracelular dos seis receptores e proteínas de sinalização para formar um complexo de sinalização. os domínios de ligação de TNFRSF indicados como cilindros podem ser domínios scFv compreendendo, por exemplo, uma cadeia V_H e uma V_L conectadas por um ligador que pode compreender resíduos hidrofílicos e sequências Gly e Ser para flexibilidade, assim como Glu e Lys para solubilidade.

[00212] **Figura 23:** Representação de uma construção TALEN que alveja o exon 2 do gene Pcdcl1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Introdução

[00213] A terapia de célula adotiva utilizando TILs cultivados *ex vivo* pelo Protocolo de Expansão Rápida (REP) tem produzido terapia de célula adotiva bem sucedida a seguir da imunossupressão do hospedeiro em pacientes com melanoma. Parâmetros de aceitação de infusão correntes contam com leituras da composição de TILs (por exemplo, positividade de CD28, CD8 ou CD4) e com as dobras numéricas de expansão e viabilidade do produto de REP.

[00214] Os protocolos de REP correntes dão pouco discernimento sobre a saúde do TIL que será infundido dentro do paciente. As células T passam por uma mudança metabólica profunda durante o curso da sua maturação a partir das células T ingênuas para efetoras (ver Chang, *et al.*, *Nat. Immunol.* 2016, 17, 364, deste modo expressamente incorporada na sua

totalidade e em particular para debate e marcadores de metabolismo anaeróbico e aeróbico). Por exemplo, células T ingênuas contam com a respiração mitocondrial para produzir ATP, enquanto as células T efetoras maduras, saudáveis tais como TIL são altamente glicolíticas, contando com a glicose aeróbica para prover os substratos bioenergéticos que elas requerem para a proliferação, migração, ativação e eficácia antitumor.

[00215] Documentos anteriores relatam que limitar a glicólise e promover o metabolismo mitocondrial nos TILs antes da transferência é desejável visto que as células que estão pesadamente contando com a glicólise sofrerão privação de nutriente na transferência adotiva o que resulta em na morte de uma maioria das células transferidas. Assim, a técnica ensina que promover o metabolismo mitocondrial promoveria a longevidade *in vivo* e de fato sugere usar inibidores de glicólise antes da indução da resposta imune. Ver Chang, *et al.*, *Nat. Immunol.* 2016, 17(364).

[00216] A presente invenção é direcionada adicionalmente em algumas modalidades aos métodos para avaliar e quantificar este aumento na saúde metabólica. Assim, a presente invenção provê métodos de ensaiar a saúde relativa de uma população TIL usando uma ou mais avaliações gerais de metabolismo, incluindo, mas não limitado a taxas e quantidades de glicólise, fosforilação oxidativa, capacidade respiratória de reserva (SRC) e reserva glicolítica.

[00217] Além disso, a presente invenção está direcionada adicionalmente em algumas modalidades aos métodos para avaliar e quantificar este aumento na saúde metabólica. Assim, a presente invenção provê métodos de ensaiar a saúde relativa de uma população de TIL usando uma ou mais avaliações gerais de metabolismo, incluindo, mas não limitado a taxas e quantidades de glicólise, fosforilação oxidativa, capacidade respiratória de reserva (SRC) e reserva glicolítica.

[00218] Além disso, avaliações adicionais opcionais incluem, mas não

são limitadas à produção de ATP, massa mitocondrial e captação de glicose.

[00219] A presente invenção é direcionada adicionalmente em algumas modalidades para o realce de efeitos terapêuticos de TILs com o uso da tecnologia de edição de gene. Embora a transferência adotiva de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) ofereça uma terapia promissora e eficaz, existe uma necessidade forte para terapias de TIL mais eficaz que podem aumentar uma taxa de resposta e robustez de resposta do paciente. Como aqui descrito, modalidades da presente invenção proveem métodos para expandir TILs dentro de uma população terapêutica que sejam editados no gene para prover um efeito terapêutico realçado.

II. Definições

[00220] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usadas têm o mesmo significado como é habitualmente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual essa invenção pertence. Todas as patentes e publicações aqui aludidas são incorporadas por referência em suas totalidades.

[00221] O termo “*in vivo*” se refere a um evento que ocorre em um corpo do indivíduo.

[00222] O termo “*in vitro*” se refere a um evento que ocorre fora de um corpo do indivíduo. Os ensaios *in vitro* abrangem ensaios com base em célula nos quais células vivas ou mortas são utilizadas e também podem abranger um ensaio livre de célula no qual nenhuma célula intacta é utilizada.

[00223] O termo “*ex vivo*” se refere a um evento que envolve tratar ou realizar um procedimento em uma célula, tecido e/ou órgão que foram removidos de um corpo do indivíduo. Adequadamente, a célula, tecido e/ou órgão podem ser retornadas para o corpo do indivíduo em um método de cirurgia ou tratamento.

[00224] O termo “expansão rápida” significa um aumento no número de TILs específicos de antígeno de pelo menos cerca de 3 vezes (ou 4-, 5-, 6-,

7-, 8- ou 9 vezes) em um período de uma semana, mais preferivelmente pelo menos cerca de 10 vezes (ou 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80- ou 90 vezes) em um período de uma semana ou mais preferivelmente pelo menos cerca de 100 vezes em um período de uma semana. Vários Protocolos de Expansão Rápida são resumidos abaixo.

[00225] Por “linfócitos infiltrantes de tumor” ou “TILs” aqui é intencionada uma população de células originalmente obtida como células sanguíneas brancas que deixaram a corrente sanguínea de um indivíduo e migraram para dentro de um tumor. TILs incluem, mas não são limitados a células T CD8⁺ citotóxicas (linfócitos), células T CD4⁺ Th1 e Th17, células matadoras naturais, células dendríticas e macrófagos M1. TILs incluem tanto TIL primário quanto secundário. “TILs primários” são aqueles que são obtida a partir de amostras teciduais do paciente como aqui resumido (algumas vezes aludidos como “colhidos frescos”) e “TILs secundários” são quaisquer populações de célula de TIL que foram expandidas ou proliferadas como aqui debatido, incluindo, mas não limitados a TILs volumosos e TILs expandidos (“TILs REP” ou “TILs pós-REP”). As populações de célula de TIL podem incluir TILs geneticamente modificados.

[00226] Por “população de células” (incluindo TILs) aqui é intencionada várias células que compartilham traços comuns. No geral, as populações geralmente variam de 1×10^6 a 1×10^{10} em número, com populações de TIL diferentes compreendendo números diferentes. Por exemplo, crescimento inicial de TILs primários na presença de IL-2 resulta em uma população de TILs volumosos de aproximadamente 1×10^8 células. A expansão de REP é geralmente feita para prover populações de $1,5 \times 10^9$ a $1,5 \times 10^{10}$ células para infusão.

[00227] Por “TILs criopreservadas” aqui é intencionado que TILs, primários, volumosos ou expandidos (TILs REP), são tratados e armazenados na faixa de cerca de -150°C a -60°C. Métodos gerais para criopreservação são

também aqui descritos em outro lugar, incluindo nos Exemplos. Para clareza, “TILs criopreservados” são distinguíveis das amostras teciduais congelado que podem ser usadas como uma fonte de TILs primários.

[00228] Por “TILs criopreservados descongelados” aqui é intencionado uma população de TILs que foi previamente criopreservada e depois tratada para retornar para a temperatura ambiente ou mais alta, incluindo, mas não limitada às temperaturas de cultura celular ou temperaturas nas quais os TILs podem ser administrados a um paciente.

[00229] TILs podem geralmente ser definidos bioquimicamente, usando marcadores de superfície celular ou funcionalmente, pela sua capacidade para infiltrar tumores e efetuar tratamento. TILs podem ser geralmente categorizados pela expressão de um ou mais dos seguintes biomarcadores: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 e CD25. Adicional e alternativamente, TILs podem ser funcionalmente definidos pela sua capacidade para infiltrar tumores sólidos na reintrodução dentro de um paciente.

[00230] Os termos “meios de criopreservação” ou “meio de criopreservação” se referem a qualquer meio que possa ser usada para a criopreservação de células. Tais meios podem incluir meios compreendendo 7% a 10% de DMSO. Os meios exemplares incluem CrioStor CS10, Hyperthermasol, assim como combinações dos mesmos. O termo “CS10” se refere a um meio de criopreservação que é obtida a partir da Stemcell Technologies ou da Bioline Solutions. O meio CS10 pode ser aludido pelo nome comercial “CrioStor® CS10”. O meio CS10 é um meio livre de soro, livre de componente animal que compreende DMSO.

[00231] O termo “célula T de memória central” se refere a um subconjunto de células T que no ser humano são CD45RO⁺ e constitutivamente expressam CCR7 (CCR7^{hi}) e CD62L (CD62^{hi}). O fenótipo de superfície das células T de memória central também inclui TCR, CD3,

CD127 (IL-7R) e IL-15R. Os fatores de transcrição para as células T de memória central incluem BCL-6, BCL-6B, MBD2 e BMI1. As células T de memória central primariamente secretam IL-2 e CD40L como moléculas efetoras depois da deflagração de TCR. As células T de memória central são predominantes no compartimento CD4 no sangue e nos seres humanos são proporcionalmente enriquecidos nos linfonodos e amígdalas.

[00232] O termo “célula T de memória efetora” se refere a um subconjunto de células T humanas ou de mamífero que, semelhantes às células T de memória central, são CD45R0+, mas perderam a expressão constitutiva de CCR7 (CCR7^{lo}) e são heterogêneas ou baixas quanto à expressão de CD62L (CD62L^{lo}). O fenótipo de superfície das células T de memória central também inclui TCR, CD3, CD127 (IL-7R) e IL-15R. Os fatores de transcrição para as células T de memória central incluem BLIMP1. As células T de memória efetoras rapidamente secretam altos níveis de citocinas inflamatórias a seguir da estimulação antigênica, incluindo interferon- γ , IL-4 e IL-5. As células T de memória efetoras são predominantes no compartimento CD8 no sangue e nos seres humanos são proporcionalmente enriquecidos no pulmão, fígado e intestino. As células T de memória efetoras CD8+ carregam grandes quantidades de perforina.

[00233] O termo “sistema fechado” se refere a um sistema que é fechado para o ambiente externo. Qualquer sistema fechado apropriado para os métodos de cultura celular pode ser utilizado com os métodos da presente invenção. Os sistemas fechados incluem, por exemplo, mas não são limitados aos recipientes G fechados. Uma vez que um segmento de tumor é adicionado ao sistema fechado, o sistema não é aberto para o ambiente externo até que os TILs estejam prontos para serem administrados ao paciente.

[00234] Os termos “fragmentação,” “fragmento,” e “fragmentado,” como aqui usadas para descrever processos para romper um tumor, incluem métodos de fragmentação mecânica tais como esmagamento, fatiamento,

divisão e morcelação do tecido de tumor assim como qualquer outro método para romper a estrutura física teciduais de tumor.

[00235] Os termos “células mononucleares de sangue periférico” e “PBMCs” se referem a uma célula de sangue periférico tendo um núcleo redondo, incluindo linfócitos (células T, células B, células NK) e monócitos. Preferivelmente, as células mononucleares de sangue periférico são células mononucleares de sangue periférico alogênicas irradiadas. As PBMCs são um tipo de célula apresentando antígeno.

[00236] O termo “anticorpo anti-CD3” se refere a um anticorpo ou variante do mesmo, por exemplo, um anticorpo monoclonal e incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos ou de murino que são direcionados contra o receptor de CD3 no receptor de antígeno de célula T de células T maduras. Os anticorpos anti-CD3 incluem OKT-3, também conhecidos como muromonab. Os anticorpos anti-CD3 também incluem o clone UHCT1, também conhecido como T3 e CD3ε. Outros anticorpos anti-CD3 incluem, por exemplo, orelizumab, teplizumab e visilizumab.

[00237] O termo “OKT-3” (também aqui aludido como “OKT3”) se refere a um anticorpo monoclonal ou biossimilar ou variante do mesmo, incluindo anticorpos humanos, humanizados, quiméricos ou de murino, direcionados contra o receptor de CD3 no receptor de antígeno de célula T de células T maduras e incluem formas comercialmente disponíveis tais como OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 puro, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA) e muromonab ou variantes, substituições conservativas de aminoácido, glicoformas ou biossimilares dos mesmos. As sequências de aminoácido das cadeias pesadas e leve de muromonab são dadas na Tabela 1 (SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2). Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 é depositado com a American Type Culture Collection e designado com o número de acesso ATCC CRL 8001. Um hibridoma capaz de produzir OKT-3 também está depositado com a European Collection of Authenticated Cell

Cultures (ECACC) e designado Catálogo No. 86022706. Os anticorpos anti-CD3 também incluem o clone UHCT1 (comercialmente disponível da BioLegend, San Diego, CA, USA), também conhecido como T3 e CD3ε.

TABELA 1. Sequências de aminoácido de muromonab.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 1 Muromonab cadeia pesada	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTN 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 2 Muromonab cadeia leve	QIVLTQSPAI MSASPGKVMT MTCASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNK NEC 213

[00238] O termo “IL-2” (também aqui aludido como “IL2”) se refere ao fator de crescimento de célula T conhecido como interleucina-2 e inclui todas as formas de IL-2 incluindo as formas humana e mamífera, substituições conservativas de aminoácido, glicoformas, biossimilares e variantes dos mesmos. A IL-2 é descrita, por exemplo, em Nelson, *J. Immunol.* 2004, 172, 3983-88 e Malek, *Annu. Rev. Immunol.* 2008, 26, 453-79, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. A sequência de aminoácido de IL-2 humana recombinante adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 3). Por exemplo, o termo IL-2 abrange as formas humanas, recombinantes de IL-2 tais como aldesleucina (PROLEUCINA, comercialmente disponível de múltiplos fornecedores em 22 milhões de IU por frascos de uso único), assim como a forma de IL-2 recombinante comercialmente suprida pela CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) ou ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East

Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-209-b) e outros equivalentes comerciais de outros vendedores. Aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana) é uma forma recombinante humana não glicosilada de IL-2 com um peso molecular de aproximadamente 15 kDa. A sequência de aminoácido de aldesleucina adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 4). O termo IL-2 também abrange formas peguiladas de IL-2, como aqui descritos, incluindo o pró-fármaco de IL2 peguilado NKTR-214, disponível da Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214 e IL-2 peguilada adequados para o uso na invenção estão descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2014/0328791 A1 e Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 2012/065086 A1, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As formas alternativas de IL-2 conjugada adequada para o uso na invenção são descritas nas Patentes U.S. Nos. 4.766.106, 5.206.344, 5.089.261 e 4.902.502, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As formulações de IL-2 adequadas para o uso na invenção são descritas na Patente U.S. No. 6.706.289, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência.

TABELA 2. Sequências de aminoácido de interleucinas.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 3 IL-2 recombinante humana (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKPYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIV _L ELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO: 4 Aldesleucina	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEV _L N LAQSKNFHLR PRDLISNINV IV _L ELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO: 5 IL-4 recombinante humana (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TV _L RQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLTKI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO: 6 IL-7 recombinante humana (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESV _L MVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHCDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLQLQEI TCWNKILMGT KEH 153

SEQ ID NO: 7 IL-15 recombinante humana (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DV _H PSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFV _H IVQM FINTS 115
SEQ ID NO: 8 IL-21 recombinante humana (rhIL-21)	MQDRHMIRM MR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVISI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ 120 HLSRTHGSE DS 132

[00239] O termo “IL-4” (também aqui aludido como “IL4”) se refere à citocina conhecida como interleucina 4, que é produzida pelas células T Th2 e pelos eosinófilos, basófilos e mastóides. IL-4 regula a diferenciação de células T auxiliares ingênuas (células Th0) para células T Th2. Steinke e Borish, *Respir. Res.* 2001, 2, 66-70. Na ativação pela IL-4, as células T Th2 subsequentemente produzem IL-4 adicional em uma alça de retroalimentação positiva. A IL-4 também estimula a proliferação de célula B e expressão de MHC de classe II e induz a comutação de classe para a expressão de IgE e IgG₁ a partir das células B. A IL-4 recombinante humana adequada para o uso na invenção é comercialmente disponível de múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-211) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante de IL-15 humana, Cat. No. Gibco CTP0043). A sequência de aminoácido de IL-4 recombinante humana adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 5).

[00240] O termo “IL-7” (também aqui aludido como “IL7”) se refere a uma citocina derivada de tecido glicosilada conhecida como interleucina 7, que pode ser obtida a partir de células estrômicas e epiteliais, assim como a partir de células dendríticas. Fry e Mackall, *Blood* 2002, 99, 3892-904. A IL-7 pode estimular o desenvolvimento de células T. A IL-7 se liga ao receptor de IL-7, um heterodímero consistindo do receptor alfa de IL-7 e receptor de cadeia gama comum, que em uma série de sinais importantes para o desenvolvimento de célula T dentro do timo e sobrevivência dentro da periferia. A IL-7 recombinante humana adequada para o uso na invenção está comercialmente disponível a partir de múltiplos fornecedores, incluindo

ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-254) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (a proteína recombinante da IL-15 humana, Cat. No. Gibco PHC0071). A sequência de aminoácido da IL-7 recombinante humana adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 6).

[00241] O termo “IL-15” (também aqui aludido como “IL15”) se refere ao fator de crescimento de célula T conhecido como interleucina-15 e inclui todas as formas de IL-2 incluindo formas humanas e mamíferas, substituições conservativas de aminoácido, glicoformas, biossimilares e variantes das mesmas. A IL-15 está descrita, por exemplo, em Fehniger e Caligiuri, *Blood* 2001, 97, 14-32, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. A IL-15 compartilha subunidades de receptor de sinalização com IL-2. A IL-15 recombinante humana é uma cadeia de polipeptídeo único, não glicosilada contendo 114 aminoácidos (e uma metionina de terminal N) com uma massa molecular de 12,8 kDa. A IL-15 recombinante humana é comercialmente disponível a partir de múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-230-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante de IL-15 humana, Cat. No. 34-8159-82). A sequência de aminoácido de IL-15 recombinante humana adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 7).

[00242] O termo “IL-21” (também aqui aludido como “IL21”) se refere à proteína de citocina pleiotrópica conhecida como interleucina-21 e inclui todas as formas de IL-21 incluindo formas humana e mamífera, substituições conservativas de aminoácido, glicoformas, biossimilares e variantes das mesmas. A IL-21 está descrita, por exemplo, em Spolski e Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* 2014, 13, 379-95, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. A IL-21 é primariamente produzida pelas células T exterminadoras naturais e células T CD4⁺ humanas ativadas. A IL-21 recombinante humana é

uma cadeia de polipeptídeo única, não glicosilada contendo 132 aminoácidos com uma massa molecular de 15,4 kDa. A IL-21 recombinante humana está comercialmente disponível a partir de múltiplos fornecedores, incluindo ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-408-b) e ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (proteína recombinante de IL-21 humana, Cat. No. 14-8219-80). A sequência de aminoácido de IL-21 recombinante humana adequada para o uso na invenção é dada na Tabela 2 (SEQ ID NO: 8).

[00243] Quando “uma quantidade antitumor eficaz”, “uma quantidade inibidora de tumor eficaz” ou “quantidade terapêutica” é indicada, a quantidade exata das composições da presente invenção a ser administrada pode ser determinada por um médico com consideração das diferenças individuais na idade, peso, tamanho do tumor, grau de infecção ou metástase e condição do paciente (indivíduo). Pode ser geralmente estabelecido que uma composição farmacêutica compreendendo os linfócitos infiltrantes de tumor (por exemplo TILs secundários ou linfócitos citotóxicos geneticamente modificados) aqui descrita pode ser administrada em uma dosagem de 10^4 a 10^{11} células/kg de peso corporal (por exemplo, 10^5 a 10^6 , 10^5 a 10^{10} , 10^5 a 10^{11} , 10^6 a 10^{10} , 10^6 a 10^{11} , 10^7 a 10^{11} , 10^7 a 10^{10} , 10^8 a 10^{11} , 10^8 a 10^{10} , 10^9 a 10^{11} ou 10^9 a 10^{10} células/kg de peso corporal), incluindo todos os valores inteiros dentro destas faixas. As composições dos linfócitos infiltrantes de tumor (incluindo em alguns casos, linfócitos citotóxicos geneticamente modificados) também podem ser administrados múltiplas vezes nestas dosagens. Os linfócitos infiltrantes de tumor (incluindo em alguns casos, geneticamente) podem ser administrados usando-se técnicas de infusão que são habitualmente conhecidas na imunoterapia (ver, por exemplo, Rosenberg *et al.*, *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). A dosagem e regime de tratamento ideais para um paciente particular podem ser facilmente determinados por uma pessoa versada na técnica da medicina pelo

monitoramento do paciente quanto aos sinais de doença e ajustando o tratamento consequentemente.

[00244] O termo “malignidade hematológica” se refere a cânceres e tumores de mamífero dos tecidos hematopoiéticos e linfóides, incluindo, mas não limitados a tecidos do sangue, medula óssea, linfonodos e sistema linfático. Malignidades hematológicas também são aludidas como “tumores líquidos.” As malignidades hematológicas incluem, mas não são limitadas a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma linfocítico crônico (SLL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crônica (CML), leucemia monocítica aguda (AMoL), linfoma de Hodgkin e linfoma de não Hodgkin. O termo “malignidade hematológica de célula B” se refere às malignidades hematológicas que afetam as células B.

[00245] O termo “tumor sólido” se refere a uma massa anormal teciduais que usualmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo “câncer de tumor sólido” se refere a tumores sólidos malignos, neoplásticos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, mas não são limitados a sarcomas, carcinomas e linfomas, tais como cânceres do pulmão, mama, próstata, cólon, reto e bexiga. A estrutura tecidual de tumores sólidos inclui compartimentos teciduais interdependentes incluindo a parênquima (células cancerosas) e as células estrômicas de sustentação nas quais as células cancerosas são dispersas e que podem prover um microambiente de sustentação.

[00246] O termo “tumor líquido” se refere a uma massa anormal de células que é fluida por natureza. Os cânceres de tumor líquido incluem, mas não são limitados a leucemias, mielomas e linfomas, assim como outras malignidades hematológicas. TILs obtida a partir de tumores líquidos também podem ser aqui aludidos como linfócitos infiltrantes da medula (MILs).

[00247] O termo “microambiente,” como aqui usada, pode se referir ao

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

[00248] Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratar um câncer com uma população de TILs, em que um paciente é pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa antes de uma infusão de TILs de acordo com a invenção. Em algumas modalidades, a população de TILs pode ser provida em que um paciente é pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa antes de uma infusão de TILs de acordo com a presente invenção. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d por 2 dias (dias 27 e 26 antes da infusão de TIL) e fludarabina 25 mg/m²/d por 5 dias (dias 27 a 23 antes da infusão de TIL). Em uma modalidade, depois da quimioterapia não mieloablativa e infusão de TIL (no dia 0) de acordo com a invenção, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 intravenosamente a 720.000 IU/kg a cada 8 horas para tolerância fisiológica.

[00249] Os achados experimentais indicam que a linfodepleção antes da transferência adotiva de linfócitos T específicos de tumor desempenha um papel chave no realce da eficácia de tratamento pela eliminação das células T reguladoras e elementos competidores do sistema imune (“coletores de citocina”). Consequentemente, algumas modalidades da invenção utilizam

uma etapa de linfodepleção (algumas vezes também aludida como “condicionamento imunossupressivo”) no paciente antes da introdução dos rTILs da invenção.

[00250] Os termos “coadministração,” “coadministrar,” “administrados em combinação com,” “administrar em combinação com,” “simultâneo,” e “concorrente,” como aqui usadas, abrangem a administração de dois ou mais ingredientes farmacêuticos ativos (em uma modalidade preferida da presente invenção, por exemplo, pelo menos um agonista do canal de potássio em combinação com uma pluralidade de TILs) a um indivíduo de modo que ambos ingredientes farmacêuticos ativos e/ou seus metabólitos estejam presentes no indivíduo ao mesmo tempo. A coadministração inclui a administração simultânea em composições separadas, administração em tempos diferentes em composições separadas ou administração em uma composição na qual dois ou mais ingredientes farmacêuticos ativos estejam presentes. A administração simultânea em composições separadas e a administração em uma composição na qual ambos os agentes estão presentes são preferidas.

[00251] O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere àquela quantidade de um composto ou combinação de compostos como aqui descritos que é suficiente para efetuar a aplicação pretendida incluindo, mas não limitada ao tratamento da doença. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo da aplicação pretendida (*in vitro* ou *in vivo*) ou do indivíduo e condição de doença sendo tratada (por exemplo, o peso, idade e gênero do indivíduo), a severidade da condição de doença ou a maneira de administração. O termo também se aplica a uma dose que induzirá uma resposta particular nas células alvo (por exemplo, a redução da adesão de plaquetas e/ou migração de célula). A dose específica variará dependendo dos compostos particulares escolhidos, do regime de dosagem a ser seguido, se o composto é administrado em

combinação com outros compostos, cronometragem de administração, o tecido ao qual o mesmo é administrado e o sistema de fornecimento físico no qual o composto é carregado.

[00252] Os termos “tratamento”, “tratando”, “tratar” e os semelhantes, se referem a obter um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completa ou parcialmente uma doença ou sintoma da mesma e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. “Tratamento”, como aqui usada, abrange qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, particularmente em um ser humano e inclui: (a) prevenir a doença de ocorrer em um indivíduo que pode estar predisposto à doença mas ainda não foi diagnosticado como tendo a mesma; (b) inibir a doença, isto é, deter o seu desenvolvimento ou progressão; e (c) aliviar a doença, isto é, causar a regressão da doença e/ou aliviar um ou mais sintomas da doença. “Tratamento” também é intencionado a abranger o fornecimento de um agente de modo a prover um efeito farmacológico, mesmo na ausência de uma doença ou condição. Por exemplo, “tratamento” abrange o fornecimento de uma composição que possa evocar uma resposta imune ou conferir imunidade na ausência de uma condição de doença, por exemplo, no caso de uma vacina.

[00253] O termo “heterólogo” quando usada com referência às porções de um ácido nucléico ou proteína indica que o ácido nucléico ou proteína compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação uma com a outra na natureza. Por exemplo, o ácido nucléico é tipicamente recombinantemente produzido, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionados arranjados para compor um novo ácido nucléico funcional, por exemplo, um promotor de uma fonte e uma região codificadora de uma outra fonte ou regiões codificadoras de fontes diferentes. Similarmente, uma proteína heteróloga indica que a proteína compreende

duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação uma com a outra na natureza (por exemplo, uma proteína de fusão).

[00254] Os termos “identidade de sequência,” “identidade percentual,” e “identidade percentual de sequência” (ou sinônimos dos mesmos, por exemplo, “99% idêntica”) no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou polipeptídeos, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas ou têm uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácido que é a mesma, quando comparadas e alinhadas (introduzindo interstícios, se necessário) para correspondência máxima, não considerando nenhuma das substituições conservativas de aminoácido como parte da identidade de sequência. A identidade percentual pode ser medida usando software ou algoritmos de comparação de sequência ou pela inspeção visual. Vários algoritmos e software são conhecidos na técnica que podem ser usados para se obter alinhamentos de sequências de aminoácidos ou nucleotídeos. Os programas adequados para determinar a identidade de sequência percentual incluem por exemplo o conjunto BLAST de programas disponíveis no endereço da web U.S. Government’s National Center for Biotechnology Information BLAST. As comparações entre duas sequências podem ser realizadas usando o algoritmo BLASTN ou BLASTP. BLASTN é usada para comparar sequências de ácido nucleico, enquanto BLASTP é usada para comparar sequências de aminoácido. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Califórnia) ou MegAlign, disponível da DNASTAR, são programas de software publicamente disponíveis adicionais que podem ser usadas para alinhar sequências. Uma pessoa versada na técnica pode determinar parâmetros apropriados para alinhamento máximo pelo software de alinhamento particular. Em certas modalidades, os parâmetros de default do software de alinhamento são usados.

[00255] Como aqui usada, o termo “variante” abrange mas não é limitado a anticorpos ou proteínas de fusão que compreendem uma sequência

de aminoácido que difere da sequência de aminoácido de um anticorpo de referência por via de uma ou mais substituições, deleções e/ou adições em certas posições dentro ou adjacente à sequência de aminoácido do anticorpo de referência. A variante pode compreender uma ou mais substituições conservativas na sua sequência de aminoácido quando comparada com a sequência de aminoácido de um anticorpo de referência. As substituições conservativas podem envolver, por exemplo, a substituição de aminoácidos similarmente carregados ou descarregados. A variante retém a capacidade para especificamente ligar ao antígeno do anticorpo de referência. O termo variante também inclui anticorpos ou proteínas peguilados.

[00256] Por “linfócitos infiltrantes de tumor” ou “TILs” aqui é intencionada uma população de células originalmente obtida como células sanguíneas brancas que deixaram a corrente sanguínea de um indivíduo e migraram para dentro de um tumor. TILs incluem, mas não são limitados a células T CD8⁺ citotóxicas (linfócitos), células T CD4⁺ Th1 e Th17, células matadoras naturais, células dendríticas e macrófagos M1. TILs incluem tanto TILs primários quanto secundários. “TILs primários” são aqueles que são obtida a partir de amostras de tecido de paciente como aqui resumido (algumas vezes aludido como “recém colhidos”) e “TILs secundários” são quaisquer populações de célula de TIL que foram expandidas ou proliferadas como aqui debatido, incluindo, mas não limitado a TILs volumoso, TILs expandidos (“TILs REP”) assim como “TILs reREP” como aqui debatidos. TILs reREP podem incluir por exemplo TILs de expansão secundária ou TILs de expansão adicional secundária (tais como, por exemplo, aqueles descritos na etapa D da Figura 9, incluindo TILs aludidos como TILs reREP).

[00257] Os TILs podem geralmente ser definidos bioquimicamente, usando marcadores de superfície de célula ou funcionalmente, pela sua capacidade para infiltrar tumores e efetuar tratamento. TILs podem ser geralmente categorizados pela expressão de um ou mais dos seguintes

biomarcadores: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 e CD25. Adicional ou alternativamente, TILs podem ser funcionalmente definidos pela sua capacidade para infiltrar tumores sólidos na reintrodução dentro de um paciente. TILs podem ser adicionalmente distinguidos pela potência – por exemplo, TILs podem ser considerados potentes se, por exemplo, a liberação de interferon (IFN) for maior do que cerca de 50 pg/mL, maior do que cerca de 100 pg/mL, maior do que cerca de 150 pg/mL ou maior do que cerca de 200 pg/mL.

[00258] Os termos “carreador farmacêuticamente aceitável” ou “excipiente farmacêuticamente aceitável” são intencionados a incluir qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção e ingredientes inertes. O uso de tais carreadores farmacêuticamente aceitáveis ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis para ingredientes farmacêuticamente ativos é bem conhecido na técnica. Exceto quando qualquer carreador farmacêuticamente aceitável ou excipiente farmacêuticamente aceitável convencionais sejam incompatíveis com o ingrediente farmacêutico ativo, o seu uso nas composições terapêuticas da invenção é considerado. Os ingredientes farmacêuticos ativos adicionais, tais como outros fármacos, também podem ser incorporados nas composições e métodos descritos.

[00259] Os termos “cerca de” e “aproximadamente” significam dentro de uma faixa estatisticamente significativa de um valor. Uma tal faixa pode estar dentro de uma ordem de magnitude, preferivelmente dentro de 50%, mais preferivelmente dentro de 20%, mais preferivelmente ainda dentro de 10% e ainda mais preferivelmente dentro de 5% de um dado valor ou faixa. A variação permissível abrangida pelos termos “cerca de” ou “aproximadamente” depende do sistema particular sob estudo e pode ser facilmente avaliada por uma pessoa comumente versada na técnica. Além

disso, como aqui usada, os termos “cerca de” e “aproximadamente” significa que as dimensões, tamanhos, formulações, parâmetros, formatos e outras quantidades e características não são e não precisam ser exatas, mas podem ser aproximadas e/ou maior ou menor, como desejado, refletindo tolerâncias, fatores de conversão, arredondamento, erro de medição e os semelhantes e outros fatores conhecidos por aqueles versados na técnica. No geral, uma dimensão, tamanho, formulação, parâmetro, formato ou outra quantidade ou característica é “de cerca de” ou “aproximada” se expressamente estabelecida ou não ser de tal maneira. Note-se que as modalidades de tamanhos, formatos e dimensões muito diferentes podem utilizar os arranjos.

[00260] Os termos transicionais “compreendendo,” “consistindo essencialmente de,” e “consistindo em,” quando usada nas reivindicações anexas, nas formas original e emendada, definem o escopo da reivindicação com respeito a quais elementos ou etapas de reivindicação adicional não citados, se algum, são excluídos do escopo da(s) reivindicação(ões). O termo “compreendendo” é intencionado ser inclusivo ou de extremidade aberta e não exclui nenhum elemento, método, etapa ou material adicional, não citado. O termo “consistindo em” exclui qualquer elemento, etapa ou material outro que não aqueles especificados na reivindicação e, no último caso, impurezas ordinariamente associadas com o(s) material(is) especificado(s). O termo “consistindo essencialmente de” limita o escopo de uma reivindicação aos elementos, etapas ou material(is) especificados e aqueles que não afetam materialmente a(s) característica(s) básica(s) e nova(s) da invenção reivindicada. Todas as composições, métodos e kits aqui descritos que incorporam a presente invenção podem, em modalidades alternativas, ser mais especificamente definidos por qualquer um dos termos transicionais “compreendendo,” “consistindo essencialmente de,” e “consistindo em.”

III. Processos de Edição de Gene

A. Vista Geral: Expansão de TIL + Edição de Gene

[00261] As modalidades da presente invenção são direcionadas aos métodos para expandir populações de TIL, os métodos compreendendo uma ou mais etapas de edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs de modo a realçar o seu efeito terapêutico. Como aqui usada, “editar gene,” “edição de gene,” e “edição de genoma” se referem a um tipo de modificação genética na qual o DNA é permanentemente modificado no genoma de uma célula, por exemplo, o DNA é inserido, deletado, modificado ou recolocado dentro do genoma da célula. Em algumas modalidades, a edição de gene causa a expressão de uma sequência de DNA a ser silenciada (algumas vezes aludida como um nocaute do gene) ou inibida/reduzida (algumas vezes aludida como um *knockdown* de gene). Em outras modalidades, a edição de gene causa a expressão de uma sequência de DNA a ser realçada (por exemplo, causando-se a expressão excessiva). De acordo com modalidades da presente invenção, a tecnologia de edição de gene é usada para realçar a eficácia de uma população terapêutica de TILs.

[00262] Um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, um método de expansão de TIL exemplar conhecido como Processo 2A está descrito abaixo), em que o método compreende adicionalmente a edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs. De acordo com modalidades adicionais, um método para expandir TILs dentro de uma população terapêutica de TILs é realizada de acordo com qualquer modalidade dos métodos descritos na PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, que são aqui incorporadas por referência em suas totalidades, em que o método compreende adicionalmente a edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs. Assim, uma modalidade da presente invenção provê uma população terapêutica de TILs que foi expandida de acordo com qualquer modalidade aqui descrita, em que pelo menos uma

porção da população terapêutica foi editada no gene, por exemplo, pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs que é transferida para a bolsa de infusão é permanentemente editada no gene.

B. Cronometragem da Edição de Gene Durante a Expansão de TIL

[00263] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3 (por exemplo, OKT-3 pode estar presente no meio de cultura começando na data de início do processo de expansão), para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma

segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem abrir o sistema;

(f) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(g) em qualquer tempo durante o método, edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs.

[00264] Como estabelecido na etapa (g) da modalidade descrita acima, o processo de edição de gene pode ser realizado em qualquer tempo durante o método da expansão de TIL, que significa que a edição de gene pode ser realizado nos TILs antes, durante ou depois de qualquer uma das etapas no método de expansão; por exemplo, durante qualquer uma das etapas (a) a (f) resumidas no método acima ou antes ou depois de qualquer uma das etapas (a) a (f) resumidas no método acima. De acordo com certas modalidades, TILs são colhidos durante o método de expansão (por exemplo, o método de expansão é “pausada” para pelo menos uma porção dos TILs) e os TILs colhidos são submetidos a um processo de edição de gene, e, em alguns casos, subsequentemente reinserido de volta dentro do método de expansão (por exemplo, de volta dentro do meio de cultura) para continuar o processo de expansão, de modo que pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs que é eventualmente transferida para a bolsa de infusão seja permanentemente editada no gene. Em uma modalidade, o processo de edição de gene pode ser realizado antes da expansão pela ativação dos TILs, realizando uma etapa de edição de gene nos TILs ativados e expandindo os TILs editados no gene de acordo com os processos aqui descritos.

[00265] Deve ser mencionado que modalidades alternativas do

processo de expansão podem diferir do método mostrado acima; por exemplo, modalidades alternativas podem não ter as mesmas etapas (a) a (g) ou podem ter um número diferente de etapas. Independente da modalidade específica, o processo de edição de gene pode ser realizado em qualquer tempo durante o método da expansão de TIL. Por exemplo, modalidades alternativas podem incluir mais do que duas expansões e é possível que a edição de gene possa ser conduzida nos TILs durante uma terceira ou quarta expansão, etc.

[00266] De acordo com uma modalidade, o processo de edição de gene é realizado nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população. Por exemplo, a edição de gene pode ser realizado na primeira população de TILs ou em uma porção de TILs colhida da primeira população e seguindo o processo de edição de gene estes TILs podem ser subsequentemente colocados de volta dentro do processo de expansão (por exemplo, de volta dentro do meio de cultura). Alternativamente, a edição de gene pode ser realizado nos TILs da segunda ou terceira populações ou em uma porção de TILs colhida da segunda ou terceira populações, respectivamente e seguindo o processo de edição de gene estes TILs podem ser subsequentemente colocados de volta dentro do processo de expansão (por exemplo, de volta dentro do meio de cultura). De acordo com uma outra modalidade, a edição de gene é realizada enquanto os TILs ainda estão no meio de cultura e enquanto a expansão está sendo realizada, isto é, eles não são necessariamente “removidos” da expansão de modo a conduzir a edição de gene.

[00267] De acordo com uma outra modalidade, o processo de edição de gene é realizado nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos. Por exemplo, durante a primeira expansão ou segunda expansão, a edição de gene pode ser realizado nos TILs que são colhidos do meio de cultura e seguindo o processo de edição de gene estes TILs podem subsequentemente ser colocados de volta dentro do método de expansão, por

exemplo, reintroduzindo-os de volta dentro do meio de cultura.

[00268] De acordo com uma outra modalidade, o processo de edição de gene é realizado em pelo menos uma porção dos TILs depois da primeira expansão e antes da segunda expansão. Por exemplo, depois da primeira expansão, a edição de gene pode ser realizado nos TILs que são colhidos do meio de cultura e seguindo o processo de edição de gene estes TILs podem subsequentemente ser colocados de volta dentro do método de expansão, por exemplo, reintroduzindo-os de volta dentro do meio de cultura para a segunda expansão.

[00269] De acordo com as modalidades alternativas, o processo de edição de gene é realizada antes da etapa (c) (por exemplo, antes, durante ou depois de qualquer uma das etapas (a) a (b)), antes da etapa (d) (por exemplo, antes, durante ou depois de qualquer uma das etapas (a) a (c)), antes da etapa (e) (por exemplo, antes, durante ou depois de qualquer uma das etapas (a) a (d)) ou antes da etapa (f) (por exemplo, antes, durante ou depois de qualquer uma das etapas (a) a (e)).

[00270] Deve ser mencionado com respeito ao OKT-3, de acordo com certas modalidades, que o meio de cultura de célula pode compreender OKT-3 começando no dia de partida (Dia 0) ou no Dia 1 da primeira expansão, tal que a edição de gene seja realizada nos TILs depois que eles tenha sido expostos ao OKT-3 no meio de cultura de célula no Dia 0 e/ou Dia 1. De acordo com uma outra modalidade, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o OKT-3 fosse inserido dentro do meio de cultura de célula. Alternativamente, o meio de cultura de célula pode compreender OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

[00271] Também deve ser mencionado com respeito a um agonista de

4-1BB, de acordo com certas modalidades, que o meio de cultura de célula pode compreender um agonista de 4-1BB começando no dia de início (Dia 0) ou no Dia 1 da primeira expansão, tal que a edição de gene fosse realizada nos TILs depois que eles foram expostos a um agonista de 4-1BB no meio de cultura de célula no Dia 0 e/ou Dia 1. De acordo com uma outra modalidade, o meio de cultura de célula compreende um agonista de 4-1BB durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB fosse inserido dentro do meio de cultura de célula. Alternativamente, o meio de cultura de célula pode compreender um agonista de 4-1BB durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

[00272] Também deve ser mencionado com respeito a IL-2, de acordo com certas modalidades, que o meio de cultura de célula pode compreender IL-2 começando no dia de início (Dia 0) ou no Dia 1 da primeira expansão, tal que a edição de gene fosse realizada nos TILs depois que eles foram expostos à IL-2 no meio de cultura de célula no Dia 0 e/ou Dia 1. De acordo com uma outra modalidade, o meio de cultura de célula compreende IL-2 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que a IL-2 seja inserida dentro do meio de cultura de célula. Alternativamente, o meio de cultura de célula pode compreender IL-2 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que a IL-2 é inserida dentro do meio de cultura de célula.

[00273] Como debatido acima, um ou mais de OKT-3, agonista de 4-1BB e IL-2 podem ser incluídos no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1 da primeira expansão. De acordo com uma modalidade, OKT-3 é incluído no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1 da primeira expansão e/ou um agonista de 4-1BB é incluído no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1 da primeira expansão e/ou IL-2 é

incluído no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1 da primeira expansão. De acordo com um exemplo, o meio de cultura de célula compreende OKT-3 e um agonista de 4-1BB começando no Dia 0 ou Dia 1 da primeira expansão. De acordo com um outro exemplo, o meio de cultura de célula compreende OKT-3, um agonista de 4-1BB e IL-2 começando no Dia 0 ou Dia 1 da primeira expansão. Naturalmente, um ou mais de OKT-3, agonista de 4-1BB e IL-2 podem ser adicionados ao meio de cultura de célula em um ou mais pontos de tempo adicionais durante o processo de expansão, como apresentado em várias modalidades aqui descritas.

[00274] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda

população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila.

[00275] De acordo com uma modalidade, o método anterior pode ser usado para prover uma população de TIL autóloga colhida para o tratamento de um indivíduo humano com câncer.

C. Pontos de Checagem Imune

[00276] De acordo com modalidades particulares da presente invenção, uma população de TIL é editada no gene modificando-se geneticamente um ou mais genes do ponto de checagem imune na população TIL. Estabelecido de um outro modo, uma sequência de DNA dentro do TIL que codifica um ou

mais dos pontos de checagem imune de TIL é permanentemente modificado, por exemplo, inserido, deletado ou recolocado, no genoma de TIL. Os pontos de checagem imunes são moléculas expressas pelos linfócitos que regulam uma resposta imune por intermédio dos caminhos inibitórios ou estimulatórios. No caso de câncer, os caminhos do ponto de checagem imune são frequentemente ativados para inibir a resposta antitumor, isto é, a expressão de certos pontos de checagem imunes pelas células malignas inibe a imunidade antitumor e favorece o crescimento de células cancerosas. Ver, por exemplo, Marin-Acevedo *et al.*, *Journal of Hematology & Oncology* (2018) 11: 39. Assim, certas moléculas do ponto de checagem inibitório servem como alvos para as imunoterapias da presente invenção. De acordo com modalidades particulares, TILs são editados no gene para bloquear ou estimular certos caminhos de ponto de checagem imune e deste modo realçar a atividade imunológica do corpo contra tumores.

[00277] Como aqui usada, um gene do ponto de checagem imune compreende uma sequência de DNA codificando uma molécula de ponto de checagem imune. De acordo com modalidades particulares da presente invenção, a edição de genes de TIL durante o método da expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Por exemplo, a edição de gene pode fazer com que a expressão de um receptor inibidor, tal como PD-1 ou CTLA-4, seja silenciada ou reduzida de modo a realçar uma reação imune.

[00278] Os pontos de checagem mais amplamente estudados incluem o receptor 1 da morte de célula programada (PD-1) e a molécula 4 associada com linfócito T citotóxico (CTLA-4), que são receptores inibidores nas células imunes que inibem funções efetoras chave (por exemplo, ativação, proliferação, liberação de citocina, citotoxicidade, etc.) quando eles interagem com um ligante inibitório. Numerosas moléculas de ponto de checagem, além

de PD-1 e CTLA-4, têm emergido como alvos potenciais para a imunoterapia, como debatido em mais detalhes abaixo.

[00279] Os exemplos não limitantes de genes imunes do ponto de checagem que podem ser silenciados ou inibidos pela edição de gene de TILs permanentemente da presente invenção incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, BAFF (BR3), CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3. Por exemplo, os genes imunes do ponto de checagem que podem ser silenciados ou inibidos nos TILs da presente invenção podem ser selecionados do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, Cish, TGF β e PKA. BAFF (BR3) está descrita em Bloom, *et al.*, *J. Immunother.*, 2018, no prelo. De acordo com um outro exemplo, os genes do ponto de checagem imune que podem ser silenciados ou inibidos em TILs da presente invenção podem ser selecionados do grupo compreendendo PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações dos mesmos.

[00280] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira

população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o

sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas.

1. PD-1

[00281] Um dos alvos mais estudados para a indução de bloqueio do ponto de checagem é o receptor de morte programada (PD1 ou PD-1, também conhecido como PDCD1), um membro da super família CD28 de reguladores de célula T. Seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, são expressos em uma variedade de células de tumor, incluindo melanoma. A interação de PD-1 com PD-L1 inibe a função efetora de célula T, resulta na exaustão de célula T no cenário da estimulação crônica e induz a apoptose da célula T no microambiente tumoral. PD1 também pode desempenhar um papel no escape específico de tumor da vigilância imune.

[00282] De acordo com modalidades particulares, a expressão de PD1 em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende a edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de PD1. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode envolver

o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de checagem imune, tal como PD1. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reduzir a expressão de PD1 nos TILs.

2. CTLA-4

[00283] A expressão de CTLA-4 é induzida na ativação de célula T nas células T ativadas e compete quanto à ligação com os antígenos de ativação da célula apresentando antígeno CD80 e CD86. A interação de CTLA-4 com CD80 ou CD86 causa a inibição de célula T e serve para manter o equilíbrio da resposta imune. Entretanto, a inibição da interação de CTLA-4 com CD80 ou CD86 pode prolongar a ativação de célula T e assim aumentar o nível de resposta imune para um antígeno canceroso.

[00284] De acordo com modalidades particulares, a expressão de CTLA-4 em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de CTLA-4. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de checagem imune, tal como CTLA-4. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de CTLA-4 nos TILs.

3. LAG-3

[00285] O gene 3 de ativação de linfócito (LAG-3, CD223) é expresso

pelas células T e células exterminadoras naturais (NK) depois da ligação do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe II. Embora o seu mecanismo permaneça incerto, a sua modulação causa um efeito regulador negativo sobre a função da célula T, prevenindo o dano ao tecido e autoimunidade. LAG-3 e PD-1 são frequentemente coexpressos e suprarregulados nos TILs, levando à exaustão imune e crescimento de tumor. Assim, o bloqueio de LAG-3 melhora as respostas antitumor. *Ver, por exemplo, Marin-Acevedo et al., Journal of Hematology & Oncology (2018) 11: 39.*

[00286] De acordo com modalidades particulares, a expressão de LAG-3 em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de LAG-3. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de checagem imune, tal como LAG-3. De acordo com modalidades particulares, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de LAG-3 nos TILs.

4. TIM-3

[00287] A imunoglobulina-3 de célula T (TIM-3) é um regulador negativo direto de células T e é expresso nas células NK e macrófagos. TIM-3 indiretamente promove a imunossupressão pela indução da expansão de células supressoras derivadas de mieloide (MDSCs). O seu nível foi verificado ser particularmente elevado nas células T disfuncionais e

exauridas, sugerindo um papel importante na malignidade.

[00288] De acordo com modalidades particulares, a expressão de TIM-3 nos TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de TIM-3. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de checagem imune, tal como TIM-3. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de TIM-3 nos TILs.

5. Cish

[00289] Cish, um membro do supressor da família de sinalização da citocina (SOCS), é induzido pela estimulação de TCR em células T CD8+ e inibe a sua avidéz funcional contra tumores. A deleção genética de Cish nas células T CD8+ pode realçar a sua expansão, avidéz funcional e polifuncionalidade de citocina, resultando em regressão pronunciada e durável de tumores estabelecidos. Ver, por exemplo, Palmer *et al.*, *Journal of Experimental Medicine*, 212 (12): 2095 (2015).

[00290] De acordo com modalidades particulares, a expressão de Cish em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20

e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de Cish. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de checagem imune, tal como Cish. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de Cish nos TILs.

6. TGF β

[00291] O caminho da sinalização de TGF β tem múltiplas funções na regulação do crescimento, diferenciação, apoptose, motilidade e invasão celulares, produção de matriz extracelular, angiogênese e resposta imune. A desregulação da sinalização de TGF β é frequente em tumores e tem papéis cruciais na iniciação, desenvolvimento e metástase de tumor. Ao nível do microambiente, o caminho de TGF β contribui para gerar um microambiente favorável para o crescimento de tumor e metástase por toda a carcinogênese. Ver, por exemplo, Neuzillet *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 147, pp. 22-31 (2015).

[00292] De acordo com modalidades particulares, a expressão de TGF β em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou redução da expressão de TGF β . Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de

checagem imune, tal como TGF β . Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de TGF β nos TILs.

[00293] Em algumas modalidades, TGF β R2 (receptor 2 de TGF beta) pode ser suprimido pelo silenciamento de TGF β R2 usando um sistema CRISPR/Cas9 ou usando-se uma armadilha extracelular negativa dominante de TGF β R2, usando métodos conhecidos na técnica.

7. PKA

[00294] A Proteína Cinase A (PKA) é um membro bem conhecido da superfamília da serina-treonina proteína cinase. PKA, também conhecido como cinase de proteína dependente de cAMP, é uma cinase de proteína de unidade múltipla que medeia a transdução de sinal dos receptores ligados à proteína G através da sua ativação na ligação de cAMP. A mesma está envolvida no controle de uma ampla variedade de processos celulares a partir do metabolismo para a ativação do canal iônico, crescimento e diferenciação de célula, expressão de gene e apoptose. Importaneamente, a PKA foi implicada no início e progressão de muitos tumores. Ver, por exemplo, Sapio *et al.*, *EXCLI Journal*; 2014; 13: 843–855.

[00295] De acordo com modalidades particulares, a expressão de PKA em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de PKA. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de

checagem imune, tal como PKA. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de PKA nos TILs.

8. CBLB

[00296] CBLB (ou CBL-B) é uma E3 ubiquitina-proteína ligase e é um regulador negativo da ativação de célula T. Bachmaier, *et al.*, *Nature*, 2000, 403, 211–216; Wallner, *et al.*, *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 692639.

[00297] De acordo com modalidades particulares, a expressão de CBLB em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de CBLB. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de checagem imune, tal como CBLB. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de PKA nos TILs. Em algumas modalidades, CBLB é silenciada usando um TALEN knockout. Em algumas modalidades, CBLB é silenciada usando um inibidor transcricional TALE-KRAB *knock in*. Mais detalhes sobre estes métodos podem ser encontrados em Boettcher e McManus, *Mol. Cell Review*, 2015, 58, 575-585.

9. TIGIT

[00298] O domínio de imunorreceptor de célula T com Ig e ITIM (motivo inibidor com base na tirosina imunorreceptora) ou TIGIT é um receptor de glicoproteína de transmembrana com um domínio tipo V

semelhante à Ig e um ITIM no seu domínio citoplasmático. Khalil, *et al.*, *Advances in Cancer Research*, 2015, 128, 1-68; Yu, *et al.*, *Nature Immunology*, 2009, Vol. 10, No. 1, 48-57. TIGIT é expresso por algumas células T e Células matadoras naturais. Adicionalmente, TIGIT foi mostrado ser superexpresso nas células T CD8+ específicas de antígeno e TILs CD8+, particularmente de indivíduos com melanoma. Estudos têm mostrado que o caminho de TIGIT contribui para a evasão imune do tumor e a inibição de TIGIT foi mostrada aumentar a ativação e proliferação de célula T em resposta ao estímulo policlonal e específico de antígeno. Khalil, *et al.*, *Advances in Cancer Research*, 2015, 128, 1-68. Adicionalmente, o bloqueio de TIGIT com PD-1 ou TIM3 tem mostrado efeitos sinérgicos contra tumores sólidos em modelos de camundongo. *Id.*; ver também Kurtulus, *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation*, 2015, Vol. 125, No. 11, 4053-4062.

[00299] De acordo com modalidades particulares, a expressão de TIGIT em TILs é silenciada ou reduzida de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs pelo silenciamento ou repressão da expressão de TIGIT. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene de ponto de checagem imune, tal como TIGIT. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para silenciar ou reprimir a expressão de TIGIT nos TILs.

D. Superexpressão de Receptores Coestimulatórios ou Moléculas de Adesão

[00300] De acordo com modalidades adicionais, a edição de gene de TILs durante o método da expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Por exemplo, a edição de gene pode fazer com que a expressão de um receptor estimulatório seja realçada, que significa que o mesmo é superexpresso quando comparado com a expressão de um receptor estimulatório que não foi geneticamente modificado. Os exemplos não limitantes de genes do ponto de checagem imune que podem exibir expressão realçada pela edição permanente de gene de TILs da presente invenção incluem certos receptores de quimiocina e interleucinas, tais como CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

1. CCRs

[00301] Para que a imunoterapia de célula T adotiva seja eficaz, as células T precisam ser traficadas apropriadamente dentro de tumores pelas quimiocinas. Uma combinação entre as quimiocinas secretadas pelas células de tumor, as quimiocinas presentes na periferia e os receptores de quimiocina expressos pelas células T é importante para o tráfico bem sucedido de células T dentro de um leito tumoral.

[00302] De acordo com modalidades particulares, os métodos de edição de gene da presente invenção podem ser usadas para aumentar a expressão de certos receptores de quimiocina nos TILs, tais como um ou mais de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CX3CR1. A superexpressão de CCRs pode ajudar a promover função efetora e proliferação de TILs a seguir da transferência adotiva.

[00303] De acordo com modalidades particulares, a expressão de um ou mais de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CX3CR1 em TILs é realçada de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por

exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs realçando-se a expressão de um ou mais de CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CX3CR1. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene receptor de quimiocina. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para realçar a expressão de certos receptores de quimiocina nos TILs.

[00304] Em uma modalidade, as moléculas de adesão CCR4 e/ou CCR5 são inseridas dentro de uma população de TIL usando um método gama-retroviral ou lentiviral como aqui descrito. Em uma modalidade, a molécula de adesão CXCR2 é inserida dentro de uma população de TIL usando um método gama-retroviral ou lentiviral como descrito em Forget, *et al.*, *Frontiers Immunology* 2017, 8, 908 ou Peng, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 5458, as divulgações dos quais são aqui incorporadas por referência.

[00305] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira

população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o

sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de PD-1 e, opcionalmente, LAG-3 e adicionalmente em que uma molécula de adesão CXCR2 é inserida por um método gama-retroviral ou lentiviral dentro da primeira população de TILs, segunda população de TILs ou população de TILs colhida.

[00306] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a

transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de PD-1 e, opcionalmente, LAG-3 e adicionalmente em que uma molécula de adesão CCR4 e/ou CCR5 é inserida por um método gama-retroviral ou

lentiviral dentro da primeira população de TILs, segunda população de TILs ou população de TILs colhida.

[00307] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população

de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de PD-1 e, opcionalmente, LAG-3 e adicionalmente em que uma molécula de adesão selecionada do grupo consistindo em CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 e combinações das mesmas é inserida por um método gama-retroviral ou lentiviral dentro da primeira população de TILs, segunda população de TILs ou população de TILs colhida.

2. Interleucinas

[00308] De acordo com modalidades adicionais, os métodos de edição de gene da presente invenção podem ser usados para aumentar a expressão de certas interleucinas, tais como uma ou mais de IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 e IL-21. Certas interleucinas têm sido demonstradas aumentar as funções efetoras das células T e mediar o controle do tumor.

[00309] De acordo com modalidades particulares, a expressão de um ou mais de IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 e IL-21 nos TILs é realçada de acordo com as composições e métodos da presente invenção. Por exemplo, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A ou os métodos mostrados nas Figuras 20 e 21), em que o método compreende edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs realçando-se a expressão de um ou mais de IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 e IL-21. Como descrito em mais detalhes abaixo, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um gene da interleucina. Por exemplo, um método CRISPR, um método TALE ou um método do dedo de zinco pode ser usada para realçar a expressão de certas interleucinas nos TILs.

[00310] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira

expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de

Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de PD-1 e, opcionalmente, LAG-3 e adicionalmente em que uma interleucina selecionada do grupo consistindo em IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21 e combinações das mesmas é inserida por um método gama-retroviral ou lentiviral dentro da primeira população de TILs, segunda população de TILs ou população de TILs colhida.

E. Métodos de edição de gene

[00311] Como debatido acima, as modalidades da presente invenção proveem linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) que foram geneticamente modificados por intermédio da edição de gene para realçar o seu efeito terapêutico. As modalidades da presente invenção abrangem a edição genética através da inserção de nucleotídeo (RNA ou DNA) dentro de uma população de TILs tanto para a promoção da expressão de uma ou mais proteínas quanto para a inibição da expressão de uma ou mais proteínas, assim como combinações das mesmas. As modalidades da presente invenção também proveem métodos para expandir TILs dentro de uma população terapêutica, em que os métodos compreendem a edição de gene dos TILs. Existem diversas tecnologias de edição de gene que podem ser usadas para modificar geneticamente uma população de TILs, que são adequadas para o uso de acordo com a presente invenção.

[00312] Em algumas modalidades, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa da incorporação estável de genes para a produção de uma ou mais proteínas. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução retroviral. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução lentiviral. Os sistemas de transdução lentiviral são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Levine, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 2006, 103, 17372-77; Zufferey, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 1997, 15, 871-75; Dull, *et al.*, *J. Virology*

1998, 72, 8463-71 e Patente U.S. No. 6.627.442, as divulgações de cada uma das qual são aqui incorporadas por referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transdução gama-retroviral. Os sistemas de transdução gama-retroviral são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, Cepko e Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* 1996, 9.9.1-9.9.16, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transferência de gene mediada por transposon. Os sistemas de transferência de gene mediada por transposon são conhecidos na técnica e incluem sistemas em que a transposase é provida como vetor de expressão de DNA ou como um RNA expressável ou uma proteína tal que expressão de longa duração da transposase não ocorra nas células transgênicas, por exemplo, uma transposase provida como um mRNA (por exemplo, um mRNA compreendendo um capuz e cauda poli-A). Os sistemas de transferência de gene mediada por transposon adequados, incluindo a transposase semelhante a Tel tipo salmonídeo (SB ou transposase de *Sleeping Beauty*), tal como SB10, SB11 e SB100x e enzimas engendradas com atividade enzimática aumentada, são descritos, por exemplo, em Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* 2010, 18, 674-83 e Patente U.S. No. 6.489.458, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência.

[00313] Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de incorporação estável de genes para a produção ou inibição (por exemplo, silenciamento) de uma ou mais proteínas. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de eletroporação. Os métodos de eletroporação são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Tsong, *Biophys. J.* 1991, 60, 297-306 e Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2014/0227237 A1, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência. Outros métodos de eletroporação conhecidos na técnica, tais como

aqueles descritos nas Patentes U.S. Nos. 5.019.034, 5.128.257, 5.137.817, 5.173.158, 5.232.856, 5.273.525, 5.304.120, 5.318.514, 6.010.613 e 6.078.490, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência, podem ser usadas. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação estéril. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada compreendendo as etapas de tratar TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, DC, tendo intensidades de campo iguais a ou maiores do que 100 V/cm, aos TILs, em que a sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC tem um, dois ou três das seguintes características: (1) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na amplitude de pulso; (2) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na largura do pulso; e (3) um primeiro intervalo de pulso para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente a partir de um segundo intervalo de pulso para um segundo conjunto de dois dos pelo menos três pulsos. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada compreendendo as etapas de tratar TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, DC, tendo forças de campo iguais a ou maiores do que 100 V/cm, para os TILs, em que pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na amplitude de pulso. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada compreendendo as etapas de tratar

TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, DC, tendo intensidades de campo iguais a ou maiores do que 100 V/cm, aos TILs, em que pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na largura de pulso. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada compreendendo as etapas de tratar TILs com campos elétricos pulsados para alterar, manipular ou causar mudanças definidas e controladas, permanentes ou temporárias nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos únicos, controlados pelo operador, independentemente programados, DC, tendo intensidades de campo iguais a ou maiores do que 100 V/cm, aos TILs, em que um primeiro intervalo de pulso para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente a partir de um segundo intervalo de pulso para um segundo conjunto de dois dos pelo menos três pulsos. Em uma modalidade, o método de eletroporação é um método de eletroporação pulsada compreendendo as etapas de tratar TILs com campos elétricos pulsados para induzir a formação de poros nos TILs, compreendendo a etapa de aplicar uma sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC, tendo intensidades de campo iguais a ou maiores do que 100 V/cm, aos TILs, em que a sequência de pelo menos três pulsos elétricos DC tem uma, duas ou três das seguintes características: (1) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na amplitude de pulso; (2) pelo menos dois dos pelo menos três pulsos diferem um do outro na largura de pulso; e (3) um primeiro intervalo de pulso para um primeiro conjunto de dois dos pelo menos três pulsos é diferente de um segundo intervalo de pulso para um segundo conjunto de dois dos pelo menos três pulsos, tal que os poros induzidos são sustentados por um período relativamente longo de tempo e tal que a

viabilidade dos TILs seja mantida. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção com fosfato de cálcio. Os métodos de transfecção com fosfato de cálcio (precipitação de DNA com fosfato de cálcio, revestimento superficial da célula e endocitose) são conhecidos na técnica e são descritos em Graham e van der Eb, *Virology* 1973, 52, 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 1373-1376; e Chen e Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 2745-2752; e na Patente U.S. No. 5.593.875, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção lipossômica. Os métodos de transfecção lipossômica, tais como métodos que utilizam uma formulação de lipossoma 1:1 (p/p) do lipídeo catiônico cloreto de *N*-[1-(2,3-dioleilóxi)propil]-*n,n,n*-trimetilamônio (DOTMA) e dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) em água filtrada, são conhecidos na técnica e são descritos em Rose, *et al.*, *Biotechniques* 1991, 10, 520-525 e Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7413-7417 e nas Patentes U.S. Nos. 5.279.833, 5.908.635, 6.056.938, 6.110.490, 6.534.484 e 7.687.070, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência. Em uma modalidade, um método de modificar geneticamente uma população de TILs inclui a etapa de transfecção usando os métodos descritos nas Patentes U.S. Nos. 5.766.902, 6.025.337, 6.410.517, 6.475.994, e 7.189.705, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência.

[00314] De acordo com uma modalidade, o processo de edição de gene pode compreender o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único em um ou mais genes do ponto de checagem imune. Tais nucleases programáveis possibilitam a edição de genoma precisa pela introdução de rupturas em locais genômicos específicos, isto é, elas contam com o reconhecimento de uma sequência de DNA específica dentro do genoma para alvejar um domínio de nuclease para

esta localização e mediar a geração da ruptura de um filamento duplo na sequência alvo. Uma ruptura de filamento duplo no DNA subsequentemente recruta o mecanismo de reparo endógeno para o local de ruptura para mediar a edição de genoma pela junção de extremidade não homóloga (NHEJ) ou reparo direcionado pela homologia (HDR). Assim, o reparo da ruptura pode resultar na introdução de mutações de inserção/deleção que rompe (por exemplo, silencia, reprime ou realça) o produto de gene alvo.

[00315] As classes principais de nucleases que foram desenvolvidas para permitir a edição genômica específica de sítio incluem as nucleases dedo de zinco (ZFNs), nucleases semelhantes ao ativador de transcrição (TALENs) e nucleases associadas a CRISPR (por exemplo, CRISPR/Cas9). Estes sistemas de nuclease podem ser amplamente classificados em duas categorias com base no seu modo de reconhecimento de DNA: ZFNs e TALENs alcançam a ligação de DNA específica por intermédio de interações de DNA proteína, ao passo que os sistemas CRISPR, tais como Cas9, são alvejadas para sequências de DNA específicas por uma molécula guia de RNA curto que emparelha base diretamente com o DNA alvo e pelas interações de DNA proteína. Ver, por exemplo, Cox *et al.*, *Nature Medicine*, 2015, Vol. 21, No. 2.

[00316] Os exemplos não limitantes dos métodos de edição de gene que podem ser usadas de acordo com a expansão de métodos TIL da presente invenção incluem métodos CRISPR, métodos TALE e métodos ZFN, modalidades dos quais são descritas em mais detalhes abaixo. De acordo com uma modalidade, um método para expandir TILs dentro de uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A) ou como descrito na PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende adicionalmente a edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs por um ou mais de um método CRISPR, um método

TALE ou um método ZFN, de modo a gerar TILs que possam prover um efeito terapêutico realçado. De acordo com uma modalidade, TILs editados no gene podem ser avaliados quanto a um efeito terapêutico melhorado comparando-os com TILs não modificados *in vitro*, por exemplo, avaliando-se a função efetora *in vitro*, perfis de citocina, etc. comparados com TILs não modificados.

[00317] Em algumas modalidades da presente invenção, a eletroporação é usada para o fornecimento de um sistema de edição de gene, tal como sistemas CRISPR, TALEN e ZFN. Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação é um sistema de eletroporação de fluxo. Um exemplo de um sistema de eletroporação de fluxo adequado para o uso com algumas modalidades da presente invenção é o sistema MaxCyte STX comercialmente disponível. Existem diversos instrumentos de eletroporação comercialmente disponíveis alternativos que podem ser adequados para o uso com a presente invenção, tal como o sistema AgilePulse ou ECM 830 disponíveis da BTX-Harvard Apparatus, Cellaxess Elektra (Celectricon), Nucleofector (Lonza/Amaza), GenePulsor MXcell (BIORAD), iPorator-96 (Primax) ou siPORTer96 (Ambion). Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação forma um sistema fechado, estéril com o restante do método de expansão de TIL. Em algumas modalidades da presente invenção, o sistema de eletroporação é um sistema de eletroporação pulsado como aqui descrito e forma um sistema fechado, estéril com o resto do método da expansão de TIL.

1. Métodos de CRISPR

[00318] Um método para expandir TILs dentro de uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A) ou como descrito na PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende adicionalmente edição de gene de pelo menos uma

porção dos TILs por um método CRISPR (por exemplo, CRISPR/Cas9 ou CRISPR/Cpf1). De acordo com modalidades particulares, o uso de um método CRISPR durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método CRISPR durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[00319] CRISPR significa “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas)”. Um método de usar um sistema CRISPR para edição de gene também é aqui aludido como um método CRISPR. Os sistemas CRISPR pode ser dividido em duas classes principais, Classe 1 e Classe 2, que são adicionalmente classificadas em tipos e subtipos diferentes. A classificação dos sistemas CRISPR está fundamentada nas proteínas Cas efetoras que são capazes de clivar ácidos nucléicos específicos. Nos sistemas CRISPR Classe 1 o módulo efector consiste de um complexo de proteína múltipla, ao passo que os sistemas Classe 2 apenas usam uma proteína efectora. CRISPR Classe 1 inclui os Tipos I, III e IV e CRISPR Classe 2 inclui os Tipos II, V e VI. Embora qualquer um destes tipos de sistemas CRISPR possa ser usada de acordo com a presente invenção, existem três tipos de sistemas CRISPR que incorporam RNAs e proteínas Cas que são preferidos para o uso de acordo com a presente invenção: Tipos I (exemplificados por Cas3), II (exemplificado por Cas9) e III (exemplificado por Cas10). O CRISPR Tipo II é um dos sistemas mais bem distinguidos.

[00320] A tecnologia CRISPR foi adaptada a partir dos mecanismos de defesa naturais de bactérias e arqueias (o domínio de microrganismos de célula única). Estes organismos usam RNA derivado de CRISPR e várias

proteínas Cas, incluindo Cas9, para frustrar os ataques pelos vírus e outros corpos estranhos que cortam e destroem o DNA de um invasor estranho. Um CRISPR é uma região especializada de DNA com duas características distintas: a presença de repetições e espaçadores de nucleotídeo. As sequências repetidas de nucleotídeos são distribuídas por toda uma região de CRISPR com segmentos curtos de DNA estranho (espaçadores) interespaçados entre as sequências repetidas. No sistema CRISPR/Cas tipo II, os espaçadores são integrados dentro dos locais genômicos CRISPR e transcritos e processados em RNA CRISPR curto (crRNA). Estes crRNAs recozem para crRNAs de transativação (tracrRNAs) e clivagem específica de sequência direta e silenciamento de DNA patogênico pelas proteínas Cas. O reconhecimento alvo pela proteína Cas9 requer uma sequência “semente” dentro do crRNA e uma sequência de motivo adjacente protoespaçador (PAM) contendo dinucleotídeo conservado a montante da região de ligação de crRNA. O sistema CRISPR/Cas pode deste modo ser realvejado para clivar virtualmente qualquer sequência de DNA pela reconcepção do crRNA. Assim, de acordo com certas modalidades, Cas9 serve como uma endonuclease de DNA guiada pelo RNA que cliva DNA no reconhecimento crRNA-tracrRNA. O crRNA e tracrRNA no sistema nativo podem ser simplificados dentro de um RNA guia único (sgRNA) de aproximadamente 100 nucleotídeos para o uso no engenhamento genético. O sgRNA é um RNA sintético que inclui uma sequência de armação necessária para a ligação de Cas e um espaçador de engenhamento aproximadamente 17 a 20 nucleotídeos definido pelo usuário que define o alvo genômico a ser modificado. Assim, um usuário pode mudar o alvo genômico da proteína Cas pela mudança da sequência alvo presente no sgRNA. O sistema CRISPR/Cas é diretamente potável para células humanas pelo cofornecimento de plasmídeos expressando a endonuclease Cas9 e os componentes de RNA (por exemplo, sgRNA). Variantes diferentes de proteínas Cas podem ser usadas

para reduzir as limitações de alvejamento (por exemplo, ortólogos de Cas9, tais como Cpf1).

[00321] De acordo com uma modalidade, um sistema CRISPR-Cas Tipo II engenheirado, programável, de ocorrência não natural compreende uma proteína Cas9 e pelo menos um RNA guia que alveja e hibridiza a uma sequência alvo de uma molécula de DNA em um TIL, em que a molécula de DNA codifica e o TIL expressa pelo menos uma molécula de ponto de checagem imune e a proteína Cas9 cliva as moléculas de DNA, deste modo a expressão da pelo menos uma molécula de ponto de checagem imune é alterada; e, em que a proteína Cas9 e o RNA guia naturalmente não ocorrem juntas. De acordo com uma modalidade, a expressão de duas ou mais moléculas de ponto de checagem imune é alterada. De acordo com uma modalidade, o(s) RNA(s) guia(s) compreende(m) uma sequência guia fundida a uma sequência *tracr*. Por exemplo, o RNA guia pode compreender crRNA-tracrRNA ou sgRNA. De acordo com aspectos da presente invenção, os termos “RNA guia”, “RNA guia único” e “RNA guia sintético” podem ser usadas intercambiavelmente e se referem à sequência de polinucleotídeo compreendendo a sequência guia, que é a sequência de aproximadamente 17 a 20 bp dentro do RNA guia que especifica o sítio alvo.

[00322] As variantes de Cas9 tendo especificidade no alvo melhorada comparada com Cas9 também podem ser usadas de acordo com as modalidades da presente invenção. Tais variantes podem ser aludidas como Cas-9s de alta fidelidade. De acordo com uma modalidade, um método de nickase dual pode ser utilizado, em que duas nickases alvejando filamentos de DNA opostos geram uma DSB dentro do DNA alvo (frequentemente aludidas como um sistema de CRISPR de corte duplo ou nickase dual). Por exemplo, este método pode envolver a mutação de um dos dois domínios da Cas9 nuclease, virando Cas9 a partir de uma nuclease dentro de uma nickase. Os exemplos não limitantes de Cas9s de alta fidelidade incluem eSpCas9,

SpCas9-HF1 e HypaCas9. Tais variantes podem reduzir ou eliminar mudanças indesejadas em sítios de DNA não alvo. Ver, por exemplo, Slaymaker IM, *et al. Science*. 1 de dez de 2015, Kleinstiver BP, *et al. Nature*. 6 de jan de 2016 e Ran *et al., Nat Protoc.* nov de 2013; 8(11): 2281-2308, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência.

[00323] Adicionalmente, de acordo com modalidades particulares, armações de Cas9 podem ser usadas que melhoram o fornecimento de gene de Cas9 dentro das células e melhoram a especificidade no alvo, tais como aquelas divulgadas na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2016/0102324, que é aqui incorporada por referência. Por exemplo, armações Cas9 podem incluir um motivo RuvC como definido por (D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A) e/ou um motivo HNH definido por (Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S), onde X representa qualquer um dos 20 aminoácidos de ocorrência natural e [I/L] representa isoleucina ou leucina. O domínio HNH é responsável por cortar um filamento do dsDNA alvo e o domínio RuvC está envolvido na clivagem do outro filamento do dsDNA. Assim, cada um destes domínios cortam um filamento do DNA alvo dentro do protoespaçador na vizinidade imediata de PAM, resultando em clivagem abrupta do DNA. Estes motivos podem ser combinados um com o outro para criar armações Cas9 mais compactas e/ou mais específicas. Adicionalmente, os motivos podem ser usadas para criar uma proteína Cas9 de cisão (isto é, uma forma reduzida ou truncada de uma proteína Cas9 ou variante Cas9 que compreende um domínio RuvC ou um domínio HNH) que é dividido em dois domínios RuvC e HNH separados, que podem processar o DNA alvo junto ou separadamente.

[00324] De acordo com modalidades particulares, um método CRISPR compreende silenciar ou reduzir a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune nos TILs pela introdução de uma Cas9 nuclease e um RNA guia (por exemplo, crRNA-tracrRNA ou sgRNA) contendo uma sequência de aproximadamente 17 a 20 nucleotídeos específicos para uma sequência de

DNA alvo do(s) gene(s) do ponto de checagem imune. O RNA guia pode ser liberado como RNA ou pela transformação de um plasmídeo com a sequência codificadora do RNA guia sob um promotor. As enzimas CRISPR/Cas introduzem uma ruptura de filamento duplo (DSB) em uma localização específica com base em uma sequência alvo definida por sgRNA. DSBs podem ser reparadas nas células pela junção de extremidade não homóloga (NHEJ), um mecanismo que frequentemente causa inserções ou deleções (indels) no DNA. Indels frequentemente levam ao deslocamento do quadro de leitura, criando perda de função dos alelos; por exemplo, por causar códons de parada prematuros dentro do quadro de leitura aberta (ORF) do gene alvejado. De acordo com certas modalidades, o resultado é uma mutação de perda de função dentro do gene de ponto de checagem imune alvejado.

[00325] Alternativamente, as DSBs induzidas pelas enzimas de CRISPR/Cas podem ser reparadas pelo reparo direcionado à homologia (HDR) ao invés de NHEJ. Embora o reparo de DSB mediado por NHEJ frequentemente rompe o quadro de leitura aberta do gene, o reparo direcionado à homologia (HDR) pode ser usada para gerar mudanças de nucleotídeo específicas variando de uma mudança de nucleotídeo único a inserções grandes. De acordo com uma modalidade, HDR é usada para a edição de gene dos genes do ponto de checagem imune pela liberação de um padrão de reparo de DNA contendo a sequência desejada nos TILs com o(s) sgRNA(s) e Cas9 ou Cas9 nickase. O padrão de reparo preferivelmente contém a edição desejada assim como a sequência homóloga adicional imediatamente a montante e a jusante do gene alvo (frequentemente aludida como braços de homologia esquerdo e direito).

[00326] De acordo com modalidades particulares, uma versão enzimaticamente inativa de Cas9 (deadCas9 ou dCas9) pode ser alvejada para os sítios de começo de transcrição de modo a reprimir a transcrição pelo início do bloqueio. Assim, os genes alvejados do ponto de checagem imune

podem ser reprimidos sem o uso de um DSB. Uma molécula dCas9 retém a capacidade para se ligar ao DNA alvo com base na sequência de alvejamento de sgRNA. De acordo com uma modalidade da presente invenção, um método CRISPR compreende silenciar ou reduzir a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune pela inibição ou prevenção da transcrição do(s) gene(s) alvejados. Por exemplo, um método CRISPR pode compreender fundir um domínio repressor transcricional, tal como um domínio de caixa associada com Kruppel (KRAB), a uma versão enzimaticamente inativa de Cas9, formando deste modo, por exemplo, um dCas9-KRAB, que alveja o sítio de começo da transcrição do gene de ponto de checagem imune, levando à inibição ou prevenção de transcrição do gene. Preferivelmente, o domínio repressor é alvejado para uma janela a jusante do sítio de começo de transcrição, por exemplo, cerca de 500 bp a jusante. Esta abordagem, que pode ser aludida como interferência de CRISPR (CRISPRi), leva ao knockdown de gene robusto por intermédio da redução transcricional do RNA alvo.

[00327] De acordo com modalidades particulares, uma versão enzimaticamente inativa de Cas9 (deadCas9 ou dCas9) pode ser alvejada para os sítios de começo de transcrição de modo a ativar a transcrição. Esta abordagem pode ser aludida como ativação de CRISPR (CRISPRa). De acordo com uma modalidade, um método CRISPR compreende aumentar a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune para ativação da transcrição do(s) gene(s) alvejado(s). De acordo com tais modalidades, os genes alvejados do ponto de checagem imune podem ser ativados sem o uso de um DSB. Um método CRISPR pode compreender alvejar domínios de ativação transcricional do sítio de começo de transcrição; por exemplo, pela fusão de um ativador transcricional, tal como VP64, a dCas9, formando deste modo, por exemplo, um dCas9-VP64, que alveja o sítio de começo de transcrição do ponto de checagem imune, levando à ativação da transcrição do

gene. Preferivelmente, o domínio ativador é alvejado para uma janela a montante do sítio de começo de transcrição, por exemplo, cerca de 50 a 400 bp a jusante.

[00328] Modalidades adicionais da presente invenção podem utilizar estratégias de ativação que foram desenvolvidas para a ativação potente de genes alvos em células de mamífero. Os exemplos não limitantes incluem coexpressão de dCas9 rotulada com epítipo e proteínas efetoras ativadoras de anticorpo (por exemplo, o sistema SunTag), dCas9 fundido a uma pluralidade de domínios de ativação diferentes em série (por exemplo, dCas9-VPR) ou coexpressão de dCas9-VP64 com um gRNA de armação modificado e ativadores auxiliares de ligação ao RNA adicionais (por exemplo, ativadores SAM).

[00329] De acordo com outras modalidades, um método de edição de genoma mediado por CRISPR aludido como engenheiramento de proteína racional assistido por CRISPR (CARPE) pode ser usada de acordo com modalidades da presente invenção, como divulgado na Patente US No. 9.982.278, que é aqui incorporada por referência. CARPE envolve a geração de bibliotecas de “doador” e “destino” que incorporam mutações direcionadas a partir de cassetes de edição de DNA de filamento único (ssDNA) ou DNA de filamento duplo (dsDNA) diretamente dentro do genoma. A construção das bibliotecas de doador envolve cotransformar oligonucleotídeos de edição racionalmente planejados dentro de células com um RNA guia (gRNA) que hibridiza a uma sequência de DNA alvo. Os oligonucleotídeos de edição são planejados para juntar deleção ou mutação de um PAM com a mutação de um ou mais códons desejados no gene adjacente. Isto permite que a biblioteca de doador inteira seja gerada em uma única transformação. A biblioteca de doador é recuperada pela amplificação dos cromossomas recombinantes, tais como por uma reação de PCR, usando um traço sintético do oligonucleotídeo de edição, a saber, uma segunda deleção ou mutação de PAM que seja

simultaneamente incorporada no terminal 3' do gene. Isto junta covalentemente as mutações alvo de códon direcionadas para uma deleção de PAM. As bibliotecas de doador são depois cotransformadas dentro de células com um vetor gRNA de destino para criar uma população de células que expressa uma biblioteca de proteína racionalmente planejada.

[00330] De acordo com outras modalidades, métodos para a edição de genoma rastreável, de precisão usando um sistema mediado por CRISPR aludido como Genome Engineering by Trackable CRISPR Enriched Recombineering (GEn-TraCER) pode ser usada de acordo com modalidades da presente invenção, como divulgado na Patente US No. 9.982.278, que é aqui incorporada por referência. Os métodos e vetores de GEn-TraCER combinam um cassete de edição com um gene codificando gRNA em um único vetor. O cassete contém uma mutação desejada e uma mutação PAM. O vetor, que também pode codificar Cas9, é aquele inserido dentro de uma célula ou população de células. Isto ativa a expressão do sistema CRISPR na célula ou população de células, fazendo com que o gRNA recrute Cas9 para a região alvo, onde uma ruptura de dsDNA ocorre, permitindo a integração da mutação PAM.

[00331] Os exemplos não limitantes de genes que podem ser silenciados ou inibidos pela edição permanente de genes TIL por intermédio de um método CRISPR incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[00332] Os exemplos não limitantes de genes que podem ser realçados

pela edição permanente de genes TIL por intermédio de um método CRISPR incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

[00333] Os exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método CRISPR e que pode ser usada de acordo com modalidades da presente invenção, estão descritos nas Patentes U.S. Nos. 8.697.359, 8.993.233, 8.795.965, 8.771.945, 8.889.356, 8.865.406, 8.999.641, 8.945.839, 8.932.814, 8.871.445, 8.906.616 e 8.895.308, que são aqui incorporadas por referência. Recursos para realizar os métodos CRISPR, tais como plasmídeos para expressar CRISPR/Cas9 e CRISPR/Cpf1, estão comercialmente disponíveis a partir de companhias tais como GenScript.

[00334] Em uma modalidade, modificações genéticas de populações de TILs, como aqui descritas, podem ser realizadas usando o sistema CRISPR/Cpf1 como descrito na Patente U.S. No. US 9.790.490, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. O sistema CRISPR/Cpf1 é funcionalmente distinto do sistema CRISPR-Cas9 em que os arranjos de CRISPR associados com Cpf1 são processados dentro de crRNAs maduros sem a necessidade quanto a um tracrRNA adicional. Os crRNAs usadas no sistema CRISPR/Cpf1 têm um espaçador ou sequência guia e uma sequência de repetição direta. O complexo Cpf1p-crRNA que é formado usando este método é suficiente por si só para clivar o DNA alvo.

[00335] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de

TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende a transferência de um Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR)/Cas9 ou sistema CRISPR/Cpf1 para modular a expressão de pelo menos uma proteína.

[00336] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende a transferência de um Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR)/Cas9 ou CRISPR/Cpf1 sistema para inibir a expressão de PD-1 e LAG-3.

2. Métodos TALE

[00337] Um método para expandir TILs dentro de uma população terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos

métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A) ou como descrito na PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende adicionalmente a edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs por um método TALE. De acordo com modalidades particulares, o uso de um método TALE durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método TALE durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[00338] TALE significa proteínas “Efetoras Semelhantes ao Ativador de Transcrição”, que incluem TALENs (“Nucleases Efetoras Semelhantes ao Ativador de Transcrição”). Um método de usar um sistema TALE para a edição de gene também pode ser aqui aludido como um método TALE. TALEs são proteínas de ocorrência natural a partir das bactérias patogênicas vegetais do gênero *Xanthomonas* e contêm domínios de ligação de DNA compostos de uma série de domínios de repetição de 33 a 35 aminoácidos que reconhecem cada um único par de base. A especificidade de TALE é determinada por dois aminoácidos hipervariáveis que são conhecidos como o dirresíduo variável na repetição (RVDs). As repetições de TALE modulares são ligadas juntas para reconhecer sequências de DNA contíguas. Um RVD específico no domínio de ligação de DNA reconhece uma base no local alvo, provendo um traço estrutural para montar domínios de ligação de DNA previsíveis. Os domínios de ligação de DNA de um TALE são fundidos ao domínio catalítico de uma FokI endonuclease tipo IIS para tornar uma TALE nuclease alvejável. Para induzir mutação específica de sítio, dois braços TALEN individuais, separados por uma região espaçadora de 14 a 20 bp, levando os monômeros FokI em proximidade imediata para dimerizar e

produzir uma ruptura de filamento duplo alvejada.

[00339] Diversos estudos grandes, sistemáticos utilizando vários métodos de montagem têm indicado que as repetições de TALE podem ser combinadas para reconhecer virtualmente qualquer sequência definida pelo usuário. As estratégias que possibilitam a montagem rápida de arranjos TALE personalizados incluem a clonagem molecular Golden Gate, montagem de fase sólida de alto desempenho e técnicas de clonagem independentes de ligação. Os arranjos TALE designados personalizados também estão comercialmente disponíveis através da Collectis Bioresearch (Paris, França), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, USA) e Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Adicionalmente ferramentas com base na web, tais como TAL Effector-Nucleotide Target 2.0, estão disponíveis que possibilitam o planejamento de arranjos de repetição de efector TAL personalizada para alvos desejados e também provê sítios de ligação de efector TAL previstos. Ver Doyle, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, W117-W122. Os exemplos de métodos TALE e TALEN adequados para o uso na presente invenção são descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nos. US 2011/0201118 A1; US 2013/0117869 A1; US 2013/0315884 A1; US 2015/0203871 A1 e US 2016/0120906 A1, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência.

[00340] De acordo com uma modalidade da presente invenção, um método TALE compreende silenciar ou reduzir a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune pela inibição ou prevenção da transcrição do(s) gene(s) alvejado(s). Por exemplo, um método TALE pode incluir utilizar KRAB-TALEs, em que o método compreende fundir um domínio de caixa associada com Kruppel transcricional (KRAB) a um domínio de ligação de DNA que alveja o sítio de começo de transcrição do gene, levando à inibição ou prevenção da transcrição do gene.

[00341] De acordo com uma outra modalidade, um método TALE

compreende silenciar ou reduzir a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune pela introdução de mutações no(s) gene(s) alvejado(s). Por exemplo, um método TALE pode incluir fundir um domínio efetor de nuclease, tal como FokI, ao domínio de ligação de DNA de TALE, resultando em um TALEN. FokI é ativo como um dímero; consequentemente, o método compreende construir pares de TALENs para posicionar os domínios da FOKL nuclease aos sítios alvos genômicos adjacentes, onde eles introduzem rupturas de filamento duplo de DNA. Uma ruptura de filamento duplo pode ser completada a seguir do posicionamento correto e dimerização de FokI. Uma vez que a ruptura de filamento duplo é inserida, o reparo do DNA pode ser obtida por intermédio de dois mecanismos diferentes: o par de recombinação homóloga de alta fidelidade (HRR) (também conhecido como reparo direcionado pela homologia ou HDR) ou a junção de extremidade não homóloga propensa a erro (NHEJ). O reparo de rupturas de filamento duplo por intermédio de NHEJ preferivelmente resulta em deleções, inserções ou substituições de sítio alvo de DNA, isto é, NHEJ tipicamente leva à introdução de inserções e deleções pequenas no sítio da ruptura, frequentemente induzindo mudanças de quadro que nocauteia a função de gene. De acordo com modalidades particulares, os pares TALEN são alvejados no máximo 5' exons dos genes, promovendo mutações de mudança de matriz precoces ou códons de parada prematuros. A(s) mutação(ões) genética(s) inserida(s) pelo TALEN são preferivelmente permanentes. Assim, de acordo com uma modalidade, o método compreende silenciar ou reduzir a expressão de um gene de ponto de checagem imune pela utilização de TALENs dimerizados para induzir uma ruptura de filamento duplo específica de sítio que é reparada por intermédio da NHEJ propensa a erro, levando a uma ou mais mutações no gene de ponto de checagem imune alvejado.

[00342] De acordo com modalidades adicionais, TALENs são utilizados para introduzir alterações genéticas por intermédio de HRR, tal

como mutações pontuais não aleatórias, deleção alvejada ou adição de fragmentos de DNA. A introdução de rupturas de filamento duplo de DNA permite a edição de gene por intermédio da recombinação homóloga na presença de DNA doador adequado. De acordo com uma modalidade, o método compreende coentregar TALENs dimerizados e um plasmídeo doador carregando braços de homologia específicos de local para induzir uma ruptura de filamento duplo específica de sítio e integrar um ou mais transgenes dentro do DNA.

[00343] De acordo com uma outra modalidade, um TALEN que é uma proteína híbrida derivada de FokI e AvrXa7, como divulgado na Publicação de Patente U.S. No. 2011/0201118, pode ser usada de acordo com modalidades da presente invenção. Este TALEN retém especificidade de reconhecimento para nucleotídeos alvos de AvrXa7 e a atividade de clivagem de DNA de filamento duplo de FokI. Os mesmos métodos podem ser usados para preparar outro TALEN tendo especificidade de reconhecimento diferente. Por exemplo, TALENs compactos podem ser gerados pelo engendramento de uma armação de TALE de núcleo tendo conjuntos diferentes de RVDs para mudar a especificidade de ligação de DNA e alvejar uma sequência alvo de dsDNA única específica. Ver a Publicação de Patente U.S. No. 2013/0117869. Uma seleção de domínios catalíticos pode ser fixada à armação para efetuar o processamento de DNA, que pode ser engenheirado para garantir que o domínio catalítico seja capaz de processar DNA próximo da sequência alvo de dsDNA único quando fundida à armação de TALE de núcleo. Um ligador peptídico também pode ser engenheirado para fundir o domínio catalítico à armação para criar um TALEN compacto fabricado de uma única cadeia de polipeptídeo que não requer dimerização para alvejar uma única sequência de dsDNA específica. Uma armação TALE de núcleo também pode ser modificada fundindo-se um domínio catalítico, que pode ser um monômero TAL, ao seu terminal N, permitindo a possibilidade de que

estes domínio catalítico interaja com um outro domínio catalítico fundido a um outro monômero TAL, criando deste modo uma entidade catalítica adequada para processar DNA na proximidade da sequências alvo. Ver a Publicação de Patente U.S. No. 2015/0203871. Esta arquitetura permite que apenas um filamento de DNA seja alvejado, o que não é uma opção para as arquiteturas de TALEN clássicas.

[00344] De acordo com uma modalidade da presente invenção, RVDs convencionais podem ser usadas para criar TALENs que são capazes de reduzir significativamente a expressão de gene. Em uma modalidade, quatro RVDs, NI, HD, NN e NG, são usadas para alvejar adenina, citosina, guanina e timina, respectivamente. Estes RVDs convencionais podem ser usadas, por exemplo, para criar TALENs alvejando o gene PD-1. Os exemplos de TALENs usando RVDs convencionais incluem os TALENs T3v1 e T1 divulgados em Gautron *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* dez 2017, Vol. 9: 312-321 (Gautron), que é aqui incorporada por referência. Os TALENs T3v1 e T1 alvejam o segundo exon do local *PDCD1* onde o sítio de ligação de PD-L1 está localizado e são capazes de reduzir consideravelmente a produção de PD-1. Em uma modalidade, o TALEN T1 assim o faz usando a SEQ ID NO: 127 alvo e o TALEN T3v1 o faz usando a SEQ ID NO: 128 alvo.

[00345] De acordo com uma outra modalidade, TALENs são modificados usando RVDs não convencionais para melhorar a sua atividade e especificidade para um gene alvo, tal como divulgado em Gautron. RVDs de ocorrência natural apenas abrangem uma pequena fração do repertório de diversidade potencial para os locais de aminoácido hipervariáveis. RVDs não convencionais proveem uma alternativa para RVDs naturais e têm novos traços de especificidade de alvejamento intrínsecos que podem ser usadas para excluir o alvejamento de alvos fora do sítio (sequências dentro do genoma que contém uns poucos desemparelhamentos em relação à sequência

alvejada) pelo TALEN. RVDs não convencionais podem ser identificados pela geração e triagem de coleções de TALEN contendo combinações alternativas de aminoácidos nos dois locais de aminoácido hipervariáveis nas posições definidas de um arranjo como divulgado em Juillerat, *et al.*, *Scientific Reports* 5, Número de Artigo 8150 (2015), que é aqui incorporada por referência. Em seguida, RVDs não convencionais podem ser selecionados que discriminam entre os nucleotídeos presentes na posição de desemparelhamentos, que podem impedir a atividade de TALEN nas sequências fora do sítio enquanto ainda permitindo o processamento apropriado da localização alvo. Os RVDs não convencionais selecionados podem ser depois usadas para substituir os RVDs convencionais em um TALEN. Os exemplos de TALENs onde RVDs convencionais foram recolocados pelos RVDs não convencionais incluem os TALENs PD-1 T3v2 e T3v3 produzido por Gautron. Estes TALENs tiveram especificidade aumentada quando comparados com os TALENs usando RVDs convencionais.

[00346] De acordo com modalidades adicionais, TALEN pode ser utilizado para introduzir alterações genéticas para silenciar ou reduzir a expressão de dois genes. Por exemplo, dois TALENs separados podem ser gerados para alvejar dois genes diferentes e depois usadas juntos. Os eventos moleculares gerados pelos dois TALEN nos seus respectivos locais e sítios fora dos sítios fora do alvo potenciais podem ser distinguidos pelo sequenciamento de DNA de alto rendimento. Isto permite a análise de sítios fora do alvo e identificação dos sítios que resultariam do uso de ambos TALENs. Com base nesta informação, RVDs convencionais e não convencionais podem ser selecionados para engenheirar TALEN que aumentasse a especificidade e atividade mesmo quando usadas juntos. Por exemplo, Gautron divulga o uso combinado de PD-1 T3v4 e TALEN TRAC para produzir células T CAR de nocaute duplo, que mantiveram uma função

antitumor *in vitro* potente.

[00347] Em uma modalidade, o método de Gautron ou outros métodos aqui descritos podem ser utilizados para editar geneticamente TILs, que podem ser depois expandidos por qualquer um dos procedimentos aqui descritos. Em uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende as etapas de:

(a) ativar uma primeira população de TILs obtida a partir de um tumor ressecado de um paciente usando grânulos ativadores de CD3 e CD28 ou anticorpos por 1 a 5 dias;

(b) edição de gene de pelo menos uma porção da primeira população de TILs usando eletroporação de nucleases do Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição para se obter uma segunda população de TILs;

(c) opcionalmente incubar a segunda população de TILs;

(d) realizar uma primeira expansão cultivando-se a segunda população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma terceira população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs;

(e) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma quarta população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a quarta população de TILs, em que a quarta população de TILs é uma população terapêutica de TILs;

(f) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (e);

(g) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma

bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(h) em que uma ou mais das etapas (a) para (g) são realizadas em um sistema fechado, estéril.

[00348] Em uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende as etapas de:

(a) ativar uma primeira população de TILs obtida a partir de um tumor ressecado de um paciente usando grânulos ativadores de CD3 e CD28 ou anticorpos por 1 a 5 dias;

(b) edição de gene de pelo menos uma porção da primeira população de TILs usando eletroporação de nucleases de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição no meio de citoporação para se obter uma segunda população de TILs;

(c) opcionalmente incubar a segunda população de TILs;

(d) realizar uma primeira expansão cultivando-se a segunda população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma terceira população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 6 a 9 dias para se obter a terceira população de TILs;

(e) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma quarta população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 9 a 11 dias para se obter a quarta população de TILs, em que a quarta população de TILs é uma população terapêutica de TILs;

(f) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (e);

(g) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(h) em que uma ou mais das etapas (a) a (g) são realizadas em um sistema fechado, estéril.

[00349] Em uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende as etapas de:

(a) ativar uma primeira população de TILs obtida a partir de um tumor ressecado de um paciente usando grânulos ativadores de CD3 e CD28 ou anticorpos por 1 a 5 dias;

(b) edição de gene de pelo menos uma porção da primeira população de TILs usando eletroporação de nucleases do Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição em meio de citoporação para se obter uma segunda população de TILs;

(c) opcionalmente incubar a segunda população de TILs, em que a incubação é realizada a cerca de 30 a 40 °C com cerca de 5% de CO₂;

(d) realizar uma primeira expansão cultivando-se a segunda população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma terceira população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 6 a 9 dias para se obter a terceira população de TILs;

(e) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma quarta população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 9 a 11 dias para se obter a quarta população de TILs, em que a quarta população de TILs é uma população terapêutica de TILs;

(f) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (e);

(g) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(h) em que um ou mais das etapas (a) para (g) são realizadas em um sistema fechado, estéril.

[00350] De acordo com uma outra modalidade, TALENs podem ser especificamente planejados, que permite taxas mais altas de eventos de DSB dentro da(s) célula(s) alvo(s) que são capazes de alvejar uma seleção específica de genes. Ver a Publicação de Patente U.S. No. 2013/0315884. O uso de tais endonucleases de corte raro aumenta as chances de se obter inativação dupla de genes alvos em células transfectadas, permitindo a produção de células engenheiradas, tais como células T. Adicionalmente, domínios catalíticos adicionais podem ser inseridos com o TALEN para aumentar a mutagênese e realçar a inativação de gene alvo. Os TALENs descritos na Publicação de Patente U.S. No. 2013/0315884 foram usadas com êxito para engenheirar células T para torná-las adequadas para a imunoterapia. TALENs também podem ser usadas para inativar vários genes do ponto de checagem imune nas células T, incluindo a inativação de pelo menos dois genes em uma única célula T. Ver Publicação de Patente U.S. No. 2016/0120906. Adicionalmente, TALENs podem ser usadas para inativar genes codificando alvos para agentes imunossupressivos e receptores de célula T, como divulgado na Publicação de Patente U.S. No. 2018/0021379, que é aqui incorporada por referência. Adicionalmente, TALENs podem ser usadas para inibir a expressão de beta 2-microglobulina (B2M) e/ou transativador do complexo de histocompatibilidade maior classe II (CIITA), como divulgado na Publicação de Patente U.S. No. 2019/0010514, que é aqui incorporada por referência.

[00351] Os exemplos não limitantes de genes que podem ser silenciados ou inibidos pela edição permanente de genes TIL por intermédio de um método TALE incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[00352] Os exemplos não limitantes de nucleases de TALE alvejando o gene PD-1 são providos na tabela seguinte. Nestes exemplos, as sequências genômicas alvejadas contêm duas sequências de 17 bp (pares de base) de comprimento (aludidas como meio alvos, mostrados nas letras maiúsculas) separadas por um espaçador de 15 bp (mostrados nas letras minúsculas). Cada meio alvo é reconhecido pelas repetições de metade das TALE-nucleases listadas na tabela. Assim, de acordo com modalidades particulares, as TALE-nucleases de acordo com a invenção reconhecem e clivam a sequência alvo selecionada do grupo consistindo da: SEQ ID NO: 127 e SEQ ID NO: 128. As sequências TALEN e os métodos de edição de gene também são descritos em Gautron, debatido acima.

No.	Sequência PD-1 Alvo	Sequência de Repetição	Meia-TALE nuclease
1	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA (SEQ ID NO: 127)	Repetição à esquerda de PD-1 (SEQ ID NO: 129) Repetição à direita de PD-1 (SEQ ID NO: 130)	TALEN à esquerda de PD-1 (SEQ ID NO: 133) TALEN à direita de PD-1 (SEQ ID NO: 134)
2	TACCTCTGTGGGGCCAT ctccctggccccc GGCGCAGATCAAAGAGA (SEQ ID NO: 128)	Repetição à esquerda de PD-1 (SEQ ID NO: 131) Repetição à direita de PD-1 (SEQ ID NO: 132)	TALEN à esquerda de PD-1 (SEQ ID NO: 135) TALEN à direita de PD-1 (SEQ ID NO: 136)

[00353] Em uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs

compreende as etapas de:

(a) ativar uma primeira população de TILs obtida a partir de um tumor ressecado de um paciente usando grânulos ativadores de CD3 e CD28 ou anticorpos por 1 a 5 dias;

(b) edição de gene de pelo menos uma porção da primeira população de TILs usando eletroporação de nucleases de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição alvejando *PDCD1* no meio de citoporação para se obter uma segunda população de TILs;

(c) opcionalmente incubar a segunda população de TILs, em que a incubação é realizada de cerca de 30 a 40 °C com cerca de 5% de CO₂;

(d) realizar uma primeira expansão cultivando-se a segunda população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma terceira população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 6 a 9 dias para se obter a terceira população de TILs;

(e) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma quarta população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 9 a 11 dias para se obter a quarta população de TILs, em que a quarta população de TILs é uma população terapêutica de TILs;

(f) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (e);

(g) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(h) em que uma ou mais das etapas (a) a (g) são realizadas em um sistema fechado, estéril.

[00354] Em uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende as etapas de:

(a) ativar uma primeira população de TILs obtida a partir de um tumor ressecado de um paciente usando grânulos ativadores de CD3 e CD28 ou anticorpos por 1 a 5 dias;

(b) edição de gene de pelo menos uma porção da primeira população de TILs usando eletroporação of nucleases de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição alvejando a SEQ ID NO: 128 em meio de citoporação para se obter uma segunda população de TILs;

(c) opcionalmente incubar a segunda população de TILs, em que a incubação é realizada em cerca de 30 a 40 °C com cerca de 5% de CO₂;

(d) realizar uma primeira expansão cultivando-se a segunda população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma terceira população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 6 a 9 dias para se obter a terceira população de TILs;

(e) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma quarta população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 9 a 11 dias para se obter a quarta população de TILs, em que a quarta população de TILs é uma população terapêutica de TILs;

(f) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (e);

(g) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(h) em que uma ou mais das etapas (a) a (g) são realizadas em um sistema fechado, estéril.

[00355] Em uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende as etapas de:

(a) ativar uma primeira população de TILs obtida a partir de um tumor ressecado de um paciente usando grânulos ativadores de CD3 e CD28 ou anticorpos por 1 a 5 dias;

(b) edição de gene de pelo menos uma porção da primeira população de TILs usando eletroporação de mRNA de nuclease de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição de acordo com a SEQ ID NO: 135 e SEQ ID NO: 136 em meio de citoporação para se obter uma segunda população de TILs;

(c) opcionalmente incubar a segunda população de TILs, em que a incubação é realizada de cerca de 30 a 40 °C com cerca de 5% de CO₂;

(d) realizar uma primeira expansão cultivando-se a segunda população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma terceira população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 6 a 9 dias para se obter a terceira população de TILs;

(e) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da terceira população de TILs com IL-2 adicional, OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma quarta população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 9 a 11 dias para se obter a quarta população de TILs, em que a quarta população de TILs é uma população terapêutica de TILs;

(f) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (e);

(g) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(h) em que um ou mais of etapas (a) para (g) são realizadas em um sistema fechado, estéril.

[00356] Outros exemplos não limitantes de genes que podem ser realçados pela edição permanente de genes TIL por intermédio de um método TALE incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

[00357] Os exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método TALE e que pode ser usada de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos na Patente U.S. No. 8.586.526, que é aqui incorporada por referência. Estes exemplos divulgados incluem o uso de um polipeptídeo de ligação de DNA que não ocorre naturalmente que tem duas ou mais unidades de repetição de TALE contendo um RVD repetido, um polipeptídeo de capuz N fabricado a partir de resíduos de uma proteína TALE e um polipeptídeo de capuz C fabricado a partir de um fragmento de uma região de terminal C de comprimento total de uma proteína TALE.

[00358] Os exemplos de projetos TALEN e estratégias de projeto, avaliações de atividade, estratégias de triagem e métodos que podem ser usadas para realizar eficientemente a integração e inativação de mediado por gene TALEN e que podem ser usadas de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos em Valton, *et al.*, *Methods*, 2014, 69, 151-170, que é aqui incorporada por referência.

[00359] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um sistema de TALE nuclease para modular a expressão de pelo menos uma proteína.

[00360] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50

vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um sistema de TALE nuclease para suprimir a expressão de PD-1 e LAG-3.

3. Métodos de Dedo de Zinco

[00361] Um método para expandir TILs dentro de uma população

terapêutica pode ser realizado de acordo com qualquer modalidade dos métodos aqui descritos (por exemplo, Processo 2A) ou como descrito na PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 ou PCT/US2018/012633, em que o método compreende adicionalmente edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs por um método de dedo de zinco ou dedo de zinco nuclease. De acordo com modalidades particulares, o uso de um método do dedo de zinco durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs. Alternativamente, o uso de um método do dedo de zinco durante o processo de expansão de TIL faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

[00362] Um dedo de zinco individual contém aproximadamente 30 aminoácidos em uma configuração $\beta\beta\alpha$ conservada. Diversos aminoácidos na superfície da hélice α tipicamente contata 3 bp na ranhura maior de DNA, com níveis variáveis de seletividade. Os dedos de zinco têm dois domínios de proteína. O primeiro domínio é o domínio de ligação de DNA, que inclui fatores de transcrição eucarióticos e contém o dedo de zinco. O segundo domínio é o domínio da nuclease, que inclui a enzima de restrição de FokI e é responsável pela clivagem catalítica de DNA.

[00363] os domínios de ligação de DNA de ZFNs individuais tipicamente contêm entre três e seis repetições de dedo de zinco individuais e podem cada um reconhecer entre 9 e 18 bps. Se os domínios de dedo de zinco são específicos para o seu sítio alvo pretendido então mesmo um par de ZFNs de 3 dedos que reconhecem um total de 18 bps pode, em teoria, alvejar um único local em um genoma de mamífero. Um método para gerar novos arranjos de dedo de zinco é combinar “módulos” de dedo de zinco menores de especificidade conhecida. O processo de montagem modular mais comum envolve combinar três dedos de zinco separados que possam cada um

reconhecer uma sequência de DNA de 3 bp para gerar um arranjo de 3 dedos que possa reconhecer um sítio alvo de 9 bp. Alternativamente, abordagens com base na seleção, tais como engenheiramento de agrupamento oligomerizado (OPEN) podem ser usadas para selecionar quanto a novos arranjos de dedo de zinco a partir de bibliotecas randomizadas que levam em consideração interações dependentes de contexto entre dedos vizinhos. Os dedos de zinco engenheirados estão comercialmente disponível; Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) desenvolveu uma plataforma patenteada (CompoZr®) para a construção de dedo de zinco em parceria com a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

[00364] Os exemplos não limitantes de genes que podem ser silenciados ou inibidos pela edição permanente de genes TIL por intermédio de um método do dedo de zinco incluem PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

[00365] Os exemplos não limitantes de genes que podem ser realçados pela edição permanente de genes TIL por intermédio de um método do dedo de zinco incluem CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

[00366] Os exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método do dedo de zinco, que pode ser usada de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos nas Patentes U.S. Nos. 6.534.261, 6.607.882, 6.746.838, 6.794.136,

6.824.978, 6.866.997, 6.933.113, 6.979.539, 7.013.219, 7.030.215, 7.220.719, 7.241.573, 7.241.574, 7.585.849, 7.595.376, 6.903.185 e 6.479.626, que são aqui incorporadas por referência.

[00367] Outros exemplos de sistemas, métodos e composições para alterar a expressão de uma sequência de gene alvo por um método do dedo de zinco, que pode ser usada de acordo com modalidades da presente invenção, são descritos em Beane, *et al.*, *Mol. Therapy*, 2015, 23 1380-1390, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência.

[00368] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a

transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um sistema de dedo de zinco nuclease para modular a expressão de pelo menos uma proteína.

[00369] De acordo com uma modalidade, um método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de

TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um sistema de nuclease de dedo de zinco para suprimir a expressão de PD-1 e LAG-3.

IV. Processos de Fabricação de TIL

[00370] Um processo de TIL exemplar conhecido como Processo 2A contendo alguns destes traços é representado na Figura 1 e algumas das vantagens desta modalidade da presente invenção em relação ao processo 1C são descritas na Figura 2, como na Figura 14. O processo 1C é mostrado para comparação na Figura 3. Dois cronogramas alternativos para a terapia de TIL com base no Processo 2A são mostrados nas Figura 4 (contagens de célula mais altas) e Figura 5 (contagens de célula mais baixas). Uma modalidade do Processo 2A é mostrado na Figura 6 assim como na Figura 9. As Figuras 13 e 14 proveem adicionalmente um processo 2A exemplar comparado a um processo 1C exemplar.

[00371] Como aqui debatido, a presente invenção pode incluir uma etapa referente à re-estimulação de TILs criopreservados para aumentar a sua atividade metabólica e assim a saúde relativa antes do transplante dentro de um paciente e métodos de testar a dita saúde metabólica. Como geralmente aqui resumido, TILs são geralmente tirados de uma amostra de paciente e manipulados para expandir o seu número antes do transplante dentro de um paciente. Em algumas modalidades, os TILs podem ser opcionalmente geneticamente manipulados como debatido abaixo.

[00372] Em algumas modalidades, os TILs podem ser criopreservados.

Uma vez descongelados, eles também podem ser reestimulados para aumentar o seu metabolismo antes da infusão dentro de um paciente.

[00373] Em algumas modalidades, a primeira expansão (incluindo processos aludidos como o pré-REP assim como processos mostrados na Figura 9 como Etapa A) é encurtada para 3 a 14 dias e a segunda expansão (incluindo processos aludidos como o REP assim como processos mostrados nas Figura 9 como Etapa B) é encurtada para 7 a 14 dias, como debatido em detalhes abaixo assim como nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão (por exemplo, uma expansão descrita como Etapa B na Figura 9) é encurtada para 11 dias e a segunda expansão (por exemplo, uma expansão como descrita na etapa D na Figura 9) é encurtada para 11 dias, como debatido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4, 5 e 27. Em algumas modalidades, a combinação da primeira expansão e segunda expansão (por exemplo, expansões descritas como Etapa B e Etapa D na Figura 9) são encurtadas para 22 dias, como debatido em detalhes abaixo e nos exemplos e figuras.

[00374] As Designações de “Etapa” A, B, C, *etc.*, abaixo estão em referência com a Figura 9 e em referência a certas modalidades aqui descritas. A ordem das Etapas abaixo e na Figura 9 é exemplar e qualquer combinação ou ordem de etapas, assim como etapas adicionais, repetição de etapas e/ou omissão de etapas é considerada pelo presente pedido e os métodos aqui divulgados.

A. ETAPA A: Obter Amostra de Tumor de Paciente

[00375] No geral, TILs são inicialmente obtida a partir de uma amostra de tumor de paciente (“TILs primários”) e depois expandidos dentro de uma população maior para manipulação adicional como aqui descrita, opcionalmente criopreservados, reestimulados como aqui resumido e opcionalmente avaliados quanto ao fenótipo e parâmetros metabólicos como uma indicação da saúde de TIL.

[00376] Uma amostra de tumor de paciente pode ser obtida usando-se métodos conhecidos na técnica, geralmente por intermédio de ressecção cirúrgica, biópsia de agulha ou outro meio para se obter uma amostra que contenha uma mistura de células de tumor e TIL. No geral, a amostra de tumor pode ser de qualquer tumor sólido, incluindo tumores primários, tumores invasivos ou tumores metastáticos. A amostra de tumor também pode ser um tumor líquido, tal como um tumor obtida a partir de uma malignidade hematológica. O tumor sólido pode ser de qualquer tipo de câncer, incluindo, mas não limitado a mamário, pancreático, prostático, colorretal, pulmonar, cerebral, renal, estomacal e de pele (incluindo, mas não limitado a carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal e melanoma). Em algumas modalidades, TILs úteis são obtidas a partir de tumores de melanoma maligno, visto que estes foram relatados ter níveis particularmente altos de TILs.

[00377] O termo “tumor sólido” se refere a uma massa anormal de tecido que usualmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os tumores sólidos podem ser benignos ou malignos. O termo “câncer de tumor sólido” se refere a tumores sólidos malignos, neoplásticos ou cancerosos. Os cânceres de tumor sólido incluem, mas não são limitados a sarcomas, carcinomas e linfomas, tais como cânceres do pulmão, mama, câncer mamário triplo negativo, próstata, cólon, reto e bexiga. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado de câncer cervical, câncer da cabeça e pescoço (incluindo, por exemplo, carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço (HNSCC)) glioblastoma, câncer ovariano, sarcoma, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer mamário, câncer mamário triplo negativo e carcinoma pulmonar de célula não pequena. As estruturas teciduais dos tumores sólidos incluem compartimentos teciduais interdependentes incluindo a parênquima (células cancerosas) e as células estrômicas de sustentação nas quais as células cancerosas são dispersas e que podem prover um microambiente de

sustentação.

[00378] O termo “malignidade hematológica” se refere a cânceres e tumores de mamífero dos tecidos hematopoiéticos e linfóides, incluindo, mas não limitados a tecidos do sangue, medula óssea, linfonodos e sistema linfático. As malignidades hematológicas também são aludidas como “tumores líquidos.” As malignidades hematológicas incluem, mas não são limitadas à leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma linfocítico crônico (SLL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crônica (CML), leucemia monocítica aguda (AMoL), linfoma de Hodgkin e linfoma de não Hodgkin. O termo “malignidade hematológica de célula B” se refere às malignidades hematológicas que afetam as células B.

[00379] Uma vez obtida, a amostra de tumor é geralmente fragmentada usando dissecação cortante em pedaços pequenos dentre 1 a cerca de 8 mm³, com cerca de 2 a 3 mm³ sendo particularmente útil. Os TILs são cultivados a partir destes fragmentos usando digestões de tumor enzimáticas. Tais digestões de tumor podem ser produzidas pela incubação em meios enzimáticos (por exemplo, tampão do Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 2 mM de glutamato, 10 mg/mL de gentamicina, 30 unidades/mL de DNase e 1,0 mg/mL de collagenase) seguido pela dissociação mecânica (por exemplo, usando um dissociador de tecido). As digestões de tumor podem ser produzidas colocando-se o tumor em meios enzimáticos e dissociando mecanicamente o tumor por aproximadamente 1 minuto, seguido pela incubação por 30 minutos a 37 °C em 5% de CO₂, seguido pelos ciclos repetidos de dissociação mecânica e incubação sob as condições anteriores até que apenas pedaços pequenos de tecido estejam presentes. No final deste processo, se a suspensão de célula contém um grande número de células sanguíneas vermelhas ou células mortas, uma separação de gradiente de densidade usando o polissacarídeo hidrofílico ramificado FICOLL pode ser

realizado para remover estas células. Métodos alternativos conhecidos na técnica podem ser usadas, tais como aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2012/0244133 A1, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. Qualquer um dos métodos anteriores pode ser usado em qualquer uma das modalidades aqui descritas para os métodos de expandir TILs ou métodos de tratar um câncer.

[00380] No geral, a suspensão de célula colhida é chamada de uma “população de célula primária” ou uma população de célula “recém colhida”.

[00381] Em algumas modalidades, a fragmentação inclui fragmentação física, incluindo por exemplo, dissecação assim como digestão. Em algumas modalidades, a fragmentação é fragmentação física. Em algumas modalidades, a fragmentação é dissecação. Em algumas modalidades, a fragmentação é pela digestão. Em algumas modalidades, TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de digestões enzimáticas de tumor e fragmentos de tumor obtida a partir dos pacientes. Em uma modalidade, TILs podem ser inicialmente cultivados a partir de digestões enzimáticas de tumor e fragmentos de tumor obtida a partir dos pacientes.

[00382] Em algumas modalidades, onde o tumor é um tumor sólido, o tumor passa pela fragmentação física depois que a amostra de tumor é obtida, por exemplo, na Etapa A (como provido na Figura 9). Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre antes da criopreservação. Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre depois da criopreservação. Em algumas modalidades, a fragmentação ocorre depois da obtenção do tumor e na ausência de qualquer criopreservação. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 10, 20, 30, 40 ou mais fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 30 ou 40 fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente para a primeira expansão. Em algumas modalidades, o tumor é fragmentado e 40 fragmentos ou pedaços são colocados em cada recipiente

para a primeira expansão. Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 a cerca de 50 fragmentos, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm³. Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm³ a cerca de 1500 mm³. Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1350 mm³. Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama. Em algumas modalidades, os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 fragmentos.

[00383] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos a partir de fragmentos de tumor. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é obtido pela dissecação cortante. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm³ e 10 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm³ e 8 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 1 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 2 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 3 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 4 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 5 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 6 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 7 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 8 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 9 mm³. Em algumas modalidades, o fragmento de tumor é de cerca de 10 mm³.

[00384] Em algumas modalidades, os TILs são obtidos a partir de digestões de tumor. Em algumas modalidades, digestões de tumor foram geradas pela incubação em meios de enzima, por exemplo mas não limitado a RPMI 1640, 2 mM de GlutaMAX, 10 mg/mL de gentamicina, 30 U/mL de

DNase e 1,0 mg/mL de collagenase, seguida pela dissociação mecânica (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Depois de colocar o tumor em meios de enzima, o tumor pode ser mecanicamente dissociado por aproximadamente 1 minuto. A solução pode depois ser incubada por 30 minutos a 37 °C em 5% de CO₂ e depois mecanicamente rompida mais uma vez por aproximadamente 1 minuto. Depois sendo incubada mais uma vez por 30 minutos a 37 °C em 5% de CO₂, o tumor pode ser mecanicamente rompido uma terceira vez por aproximadamente 1 minuto. Em algumas modalidades, depois do terceiro rompimento mecânico se pedaços grandes de tecido foram presentes, 1 ou 2 dissociações mecânicas adicionais foram aplicadas à amostra, com ou sem 30 minutos adicionais de incubação a 37 °C em 5% de CO₂. Em algumas modalidades, no final da incubação final se a suspensão de célula conteve um grande número de células sanguíneas vermelhas ou células mortas, uma separação de gradiente de densidade usando Ficoll pode ser realizado para remover estas células.

[00385] Em algumas modalidades, a suspensão de célula colhida antes da primeira etapa de expansão é chamada uma “população de célula primária” ou uma população de célula “recém colhida”.

[00386] Em algumas modalidades, as células podem ser opcionalmente congeladas depois a amostra colhida e armazenada congelada antes da entrada dentro da expansão descrita na etapa B, que está descrita em detalhes adicionais abaixo, assim como exemplificada na Figura 9.

B. ETAPA B: Primeira Expansão

1. TILs Jovens

[00387] Em algumas modalidades, os presentes métodos proveem quanto à obtenção de TILs jovens, que são capazes de aumentar os ciclos de replicação na administração a um indivíduo/paciente e como tal pode prover benefícios terapêuticos adicionais em relação aos TILs mais velhos (isto é, TILs que adicionalmente passaram por mais rodadas de replicação antes da

administração a um indivíduo/paciente). Traços de TILs jovens foram descritos na literatura, por exemplo Donia, *et al.*, *Scandinavian Journal of Immunology*, 75: 157–167 (2012); Dudley *et al.*, *Clin Cancer Res*, 16: 6122–6131 (2010); Huang *et al.*, *J Immunother*, 28(3): 258–267 (2005); Besser *et al.*, *Clin Cancer Res*, 19(17): OF1-OF9 (2013); Besser *et al.*, *J Immunother* 32: 415–423 (2009); Robbins, *et al.*, *J Immunol* 2004; 173: 7125–7130; Shen *et al.*, *J Immunother*, 30: 123–129 (2007); Zhou, *et al.*, *J Immunother*, 28: 53–62 (2005); e Tran, *et al.*, *J Immunother*, 31: 742–751 (2008), todas das quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

[00388] Os diversos receptores antigênicos de linfócitos T e B são produzidos pela recombinação somática de um número limitado, porém grande de segmentos de gene. Estes segmentos de gene: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e as aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de célula T (TCRs). A presente invenção provê um método para gerar TILs que exibem e aumentam a diversidade de repertório de célula T. Em algumas modalidades, os TILs obtida pelo presente método exibem um aumento na diversidade de repertório de célula T. Em algumas modalidades, os TILs obtida pelo presente método exibem um aumento na diversidade de repertório de célula T quando comparados aos TILs recém colhidos e/ou TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inserido na Figura 9. Em algumas modalidades, os TILs obtida pelo presente método exibem um aumento na diversidade de repertório de célula T quando comparados com os TILs recém colhidos e/ou TILs preparados usando os métodos aludidos como processo 1C, como exemplificado na Figura 13. Em algumas modalidades, os TILs obtida na primeira expansão exibem um aumento na diversidade de repertório de célula T. Em algumas modalidades, o aumento na diversidade é um aumento na diversidade da imunoglobulina e/ou a diversidade no receptor de célula T. Em

algumas modalidades, a diversidade que está na imunoglobulina está na cadeia pesada da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade que está na imunoglobulina está na cadeia leve da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está no receptor de célula T. Em algumas modalidades, a diversidade está em um dos receptores de célula T selecionados do grupo consistindo em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de célula T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de célula T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de célula T (TCR) beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de TCRab (isto é, TCR α/β).

[00389] Depois da dissecação ou digestão de fragmentos de tumor, por exemplo tal como descrito na etapa A da Figura 9, as células resultantes são cultivadas em soro contendo IL-2 sob condições que favoreçam o crescimento de TILs em relação ao tumor e outras células. Em algumas modalidades, as digestões de tumor são incubadas em poços de 2 mL em meios compreendendo soro AB humano inativado com 6000 IU/mL de IL-2. Esta população de célula primária é cultivada por um período de dias, geralmente de 3 a 14 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de cerca de 1×10^8 células de TIL volumosas. Em algumas modalidades, esta população de célula primária é cultivada por um período de 7 a 14 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de cerca de 1×10^8 células de TIL volumosas. Em algumas modalidades, esta população de célula primária é cultivada por um período de 10 a 14 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de cerca de 1×10^8 células de TIL volumosas. Em algumas modalidades, esta população de célula primária é cultivada por um período de cerca de 11 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente de cerca de 1×10^8 células TIL volumosas.

[00390] Em uma modalidade preferida, a expansão de TILs pode ser

realizado usando uma etapa de expansão de TIL volumoso inicial (por exemplo tal como aquelas descritas na etapa B da Figura 9, que podem incluir processos aludidos como pré-REP) como descrito abaixo e aqui, seguida por uma segunda expansão (Etapa D, incluindo processos aludidos como etapas de Protocolo de Expansão Rápida (REP)) como descrito abaixo sob a Etapa D e aqui, seguida pela criopreservação opcional e seguida por uma segunda Etapa D (incluindo processos aludidos como etapas de re-estimulação REP) como descrita abaixo e aqui. Os TILs obtida a partir deste processo podem ser opcionalmente distinguidos quanto as características fenotípicas e parâmetros metabólicos como aqui descritos.

[00391] Em modalidades onde as culturas de TIL são iniciadas em placas de 24 poços, por exemplo, usando cluster de cultura celular de Costar 24 poços, fundo chato (Corning Incorporated, Corning, NY, cada poço pode ser semeado com 1×10^6 células digeridas de tumor ou um fragmento de tumor em 2 mL de meio completo (CM) com IL-2 (6000 IU/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA). Em algumas modalidades, o fragmento de tumor está entre cerca de 1 mm^3 e 10 mm^3 .

[00392] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão é aludido como “CM”, uma abreviação para meio de cultura. Em algumas modalidades, CM para a Etapa B consiste de RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com 10% de soro AB humano, 25 mM de Hepes e 10 mg/mL de gentamicina. Em modalidades onde as culturas são iniciadas em frascos permeáveis a gás com uma capacidade de 40 mL e um fundo de silício permeável a gás de 10 cm^2 (por exemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Fig. 1), cada frasco foi carregado com 10 a 40×10^6 células diferidas de tumor viáveis ou 5 a 30 fragmentos de tumor em 10 a 40 mL de CM com IL-2. Tanto o G-Rex10 quanto as placas de 24 poços foram incubados em um incubador umidificado a 37°C em 5% de CO_2 e 5 dias depois do início da cultura, metade dos meios foi removida e

recolocada com CM e IL-2 frescos e depois do dia 5, metade dos meios foi trocado a cada 2 a 3 dias.

[00393] Depois da preparação dos fragmentos de tumor, as células resultantes (isto é, fragmentos) são cultivados em soro contendo IL-2 sob condições que favoreçam o crescimento de TILs em relação ao tumor e outras células. Em algumas modalidades, as digestões de tumor são incubadas em poços de 2 mL em meios compreendendo soro AB humano inativado (ou, em alguns casos, como aqui resumido, na presença de população de célula aAPC) com 6000 IU/mL de IL-2. Esta população de célula primária é cultivada por um período de dias, geralmente de 10 a 14 dias, resultando em uma população de TIL volumosa, geralmente cerca de 1×10^8 células de TIL volumosas. Em algumas modalidades, os meios de crescimento durante a primeira expansão compreendem IL-2 ou uma variante da mesma. Em algumas modalidades, a IL é IL-2 recombinante humana (rhIL-2). Em algumas modalidades a solução de estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20 a 30×10^6 IU/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades a solução de estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 20×10^6 IU/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades a solução de estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 25×10^6 IU/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades a solução de estoque de IL-2 tem uma atividade específica de 30×10^6 IU/mg para um frasco de 1 mg. Em algumas modalidades, a solução de estoque de IL-2 tem uma concentração final de 4 a 8×10^6 IU/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução de estoque de IL-2 tem uma concentração final de 5 a 7×10^6 IU/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução de estoque de IL-2 tem uma concentração final de 6×10^6 IU/mg de IL-2. Em algumas modalidades, a solução de estoque de IL-2 é preparada como descrito no Exemplo 4. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 10.000 IU/mL de IL-2, cerca de 9.000 IU/mL de IL-2, cerca de 8.000 IU/mL de IL-2, cerca de 7.000 IU/mL

de IL-2, cerca de 6000 IU/mL de IL-2 ou cerca de 5.000 IU/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 9.000 IU/mL de IL-2 a cerca de 5.000 IU/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 8.000 IU/mL de IL-2 a cerca de 6.000 IU/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 7.000 IU/mL de IL-2 a cerca de 6.000 IU/mL de IL-2. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 6.000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 3000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente IL-2. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 3000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1000 IU/mL, cerca de 1500 IU/mL, cerca de 2000 IU/mL, cerca de 2500 IU/mL, cerca de 3000 IU/mL, cerca de 3500 IU/mL, cerca de 4000 IU/mL, cerca de 4500 IU/mL, cerca de 5000 IU/mL, cerca de 5500 IU/mL, cerca de 6000 IU/mL, cerca de 6500 IU/mL, cerca de 7000 IU/mL, cerca de 7500 IU/mL ou cerca de 8000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende entre 1000 e 2000 IU/mL, entre 2000 e 3000 IU/mL, entre 3000 e 4000 IU/mL, entre 4000 e 5000 IU/mL, entre 5000 e 6000 IU/mL, entre 6000 e 7000 IU/mL, entre 7000 e 8000 IU/mL ou cerca de 8000 IU/mL de IL-2.

[00394] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 500 IU/mL de IL-15, cerca de 400 IU/mL de IL-15, cerca de 300 IU/mL de IL-15, cerca de 200 IU/mL de IL-15, cerca de 180 IU/mL de IL-15, cerca de 160 IU/mL de IL-15, cerca de 140 IU/mL de IL-15, cerca de 120 IU/mL de IL-15 ou cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende

cerca de 500 IU/mL de IL-15 a cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 400 IU/mL de IL-15 a cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 300 IU/mL de IL-15 a cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 200 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 180 IU/mL de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente IL-15. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 180 IU/mL de IL-15.

[00395] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 20 IU/mL de IL-21, cerca de 15 IU/mL de IL-21, cerca de 12 IU/mL de IL-21, cerca de 10 IU/mL de IL-21, cerca de 5 IU/mL de IL-21, cerca de 4 IU/mL de IL-21, cerca de 3 IU/mL de IL-21, cerca de 2 IU/mL de IL-21, cerca de 1 IU/mL de IL-21 ou cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 20 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 15 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 12 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 10 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 5 IU/mL de IL-21 a cerca de 1 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão compreende cerca de 2 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 0,5

IU/mL de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente IL-21. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1 IU/mL de IL-21.

[00396] Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende anticorpo OKT-3. O anticorpo OKT-3 pode estar presente no meio de cultura de célula começando no Dia 0 do REP (isto é, o dia de começo do REP) e/ou dia 0 da segunda expansão (isto é, o dia de começo da segunda expansão). Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 30 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende cerca de 0,1 ng/mL, cerca de 0,5 ng/mL, cerca de 1 ng/mL, cerca de 2,5 ng/mL, cerca de 5 ng/mL, cerca de 7,5 ng/mL, cerca de 10 ng/mL, cerca de 15 ng/mL, cerca de 20 ng/mL, cerca de 25 ng/mL, cerca de 30 ng/mL, cerca de 35 ng/mL, cerca de 40 ng/mL, cerca de 50 ng/mL, cerca de 60 ng/mL, cerca de 70 ng/mL, cerca de 80 ng/mL, cerca de 90 ng/mL, cerca de 100 ng/mL, cerca de 200 ng/mL, cerca de 500 ng/mL e cerca de 1 µg/mL de anticorpo OKT-3. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende entre 0,1 ng/mL e 1 ng/mL, entre 1 ng/mL e 5 ng/mL, entre 5 ng/mL e 10 ng/mL, entre 10 ng/mL e 20 ng/mL, entre 20 ng/mL e 30 ng/mL, entre 30 ng/mL e 40 ng/mL, entre 40 ng/mL e 50 ng/mL e entre 50 ng/mL e 100 ng/mL de anticorpo OKT-3. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula não compreende o anticorpo OKT-3.

[00397] Em algumas modalidades, o primeiro meio de cultura de expansão é aludido como “CM”, uma abreviação para meio de cultura. Em algumas modalidades, o mesmo é aludido como CM1 (meio de cultura 1). Em algumas modalidades, CM consiste de RPMI 1640 com GlutaMAX, suplementado com 10% de soro AB humano, 25 mM de Hepes e 10 mg/mL de gentamicina. Em modalidades onde as culturas são iniciadas em frascos de gás permeáveis com uma capacidade de 40 mL e um fundo de silício de 10 cm² permeável a gás (por exemplo, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing,

New Brighton, MN) (Fig. 1), cada frasco foi carregado com 10 a 40x 10⁶ células digeridas de tumor viáveis ou 5 a 30 fragmentos de tumor em 10 a 40 mL de CM com IL-2. Tanto o G-Rex10 quanto as placas de 24 poços foram incubadas em um incubador umidificado a 37°C em 5% de CO₂ e 5 dias depois do início da cultura, metade dos meios foi removida e repostada com CM e IL-2 frescos e depois de dia 5, metade dos meios foi trocada a cada 2 a 3 dias. Em algumas modalidades, o CM é o CM1 descrito nos Exemplos, ver, Exemplo 5. Em algumas modalidades, a primeira expansão ocorre em um meio de cultura de célula inicial ou um primeiro meio de cultura de célula. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula inicial ou o primeiro meio de cultura de célula compreende IL-2.

[00398] Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na etapa B da Figura 9, que podem incluir aqueles algumas vezes aludidos como o pré-REP) é encurtado para 3 a 14 dias, como debatido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão (incluindo processos tais como por exemplo aqueles descritos na etapa B da Figura 9, que podem incluir aqueles algumas vezes aludidos como o pré-REP) é encurtada para 7 a 14 dias, como debatido nos Exemplos e mostrados nas Figuras 4 e 5, assim como incluindo por exemplo, uma expansão como descrita na etapa B da Figura 9. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada de 10 a 14 dias, como debatido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4 e 5. Em algumas modalidades, a primeira expansão é encurtada para 11 dias, como debatido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4 e 5, assim como incluindo por exemplo, uma expansão como descrita na etapa B da Figura 9.

[00399] Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 1 dia a 14 dias. Em algumas

modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 3 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 4 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 5 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 6 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 7 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 8 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 9 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 10 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 11 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 12 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 13 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 14 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 1 dia a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 3 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 4 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 5 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 6 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 7 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 8 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 9 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 10 dias a 11 dias. Em algumas modalidades, a primeira

expansão de TIL pode prosseguir por 11 dias.

[00400] Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 é utilizada como uma combinação durante a primeira expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 assim como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante a primeira expansão, incluindo por exemplo durante um dos processos da Etapa B de acordo com a Figura 9, assim como aqui descritos. Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 é utilizada como uma combinação durante a primeira expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21 assim como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante os processos da Etapa B de acordo com a Figura 9 e como aqui descrito.

[00401] Em algumas modalidades, o processo da primeira expansão (incluindo processos aludidos como o pré-REP; por exemplo, a Etapa B de acordo com a Figura 9) é encurtado para 3 a 14 dias, como debatido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 7 a 14 dias, como debatido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4 e 5. Em algumas modalidades, a primeira expansão da Etapa B é encurtada para 10 a 14 dias, como debatido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4, 5 e 9. Em algumas modalidades, a primeira expansão é encurtada para 11 dias, como debatido nos Exemplos e mostrado nas Figuras 4, 5 e 9.

[00402] Em algumas modalidades, a primeira expansão, por exemplo, a Etapa B de acordo com a Figura 9, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é utilizado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um único biorreator é utilizado. Em algumas modalidades, o biorreator único utilizado é por exemplo um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

[00403] Em algumas modalidades, a primeira expansão é realizada usando um anticorpo agonista de 4-1BB adicional adicionado ao meio de

cultura de célula no começo da expansão, usando qualquer um dos anticorpos agonista de 4-1BB aqui descritos a seguir.

ETAPA C: Transição da Primeira Expansão para a Segunda Expansão

[00404] Em alguns casos, a população de TIL volumosa obtida a partir da primeira expansão, incluindo por exemplo a população de TIL obtida por exemplo, a partir da Etapa B como indicado na Figura 9, pode ser criopreservada imediatamente, usando os protocolos aqui debatidos abaixo. Alternativamente, a população de TIL obtida a partir da primeira expansão, aludida como a segunda população de TIL, pode ser submetida a uma segunda expansão (que pode incluir expansões algumas vezes aludidas como REP) e depois criopreservada como debatido abaixo. Similarmente, no caso onde TILs geneticamente modificados serão usadas em terapia, a primeira população de TIL (algumas vezes aludida como a população de TIL volumosa) ou a segunda população de TIL (que pode em algumas modalidades incluir populações aludidas como as populações de TIL REP) podem ser submetidas às modificações genéticas para tratamentos adequados antes da expansão ou depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

[00405] Em algumas modalidades, os TILs obtida a partir da primeira expansão (por exemplo, da etapa B como indicado na Figura 9) são armazenados até fenotipados para seleção. Em algumas modalidades, os TILs obtida a partir da primeira expansão (por exemplo, da etapa B como indicado na Figura 9) não são armazenados e prosseguem diretamente para a segunda expansão. Em algumas modalidades, os TILs obtida a partir da primeira expansão não são criopreservados depois da primeira expansão e antes da segunda expansão. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da

primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 3 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 4 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 4 dias a 10 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 7 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em cerca de 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre.

[00406] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre em 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 1 dia a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a primeira expansão de TIL pode prosseguir por 2 dias a 14 dias. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 3 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 4 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 5 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 6 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 7 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão

ocorre 8 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 9 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 10 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 11 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 12 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 13 dias a 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 14 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 1 dia a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 2 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 3 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 4 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 5 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 6 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 7 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 8 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre.

Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 9 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 10 dias a 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre. Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão ocorre 11 dias a partir de quando a fragmentação ocorre.

[00407] Em algumas modalidades, os TILs não são armazenados depois da primeira expansão e antes da segunda expansão e os TILs prosseguem diretamente para a segunda expansão (por exemplo, em algumas modalidades, não há nenhuma armazenagem durante a transição da etapa B para a etapa D como mostrado na Figura 9). Em algumas modalidades, a transição ocorre em sistema fechado, como aqui descrito. Em algumas modalidades, os TILs da primeira expansão, a segunda população de TILs, prosseguem diretamente dentro da segunda expansão sem nenhum período de transição.

[00408] Em algumas modalidades, a transição da primeira expansão para a segunda expansão, por exemplo, Etapa C de acordo com Figura 9, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é utilizado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um único biorreator é utilizado. Em algumas modalidades, o biorreator único utilizado é por exemplo um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

ETAPA D: Segunda Expansão

[00409] Em algumas modalidades, a população de célula TIL é expandida em número depois da colheita e processamento volumoso inicial por exemplo, depois da Etapa A e Etapa B e a transição aludida como Etapa C, como indicado na Figura 9). Esta expansão adicional é aqui aludida como a segunda expansão, que pode incluir processos de expansão geralmente

aludidos na técnica como um processo de expansão rápida (REP; assim como processos como indicado na etapa D da Figura 9). A segunda expansão é geralmente realizada usando um meio de cultura compreendendo vários componentes, incluindo células de alimentação, uma fonte de citocina e um anticorpo anti-CD3, em um recipiente permeável a gás.

[00410] Em algumas modalidades, a segunda expansão ou segunda expansão de TIL (que pode incluir expansões algumas vezes aludidas como REP; assim como processos como indicados na etapa D da Figura 9) de TIL podem ser realizadas usando qualquer frasco ou recipiente de TIL conhecidos por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias ou 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 7 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 8 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 9 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 10 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 11 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 12 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 13 dias a cerca de 14 dias. Em algumas modalidades, a segunda expansão de TIL pode prosseguir por cerca de 14 dias.

[00411] Em uma modalidade, a segunda expansão pode ser realizada em um recipiente permeável a gás usando os métodos da presente divulgação (incluindo por exemplo, expansões aludidas como REP; assim como processos como indicados na etapa D da Figura 9). Por exemplo, TILs podem ser rapidamente expandidos usando estimulação de receptor de célula T não

específico na presença de interleucina-2 (IL-2) ou interleucina-15 (IL-15). os estímulos de receptor de célula T não específico podem incluir, por exemplo, um anticorpo anti-CD3, tal como cerca de 30 ng/ml de OKT3, um anticorpo monoclonal anti-CD3 de camundongo (comercialmente disponível da Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA) ou UHCT-1 (comercialmente disponível da BioLegend, San Diego, CA, USA). TILs podem ser expandidos para induzir estimulação adicional dos TILs *in vitro* pela inclusão de um ou mais antígenos durante a segunda expansão, incluindo porções antigênicas dos mesmos, tais como epítipo(s), do câncer, que podem ser opcionalmente expressos a partir de um vetor, tal como um peptídeo de ligação de antígeno A2 de leucócito humano (HLA-A2), por exemplo, 0,3 µM de MART-1:26-35 (27 L) ou gpl 00:209-217 (210M), opcionalmente na presença de um fator de crescimento de célula T, tal como 300 IU/mL de IL-2 ou IL-15. Outros antígenos adequados podem incluir, por exemplo, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno canceroso de tirosinase, MAGE-A3, SSX-2 e VEGFR2 ou porções antigênicas dos mesmos. TIL também pode ser rapidamente expandido pela re-estimulação com o(s) mesmo(s) antígeno(s) do câncer pulsado(s) sobre células apresentando antígeno expressando HLA-A2. Alternativamente, os TILs podem ser adicionalmente re-estimulados com, por exemplo, linfócitos exemplares, irradiados, autólogos ou com linfócitos HLA-A2+ alogênicos irradiados e IL-2. Em algumas modalidades, a re-estimulação ocorre como parte da segunda expansão. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre na presença de linfócitos irradiados, autólogos ou com linfócitos alogênicos HLA-A2+ irradiados e IL-2.

[00412] Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente IL-2. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 3000 IU/mL de IL-2. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1000 IU/mL, cerca de 1500 IU/mL, cerca de 2000 IU/mL, cerca de 2500 IU/mL, cerca de 3000 IU/mL, cerca de

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

[00413] Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende anticorpo OKT3. O anticorpo OKT-3 pode estar presente no meio de cultura de célula começando no Dia 0 do REP (isto é, no dia de começo do REP) e/ou dia 0 da segunda expansão (isto é, o dia de começo da segunda expansão). Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 30 ng/mL de anticorpo OKT3. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende cerca de 0,1 ng/mL, cerca de 0,5 ng/mL, cerca de 1 ng/mL, cerca de 2,5 ng/mL, cerca de 5 ng/mL, cerca de 7,5 ng/mL, cerca de 10 ng/mL, cerca de 15 ng/mL, cerca de 20 ng/mL, cerca de 25 ng/mL, cerca de 30 ng/mL, cerca de 35 ng/mL, cerca de 40 ng/mL, cerca de 50 ng/mL, cerca de 60 ng/mL, cerca de 70 ng/mL, cerca de 80 ng/mL, cerca de 90 ng/mL, cerca de 100 ng/mL, cerca de 200 ng/mL, cerca de 500 ng/mL e cerca de 1 µg/mL de anticorpo OKT3. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende entre 0,1 ng/mL e 1 ng/mL, entre 1 ng/mL e 5 ng/mL, entre 5 ng/mL e 10 ng/mL, entre 10 ng/mL e 20 ng/mL, entre 20 ng/mL e 30 ng/mL, entre 30 ng/mL e 40 ng/mL, entre 40 ng/mL e 50 ng/mL e entre 50 ng/mL e 100 ng/mL de anticorpo OKT3. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula não compreende o anticorpo OKT-3.

[00414] Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 é utilizada como uma combinação durante a segunda expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-7, IL-15 e/ou IL-21 assim como quaisquer combinações dos mesmos podem ser incluídas durante a segunda expansão,

incluindo por exemplo durante um dos processos da Etapa D de acordo com a Figura 9, assim como aqui descrito. Em algumas modalidades, uma combinação de IL-2, IL-15 e IL-21 é utilizada como uma combinação durante a segunda expansão. Em algumas modalidades, IL-2, IL-15 e IL-21 assim como quaisquer combinações das mesmas podem ser incluídas durante os processos da Etapa D de acordo com a Figura 9 e como aqui descrito.

[00415] Em algumas modalidades, a segunda expansão pode ser conduzida em um meio de cultura de célula suplementado compreendendo IL-2, OKT-3 e células de alimentação apresentando antígeno. Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura de célula suplementado. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula suplementado compreende IL-2, OKT-3 e células de alimentação apresentando antígeno. Em algumas modalidades, o segundo meio de cultura de célula compreende IL-2, OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs; também aludidas como células de alimentação apresentando antígeno). Em algumas modalidades, a segunda expansão ocorre em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2, OKT-3 e células de alimentação apresentando antígeno (isto é, células apresentando antígeno).

[00416] Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 500 IU/mL de IL-15, cerca de 400 IU/mL de IL-15, cerca de 300 IU/mL de IL-15, cerca de 200 IU/mL de IL-15, cerca de 180 IU/mL de IL-15, cerca de 160 IU/mL de IL-15, cerca de 140 IU/mL de IL-15, cerca de 120 IU/mL de IL-15 ou cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 500 IU/mL de IL-15 a cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 400 IU/mL de IL-15 a cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 300 IU/mL de IL-15 a cerca de 100 IU/mL de IL-15. Em algumas

modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 200 IU/mL de IL-15. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 180 IU/mL de IL-15. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente IL-15. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 180 IU/mL de IL-15.

[00417] Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 20 IU/mL de IL-21, cerca de 15 IU/mL de IL-21, cerca de 12 IU/mL de IL-21, cerca de 10 IU/mL de IL-21, cerca de 5 IU/mL de IL-21, cerca de 4 IU/mL de IL-21, cerca de 3 IU/mL de IL-21, cerca de 2 IU/mL de IL-21, cerca de 1 IU/mL de IL-21 ou cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 20 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 15 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 12 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 10 IU/mL de IL-21 a cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 5 IU/mL de IL-21 a cerca de 1 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão compreende cerca de 2 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1 IU/mL de IL-21. Em algumas modalidades, o meio de cultura de célula compreende cerca de 0,5 IU/mL de IL-21. Em uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente IL-21. Em uma modalidade preferida, o meio de cultura de célula compreende cerca de 1 IU/mL de IL-21.

[00418] Em algumas modalidades as células de alimentação apresentando antígeno (APCs) são PBMCs. Em uma modalidade, a razão de

TILs para PBMCs e/ou células apresentando antígeno na expansão rápida e/ou na segunda expansão é de cerca de 1 para 25, cerca de 1 para 50, cerca de 1 para 100, cerca de 1 para 125, cerca de 1 para 150, cerca de 1 para 175, cerca de 1 para 200, cerca de 1 para 225, cerca de 1 para 250, cerca de 1 para 275, cerca de 1 para 300, cerca de 1 para 325, cerca de 1 para 350, cerca de 1 para 375, cerca de 1 para 400 ou cerca de 1 para 500. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 para 50 e 1 para 300. Em uma modalidade, a razão de TILs para PBMCs na expansão rápida e/ou na segunda expansão está entre 1 para 100 e 1 para 200.

[00419] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão é realizada em frascos com os TILs volumosos sendo misturados com um excesso de 100 ou 200 vezes de células de alimentação inativadas, 30 mg/mL de anticorpo anti-CD3 OKT3 e 3000 IU/mL de IL-2 em 150 ml de meios. A substituição de meios é feita (geralmente substituição de 2/3 dos meios por intermédio de respiração com meios frescos) até que as células sejam transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. As câmaras de crescimento alternativas incluem frascos G-REX e recipiente permeável a gás como mais completamente debatido abaixo.

[00420] Em algumas modalidades, a segunda expansão (que pode incluir processos aludidos como o processo REP) é encurtada para 7 a 14 dias, como debatido nos exemplos e figuras. Em algumas modalidades, a segunda expansão é encurtada para 11 dias.

[00421] Em uma modalidade, REP e/ou a segunda expansão pode ser realizado usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gás como previamente descrito (Tran, *et al.*, *J. Immunother.* 2008, 31, 742-51; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* 2003, 26, 332-42) ou vidraria de cultura permeável a gás (frascos G-Rex). Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo expansões aludidas como expansões rápidas) é realizada em frascos T-175 e

cerca de 1×10^6 TILs colocados em suspensão em 150 mL de meios podem ser adicionados a cada T-175 frasco. Os TILs podem ser cultivados em uma mistura 1 para 1 de CM e meio AIM-V, suplementado com 3000 IU por mL de IL-2 e 30 ng por mL de anti-CD3. Os frascos T-175 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO₂. Metade dos meios pode ser trocada no Dia 5 usando meio 50/50 com 3000 IU por mL de IL-2. Em algumas modalidades, no Dia 7 as células de dois frascos T-175 podem ser combinadas em uma bolsa de 3 L e 300 mL de AIM V com 5% de soro AB humano e 3000 IU por mL de IL-2 foram adicionados aos 300 mL de suspensão de TIL. O número de células em cada bolsa foi contado a cada dia ou dois e meios frescos foram adicionados para manter a contagem de célula entre 0,5 e $2,0 \times 10^6$ células/mL.

[00422] Em uma modalidade, a segunda expansão (que pode incluir expansões aludidas como REP, assim como aquelas aludidas na etapa D da Figura 9) pode ser realizado em frascos permeáveis a gás com capacidade de 500 mL com 100 cm de fundos de silício permeáveis a gás (G-Rex 100, comercialmente disponível da Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), 5×10^6 ou 10×10^6 TILs podem ser cultivados com PBMCs em 400 mL de meio 50/50, suplementado com 5% de soro AB humano, 3000 IU por mL de IL-2 e 30 ng por mL de anti-CD3 (OKT3). Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO₂. No Dia 5, 250 mL de sobrenadante podem ser removidos e colocados dentro de garrafas centrífugas e centrifugadas a 1500 rpm (491×g) por 10 minutos. Os grânulos de TIL podem ser recolocados em suspensão com 150 mL de meio fresco com 5% de soro AB humano, 3000 IU por mL de IL-2 e adicionados de volta para os frascos G-Rex 100 originais. Quando TIL são expandidos em série em frascos G-Rex 100, no Dia 7 os TILs em cada G-Rex 100 podem ser colocados em suspensão nos 300 mL de meios presentes em cada frasco e a suspensão de célula pode ser dividida em 3 alíquotas de 100 mL que podem ser usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Depois 150 mL de AIM-V com

5% de soro AB humano e 3000 IU por mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 podem ser incubados a 37°C em 5% de CO₂ e depois de 4 dias 150 mL de AIM-V com 3000 IU por mL de IL-2 podem ser adicionados a cada frasco G-REX 100. As células podem ser colhidas no Dia 14 da cultura.

[00423] Em uma modalidade, a segunda expansão (incluindo expansões aludidas como REP) é realizada em frascos com os TILs volumosos sendo misturados com um excesso de 100 ou 200 vezes de células de alimentação inativadas, 30 mg/mL de anticorpo anti-CD3 OKT3 e 3000 IU/mL de IL-2 em 150 ml de meios. Em algumas modalidades, a substituição dos meios é feita até que as células sejam transferidas para uma câmara de crescimento alternativa. Em algumas modalidades, 2/3 dos meios são recolocados pela respiração com meios frescos. Em algumas modalidades, as câmaras de crescimento alternativas incluem frascos G-REX e recipientes permeáveis a gás como mais completamente debatido abaixo.

[00424] Em uma modalidade, a segunda expansão (incluindo expansões aludidas como REP) é realizada e compreende adicionalmente uma etapa em que TILs são selecionados quanto à reatividade tumoral superior. Qualquer método de seleção conhecido na técnica pode ser usado. Por exemplo, os métodos descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2016/0010058 A1, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência, podem ser usadas para a seleção de TILs quanto à reatividade tumoral superior.

[00425] Opcionalmente, um ensaio de viabilidade de célula pode ser realizado depois da segunda expansão (incluindo expansões aludidas como a expansão de REP), usando ensaios padrão conhecidos na técnica. Por exemplo, um ensaio de exclusão de azul de tripano pode ser feito sobre uma amostra dos TILs volumosos, que seletivamente rotula células mortas e permite uma avaliação de viabilidade. Em algumas modalidades, as amostras

de TIL podem ser contadas e a viabilidade determinada usando um contador de célula automatizado Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Em algumas modalidades, a viabilidade é determinada de acordo com o protocolo do Contador de Célula Automático Cellometer K2 Image Cytometer descrito, por exemplo, no Exemplo 15.

[00426] Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo expansões aludidas como REP) de TIL pode ser realizado usando frascos T-175 e bolsas permeáveis a gás como anteriormente descrito (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, *et al.*, 2008, *J Immunother.*, 31: 742–751 e Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, *et al.* 2003, *J Immunother.*, 26: 332–342) ou frascos G-Rex permeáveis a gás. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando frascos. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada usando frascos permeáveis a gás G-Rex. Em algumas modalidades, a segunda expansão é realizada em frascos T-175 e cerca de 1×10^6 TIL são colocados em suspensão em cerca de 150 mL de meios e isto é adicionado a cada frasco T-175. Os TILs são cultivados com PBMC irradiadas (50 Gy) alogênicas como células “de alimentação” em uma razão de 1 a 100 e as células foram cultivadas em uma mistura 1 para 1 de CM e meio AIM-V (meio 50/50), suplementado com 3000 IU/mL de IL-2 e 30 ng/mL de anti-CD3. Os frascos T-175 são incubados a 37°C em 5% de CO₂. Em algumas modalidades, metade dos meios é trocada no Dia 5 usando meio 50/50 com 3000 IU/mL de IL-2. Em algumas modalidades, no Dia 7, células de 2 frascos T-175 são combinadas em uma bolsa de 3 L e 300 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU/mL de IL-2 são adicionados aos 300 mL de suspensão de TIL. O número de células em cada bolsa pode ser contado a cada dia ou dois e meios frescos podem ser adicionados para manter a contagem de célula entre cerca de 0,5 e cerca de $2,0 \times 10^6$ células/mL.

[00427] Em algumas modalidades, a segunda expansão (incluindo

expansões aludidas como REP) são realizadas em frascos com capacidade de 500 mL com 100 cm² de fundos de silício permeáveis a gás (G-Rex 100, Wilson Wolf) (Fig. 1), cerca de 5x10⁶ ou 10x10⁶ TILs são cultivados com PBMC irradiada alogênica em uma razão de 1 para 100 em 400 mL de meio 50/50, suplementado com 3000 IU/mL de IL-2 e 30 ng/ mL de anti-CD3. Os frascos G-Rex 100 são incubados a 37°C em 5% de CO₂. Em algumas modalidades, no Dia 5, 250 mL de sobrenadante são removidos e colocados dentro de garrafas centrífugas e centrifugados a 1500 rpm (491g) por 10 minutos. Os grânulos de TIL podem ser depois recolocados em suspensão com 150 mL de meio 50/50 fresco com 3000 IU/ mL de IL-2 e adicionados de volta para os frascos G-Rex 100 originais. Nas modalidades onde TILs são expandidos em série em frascos G-Rex 100, no Dia 7 os TILs em cada G-Rex 100 são colocados em suspensão nos 300 mL de meios presentes em cada frasco e a suspensão de célula foi dividida em três alíquotas de 100 mL que são usadas para semear 3 frascos G-Rex 100. Depois 150 mL de AIM-V com 5% de soro AB humano e 3000 IU/mL de IL-2 são adicionadas a cada frasco. Os frascos G-Rex 100 são incubados a 37°C em 5% de CO₂ e depois de 4 dias 150 mL de AIM-V com 3000 IU/mL de IL-2 são adicionadas a cada frasco G-Rex 100. As células são colhidas no Dia 14 da cultura.

[00428] Os diversos receptores de antígeno de linfócitos T e B são produzidos pela recombinação somática de um número limitado, porém grande de segmentos de gene. Estes segmentos de gene: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante), determinam a especificidade de ligação e as aplicações a jusante de imunoglobulinas e receptores de célula T (TCRs). A presente invenção provê um método para gerar TILs que exibem e aumentam a diversidade de repertório de célula T. Em algumas modalidades, os TILs obtida pelo presente método exibem um aumento na diversidade de repertório de célula T. Em algumas modalidades, os TILs obtida na segunda expansão exibem um aumento na diversidade de repertório de célula T. Em

algumas modalidades, o aumento na diversidade é um aumento na diversidade de imunoglobulina e/ou a diversidade de receptor célula T. Em algumas modalidades, a diversidade da imunoglobulina está na cadeia pesada da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade da imunoglobulina está na cadeia leve da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a diversidade está no receptor de célula T. Em algumas modalidades, a diversidade está em um dos receptores de célula T selecionados do grupo consistindo em receptores alfa, beta, gama e delta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de célula T (TCR) alfa e/ou beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de célula T (TCR) alfa. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão do receptor de célula T (TCR) beta. Em algumas modalidades, há um aumento na expressão de TCRab (isto é, $\text{TCR}\alpha/\beta$).

[00429] Em algumas modalidades, o meio de cultura da segunda expansão (por exemplo, algumas vezes aludido como CM2 ou o segundo meio de cultura de célula), compreende IL-2, OKT-3, assim como as células de alimentação apresentando antígeno (APCs), como debatido em mais detalhes abaixo.

[00430] Em algumas modalidades, a segunda expansão, por exemplo, a Etapa D de acordo com a Figura 9, é realizada em um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é utilizado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um biorreator único é utilizado. Em algumas modalidades, o biorreator único utilizado é por exemplo um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

1. Células De alimentação e Células Apresentadoras de Antígeno

[00431] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descritos (por exemplo incluindo expansão tal como aquelas descritas na etapa D da Figura 9, assim como aquelas aludidas como REP) requerem um

excesso de células de alimentação durante a expansão de REP de TIL e/ou durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células de alimentação são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtida a partir de unidades de sangue integral padrão a partir de doadores de sangue saudáveis. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação de gradiente Ficoll-Paque.

[00432] No geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por intermédio de irradiação ou tratamento térmico e usadas nos procedimentos de REP, como descrito nos exemplos, em particular no exemplo 14, que provê um protocolo exemplar para avaliar a incompetência de replicação das PBMCs alogênicas irradiadas.

[00433] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes de replicação e aceitas para o uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis no Dia 14 for menor do que o número inicial de células viáveis colocada em cultura no Dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (isto é, o dia de começo da segunda expansão). Ver, por exemplo, o Exemplo 14.

[00434] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes de replicação e aceitas para o uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis, cultivadas na presença de OKT3 e IL-2, no Dia 7 e dia 14 não aumentou a partir do número inicial de células viáveis colocadas em cultura no Dia 0 do REP e/ou dia 0 da segunda expansão (isto é, o dia de começo da segunda expansão). Em algumas modalidades, as PBMCs são cultivadas na presença de 30 ng/ml de anticorpo OKT3 e 3000 IU/ml de IL-2. Ver, por exemplo, o Exemplo 13.

[00435] Em algumas modalidades, as PBMCs são consideradas incompetentes de replicação e aceitas para o uso nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos se o número total de células viáveis,

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

[00436] Em algumas modalidades, as células de alimentação apresentando antígeno são PBMCs. Em algumas modalidades, as células de alimentação apresentando antígeno são células de alimentação apresentando antígeno artificial. Em uma modalidade, a razão de TILs para células de alimentação apresentando antígeno na segunda expansão é de cerca de 1 para 25, cerca de 1 para 50, cerca de 1 para 100, cerca de 1 para 125, cerca de 1 para 150, cerca de 1 para 175, cerca de 1 para 200, cerca de 1 para 225, cerca de 1 para 250, cerca de 1 para 275, cerca de 1 para 300, cerca de 1 para 325, cerca de 1 para 350, cerca de 1 para 375, cerca de 1 para 400 ou cerca de 1 para 500. Em uma modalidade, a razão de TILs para células de alimentação apresentando antígeno na segunda expansão está entre 1 para 50 e 1 para 300. Em uma modalidade, a razão de TILs para células de alimentação apresentando antígeno na segunda expansão está entre 1 para 100 e 1 para 200.

[00437] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descritos requerem uma razão de cerca de $2,5 \times 10^9$ células de alimentação para cerca de 100×10^6 TILs. Em uma outra modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descritos requerem uma razão de cerca de $2,5 \times 10^9$

células de alimentação para cerca de 50×10^6 TILs. Ainda em uma outra modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descritos requerem cerca de $2,5 \times 10^9$ células de alimentação para cerca de 25×10^6 TILs.

[00438] Em uma modalidade, os procedimentos da segunda expansão aqui descritos requerem um excesso de células de alimentação durante a segunda expansão. Em muitas modalidades, as células de alimentação são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtida a partir de unidades de sangue integral padrão a partir de doadores de sangue saudáveis. As PBMCs são obtidas usando métodos padrão tais como separação de gradiente Ficoll-Paque. Em uma modalidade, as células apresentando antígeno artificiais (aAPC) são usadas no lugar das PBMCs.

[00439] No geral, as PBMCs alogênicas são inativadas, por intermédio de irradiação ou tratamento térmico e usadas nos procedimentos de expansão de TIL aqui descritos, incluindo os procedimentos exemplares descritos nas Figuras 4, 5 e 9.

[00440] Em uma modalidade, as células apresentando antígeno artificiais são usadas na segunda expansão como uma substituição para, ou em combinação com, as PBMCs.

2. Citocinas

[00441] Os métodos de expansão aqui descritos geralmente usam meio de cultura com altas doses de uma citocina, em particular IL-2, como é conhecido na técnica.

[00442] Alternativamente, usando combinações de citocinas para a expansão rápida e ou segunda expansão de TILS é adicionalmente possível, com combinações de duas ou mais de IL-2, IL-15 e IL-21 como é geralmente resumido na Publicação Internacional No. WO 2015/189356 e Publicação Internacional No. WO 2015/189357, por meio deste expressamente incorporada por referência em sua totalidade. Assim, as combinações possíveis incluem IL-2 e IL-15, IL-2 e IL-21, IL-15 e IL-21 e IL-2, IL-15 e

IL-21, com a última encontrando uso particular em muitas modalidades. O uso de combinações de citocinas especificamente favorece a geração de linfócitos e em particular células T como aqui descritas.

3. Anticorpos Anti-CD3

[00443] Em algumas modalidades, o meio de cultura usada nos métodos de expansão aqui descritos (incluindo aqueles aludidos como REP, ver por exemplo, Figura 9) também inclui um anticorpo anti-CD3. Um anticorpo anti-CD3 em combinação com IL-2 induz a ativação de célula T e a divisão celular na população de TIL. Este efeito pode ser observado com anticorpos de comprimento total assim como fragmentos Fab e F(ab')₂, com os primeiros sendo geralmente preferidos; ver, por exemplo, Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* 1985, 135, 1719, por meio deste incorporado por referência na sua totalidade.

[00444] Como será avaliado por aqueles na técnica, existem vários anticorpos anti-CD3 humano adequados que encontram uso na invenção, incluindo anticorpos anti-CD3 humano policlonais e monoclonais de vários mamíferos, incluindo, mas não limitados a anticorpos de murino, ser humano, primata, rato e caninos. Em modalidades particulares, o anticorpo anti-CD3 OKT3 é usada (comercialmente disponível da Ortho-McNeil, Raritan, NJ ou Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

[00445] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD3, tal como OKT3, pode ser adicionado à cultura de TIL 2 dias, 3 dias, 4 dias ou 5 dias antes de uma etapa de eletroporação. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD3, tal como OKT3, pode ser adicionado imediatamente antes de uma etapa de eletroporação. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD3, tal como OKT3, pode ser adicionado imediatamente depois de uma etapa de eletroporação. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD3, tal como OKT3, pode ser adicionado 2 dias, 3 dias, 4 dias ou 5 dias depois de uma etapa de eletroporação.

4. Agonistas de 4-1BB e OX40

[00446] De acordo com uma modalidade, o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB (CD137) e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas. A edição de gene pode ser realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 forem inseridos dentro do meio de cultura de célula. Alternativamente, a edição de gene pode ser realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 sejam inseridos dentro do meio de cultura de célula.

[00447] O agonista de 4-1BB pode ser qualquer molécula de ligação de 4-1BB conhecida na técnica. A molécula de ligação de 4-1BB pode ser um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão capaz de ligar ao 4-1BB humano ou de mamífero. Os agonistas de 4-1BB ou moléculas de ligação de 4-1BB podem compreender uma cadeia pesada da imunoglobulina de qualquer isótipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. O agonista de 4-1BB ou molécula de ligação de 4-1BB podem ter tanto uma cadeia pesada quanto uma leve. Como aqui usada, o termo molécula de ligação também inclui anticorpos (incluindo anticorpos de comprimento total), anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos e fragmentos de anticorpo, por exemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, fragmentos de ligação de epítipo de qualquer um dos acima e formas engenheiradas de anticorpos, por exemplo, moléculas scFv, que se ligam ao 4-1BB. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de ligação de antígeno que é um anticorpo completamente humano. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de ligação

de antígeno que é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, os agonistas de 4-1BB para o uso nos métodos e composições presentemente divulgados incluem anticorpos anti-4-1BB, anticorpos anti-4-1BB de ser humano, anticorpos anti-4-1BB de camundongo, anticorpos anti-4-1BB de mamíferos, anticorpos anti-4-1BB monoclonais, anticorpos anti-4-1BB policlonais, anticorpos anti-4-1BB quiméricos, adnectinas anti-4-1BB, anticorpos de domínio anti-4-1BB, fragmentos anti-4-1BB de cadeia única, fragmentos anti-4-1BB de cadeia pesada, fragmentos anti-4-1BB de cadeia leve, proteínas de fusão anti-4-1BB e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos. Anticorpos anti-4-1BB agonísticos são conhecidos induzir respostas imunes fortes. Lee, *et al.*, *PLOS A* 2013, 8, e69677. Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é um anticorpo anti-4-1BB agonístico humanizado ou completamente humano monoclonal (isto é, um anticorpo derivado de uma única linhagem de célula). Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), utomilumab ou urelumab ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar dos mesmos. Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é utomilumab ou urelumab ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar dos mesmos.

[00448] Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB ou molécula de ligação de 4-1BB também podem ser uma proteína de fusão. Em uma modalidade preferida, um agonista de 4-1BB multimérico, tal como um agonista de 4-1BB trimérico ou hexamérico (com três ou seis domínios de ligação de ligante), pode induzir a formação de agrupamento de receptor (4-1BBL) e complexo de sinalização celular interno superior comparado a um anticorpo monoclonal agonístico, que tipicamente possui dois domínios de ligação de ligante. Proteínas de fusão triméricas (trivalentes) ou hexaméricas (ou hexavalentes) ou maiores compreendendo três domínios de ligação de TNFRSF e IgG1-Fc e opcionalmente ligando adicionalmente duas ou mais

destas proteínas de fusão são descritas, por exemplo, em Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* 2013, 12, 2735-47.

[00449] Os anticorpos 4-1BB agonísticos e proteínas de fusão são conhecidos induzir respostas imunes fortes. Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão que se liga especificamente ao antígeno 4-1BB em uma maneira suficiente para reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo 4-1BB agonístico monoclonal ou proteína de fusão que anula a toxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), por exemplo citotoxicidade de célula NK. Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo 4-1BB agonístico monoclonal ou proteína de fusão que anula a fagocitose de célula dependente de anticorpo (ADCP). Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo 4-1BB agonístico monoclonal ou proteína de fusão que anula a citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Em algumas modalidades, o agonista de 4-1BB é um anticorpo 4-1BB agonístico monoclonal ou proteína de fusão que anula a funcionalidade da região Fc.

[00450] Em algumas modalidades, os agonistas de 4-1BB são distinguidos pela ligação ao 4-1BB humano (SEQ ID NO: 9) com afinidade e atividade agonística altas. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma molécula de ligação que se liga ao 4-1BB humano (SEQ ID NO: 9). Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma molécula de ligação que se liga ao 4-1BB de murino (SEQ ID NO: 10). As sequências de aminoácido do antígeno de 4-1BB às quais um agonista de 4-1BB ou molécula de ligação se ligam estão resumidas na Tabela 3.

TABELA 3. Sequências de aminoácido de antígenos de 4-1BB.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 9 4-1BB humano, Superfamília do receptor do fator de necrose de tumor, membro 9 (<i>Homo sapiens</i>)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO: 10 4-1BB de murino, Superfamília do receptor do fator de necrose de tumor, membro 9 (<i>Mus musculus</i>)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRV CAGY FRFKKFCSS HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGPG 180 GHSLQVLTFL LALTSALLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

[00451] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que liga 4-1BB humano ou de murino com um K_D de cerca de 100 pM ou mais baixo, liga 4-1BB de ser humano ou de murino com um K_D de cerca de 90 pM ou mais baixo, liga 4-1BB de ser humano ou de murino com um K_D de cerca de 80 pM ou mais baixo, liga 4-1BB de ser humano ou de murino com um K_D de cerca de 70 pM ou mais baixo, liga 4-1BB de ser humano ou de murino com um K_D de cerca de 60 pM ou mais baixo, liga 4-1BB de ser humano ou de murino com um K_D de cerca de 50 pM ou mais baixo, liga 4-1BB de ser humano ou de murino com um K_D de cerca de 40 pM ou mais baixo ou liga 4-1BB de ser humano ou de murino com um K_D de cerca de 30 pM ou mais baixo.

[00452] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{assoc} de cerca de 8×10^5 1/M·s ou mais rápido, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{assoc} de cerca de $8,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{assoc} de cerca de 9×10^5 1/M·s ou mais rápido, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de

murino com um k_{assoc} de cerca de $9,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido ou se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{assoc} de cerca de 1×10^6 1/M·s ou mais rápido.

[00453] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de 2×10^{-5} 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um k_{dissoc} de cerca de 3×10^{-5} 1/s ou mais lento.

[00454] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de 4-1BB que se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 10 nM ou mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 9 nM ou mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 8 nM ou mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 7 nM ou mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 6 nM ou mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 5 nM ou

mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 4 nM ou mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 3 nM ou mais baixo, se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 2 nM ou mais baixo ou se liga ao 4-1BB de ser humano ou de murino com um IC_{50} de cerca de 1 nM ou mais baixo.

[00455] Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é utomilumab, também conhecido como PF-05082566 ou MOR-7480 ou um fragmento, derivado, variante ou bioessimililar dos mesmos. Utomilumab está disponível da Pfizer, Inc. Utomilumab é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina G2-lambda, anti-[TNFRSF9 (superfamília do receptor do fator de necrose de tumor (TNFR) membro 9 de *Homo sapiens*, 4-1BB, antígeno ILA de célula T, CD137)], *Homo sapiens* (completamente humano). As sequências de aminoácido de utomilumab são apresentadas na Tabela 4. Utomilumab compreende sítios de glicosilação em Asn59 e Asn292; pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia pesada nas posições 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) e 362-420 (C_H3); pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia leve nas posições 22'-87' (V_H-V_L) e 136'-195' (C_H1-C_L); pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia pesada-cadeia pesada nas posições da isoforma IgG2A 218-218, 219-219, 222-222 e 225-225, nas posições da isoforma IgG2A/B 218-130, 219-219, 222-222 e 225-225 e nas posições da isoforma IgG2B 219-130 (2), 222-222 e 225-225; e pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia pesada-cadeia leve nas posições da isoforma IgG2A 130-213' (2), posições da isoforma IgG2A/B 218-213' e 130-213' e nas posições da isoforma IgG2B 218-213' (2). A preparação e propriedades de utomilumab e suas variantes e fragmentos são descritas nas Patentes U.S. Nos. 8.821.867, 8.337.850 e 9.468.678 e Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 2012/032433 A1, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência. As características pré-clínicas de

utomilumab são descritas em Fisher, *et al.*, *Cancer Immunolog. & Immunother.* 2012, 61, 1721-33. Os testes clínicos correntes de utomilumab em uma variedade de indicações de tumor hematológico e sólido incluem U.S. National Institutes of Health clinicaltrials.gov identificadores NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 e NCT02554812.

[00456] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 11 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 12. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve tendo as sequências mostradas nas SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente ou fragmentos de ligação de antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente.

[00457] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de utomilumab. Em uma modalidade, a região variável de cadeia pesada (V_H) do agonista de 4-

1BB compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 13 e a região variável de cadeia leve (V_L) do agonista de 4-1BB compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 14 e substituições conservativas de aminoácido dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende um scFv anticorpo compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14.

[00458] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 e SEQ ID NO: 17, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos e domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 20, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos.

[00459] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal agonista de 4-1BB bioessimililar aprovado pelas autoridades

reguladoras de fármaco com referência ao utomilumab. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal biossimilar compreende um anticorpo de 4-1BB compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97% identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, à sequência de aminoácido de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumab. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-traducionais são selecionadas de uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncagem. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de 4-1BB autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de 4-1BB é provido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumab. O anticorpo agonista de 4-1BB pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármaco tal como o U.S. FDA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumab. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é utomilumab.

TABELA 4. Sequências de aminoácido para agonistas de anticorpo de 4-1BB relacionados ao utomilumab.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 11 cadeia pesada para utomilumab	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
SEQ ID NO: 12 cadeia leve para utomilumab	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSVERLQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSIL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
SEQ ID NO: 13 região variável de cadeia pesada para utomilumab	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA ILQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO: 14 região variável de cadeia leve para utomilumab	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
SEQ ID NO: 15 CDR1 de cadeia pesada para utomilumab	STYWIS 6
SEQ ID NO: 16 CDR2 de cadeia pesada para utomilumab	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
SEQ ID NO: 17 CDR3 de cadeia pesada para utomilumab	RGYGIFDY 8
SEQ ID NO: 18 CDR1 de cadeia leve para utomilumab	SGDNIGDQYA H 11
SEQ ID NO: 19 CDR2 de cadeia leve para utomilumab	QDKNRPS 7
SEQ ID NO: 20 CDR3 de cadeia leve para utomilumab	ATYTGFGSLA V 11

[00460] Em uma modalidade preferida, o agonista de 4-1BB é o

anticorpo monoclonal urelumab, também conhecido como BMS-663513 e 20H4,9.h4a ou um fragmento, derivado, variante ou bioessimililar do mesmo. Urelumab está disponível da Bristol-Myers Squibb, Inc. e Creative Biolabs, Inc. Urelumab é uma imunoglobulina G4-capa, anti-[TNFRSF9 de *Homo sapiens* (superfamília do receptor do fator de necrose de tumor membro 9, 4-1BB, célula T antígeno ILA, CD137)], anticorpo monoclonal de *Homo sapiens* (completamente humano). As seqüências de aminoácido de urelumab são apresentadas na Tabela 5. Urelumab compreende sítios de N-glicosilação nas posições 298 (e 298''); pontes de dissulfeto intracadeia de cadeia pesada nas posições 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_{H1}-C_L), 262-322 (C_{H2}) e 368-426 (C_{H3}) (e nas posições 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' e 368''-426''); pontes de dissulfeto intracadeia de cadeia leve nas posições 23'-88' (V_H-V_L) e 136'-196' (C_{H1}-C_L) (e nas posições 23'''-88''' e 136'''-196'''); pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia pesada-cadeia pesada nas posições 227-227'' e 230-230''; e pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia pesada-cadeia leve em 135-216' e 135''-216''' e 135'''-216'''. A preparação e propriedades de urelumab e suas variantes e fragmentos são descritas nas Patentes U.S. Nos. 7.288.638 e 8.962.804, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As características pré-clínicas e clínicas de urelumab são descritas em Segal, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2016, disponível em <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>. Os testes clínicos correntes de urelumab em uma variedade de indicações de tumores hematológicos e sólidos incluem U.S. National Institutes of Health clinicaltrials.gov identificadores NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 e NCT01471210.

[00461] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 21 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 22. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve tendo as seqüências mostradas nas SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 22, respectivamente ou fragmentos de ligação de antígeno, fragmentos

Fab, fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 22, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 21 e SEQ ID NO: 22, respectivamente.

[00462] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de urelumab. Em uma modalidade, a região variável de cadeia pesada (V_H) do agonista de 4-1BB compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 23 e a região variável de cadeia leve (V_L) do agonista de 4-1BB compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 24 e substituições conservativa de aminoácido das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 23 e SEQ ID NO: 24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 23 e SEQ ID NO: 24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 97% idênticas

às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 23 e SEQ ID NO: 24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 23 e SEQ ID NO: 24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 23 e SEQ ID NO: 24, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende um anticorpo scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 23 e SEQ ID NO: 24.

[00463] Em uma modalidade, um agonista de 4-1BB compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 27, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido das mesmas e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido das mesmas.

[00464] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um anticorpo monoclonal bioessimilare agonista de 4-1BB aprovado pelas autoridades reguladoras de fármaco com referência ao urelumab. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal bioessimilare compreende um anticorpo de 4-1BB compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é urelumab. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-traducionais são

selecionadas de uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncagem. Em algumas modalidades, o biossimilar é um anticorpo agonista de 4-1BB autorizado ou submetido para autorização, em que o anticorpo agonista de 4-1BB é provido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é urelumab. O anticorpo agonista de 4-1BB pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármaco tal como o U.S. FDA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é urelumab. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é urelumab.

TABELA 5. Sequências de aminoácido para agonistas de anticorpo de 4-1BB relacionados ao urelumab.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 21 cadeia pesada para urelumab	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60
	PSLESRV TIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120
	SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180
	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNV DHPK SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240
	VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300
	YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360
	KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420
	GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLKG 448

SEQ ID NO: 22 cadeia leve para urelumab	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SILAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST 180 LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO: 23 cadeia pesada variável para urelumab	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO: 24 cadeia leve variável para urelumab	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SILAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO: 25 CDR1 de cadeia pesada para urelumab	GYYS 5
SEQ ID NO: 26 CDR2 de cadeia pesada para urelumab	EINHHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO: 27 CDR3 de cadeia pesada para urelumab	DYGPNGYDWY FDL 13
SEQ ID NO: 28 CDR1 de cadeia leve para urelumab	RASQSVSSIL A 11
SEQ ID NO: 29 CDR2 de cadeia leve para urelumab	DASNRAT 7
SEQ ID NO: 30 CDR3 de cadeia leve para urelumab	QQRSDWPPAL T 11

[00465] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é selecionado do grupo consistindo em 1D8, 3E1or, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), o anticorpo produzido pela linhagem de célula depositada como ATCC No. HB-11248 e divulgada na Patente U.S. No. 6.974.863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), anticorpos divulgados na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2005/0095244, anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 7.288.638 (tal como 20H4.9-IgG1 (BMS-663031)), anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.887.673 (tal como 4E9 ou BMS-554271), anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 7.214.493, anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.303.121, anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.569.997, anticorpos

divulgados na Patente U.S. No. 6.905.685 (tal como 4E9 ou BMS-554271), anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.362.325 (tal como 1D8 ou BMS-469492; 3H3 ou BMS-469497; ou 3E1), anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.974.863 (tal como 53A2); anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.210.669 (tal como 1D8, 3B8 ou 3E1), anticorpos descritos na Patente U.S. No. 5.928.893, anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.303.121, anticorpos divulgados na Patente U.S. No. 6.569.997, anticorpos divulgados na Publicação de Pedido de Patente Internacional Nos. WO 2012/177788, WO 2015/119923 e WO 2010/042433 e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos, em que a divulgação de cada uma das patentes ou publicações de pedido de patente anteriores é aqui incorporada por referência.

[00466] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de fusão agonística de 4-1BB descrita nas Publicações de Pedido de Patente Internacional Nos. WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1 e WO 2010/078966 A1; Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 e US 2015/0126710 A1; e Patentes U.S. Nos. 9.359.420, 9.340.599, 8.921.519 e 8.450.460, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência.

[00467] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é uma proteína de fusão agonística de 4-1BB como representada na Estrutura I-A (proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal C) ou Estrutura I-B (proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal N) da Figura 22 ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar das mesmas.

[00468] Na Estruturas I-A e I-B da Figura 22, os cilindros se referem aos domínios de ligação de polipeptídeo individuais. As estruturas I-A e I-B compreendem três domínios de ligação linearmente ligados a TNFRSF derivados por exemplo, de 4-1BBL ou um anticorpo que liga 4-1BB, que se

dobra para formar uma proteína trivalente, que é depois ligada a uma segunda proteína trivalente através de IgG1-Fc (incluindo os domínios C_H3 e C_H2) é depois usada para unir duas das proteínas trivalentes juntas através de ligações de dissulfeto (ovais alongados pequenos), estabilizando a estrutura e provendo um agonista capaz de juntar os domínios de sinalização intracelular dos seis receptores e proteínas de sinalização para formar um complexo de sinalização. Os domínios de ligação de TNFRSF indicados como cilindros podem ser domínios scFv compreendendo, por exemplo, uma cadeia V_H e uma V_L conectadas por um ligador que pode compreender resíduos hidrofílicos e sequências Gly e Ser para flexibilidade, assim como Glu e Lys para solubilidade. Qualquer planejamento de domínio scFv pode ser usada, tal como aqueles descritos em de Marco, *Microbial Cell Factories*, 2011, 10, 44; Ahmad, *et al.*, *Clin. & Dev. Immunol.* 2012, 980250; Monnier, *et al.*, *Antibodies*, 2013, 2, 193-208; ou nas referências aqui incorporadas em outro lugar. As estruturas de proteína de fusão desta forma são descritas nas Patentes U.S. Nos. 9.359.420, 9.340.599, 8.921.519 e 8.450.460, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência.

[00469] As sequências de aminoácido para os outros domínios de polipeptídeo da estrutura I-A são dadas na Tabela 6. O domínio Fc preferivelmente compreende um domínio constante completo (aminoácidos 17-230 da SEQ ID NO: 31), o domínio de dobradiça completo (aminoácidos 1-16 da SEQ ID NO: 31) ou uma porção do domínio de dobradiça (por exemplo, aminoácidos 4-16 da SEQ ID NO: 31). Os ligadores preferidos para conectar um anticorpo Fc de terminal C podem ser selecionados das modalidades dadas na SEQ ID NO: 32 até a SEQ ID NO: 41, incluindo ligadores adequados para a fusão de polipeptídeos adicionais.

TABELA 6. Sequências de aminoácido para as proteínas de fusão TNFRSF, incluindo proteínas de fusão de 4-1BB, com planejamento de proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal C (estrutura I-A).

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 31 Domínio Fc	KS CDKTH TCP PCPA ELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 180 LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO: 32 ligador	GGPGSSKSCD KTHTCP PCA PE 22
SEQ ID NO: 33 ligador	GGSGSSKSCD KTHTCP PCA PE 22
SEQ ID NO: 34 ligador	GGPGSSSSSS SKSCDKTHC PPCAPE 27
SEQ ID NO: 35 ligador	GGSGSSSSSS SKSCDKTHC PPCAPE 27
SEQ ID NO: 36 ligador	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCP PCA PE 29
SEQ ID NO: 37 ligador	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCP PCA PE 29
SEQ ID NO: 38 ligador	GGPGSSSGSGS SDKTHTCP PCA PE 24
SEQ ID NO: 39 ligador	GGPGSSSGSGS DKTHTCP PCA PE 23
SEQ ID NO: 40 ligador	GGPSSSGSDK THTCP PCA PE 21
SEQ ID NO: 41 ligador	GGSSSSSSSS GSDKTHTCP PCA PE 25

[00470] As sequências de aminoácido para os outros domínios de polipeptídeo da estrutura I-B são dadas na Tabela 7. Se um fragmento de anticorpo Fc é fundido ao terminal N de uma proteína de fusão TNFRSF como na Estrutura I-B, a sequência do módulo Fc é preferivelmente aquela mostrada na SEQ ID NO: 42 e as sequências de ligador são preferivelmente selecionadas daquelas modalidades apresentadas na SEQ ID NO: 43 até a SEQ ID NO: 45.

TABELA 7. Sequências de aminoácido para proteínas de fusão TNFRSF, incluindo proteínas de fusão de 4-1BB, com planejamento de proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal N (estrutura I-B).

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 42 Domínio Fc	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCP PCAPELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246

SEQ ID NO: 43 ligador	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO: 44 ligador	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO: 45 ligador	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

[00471] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B da Figura 22 compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB selecionados do grupo consistindo em uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de utomilumab, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de urelumab, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de utomilumab, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável selecionadas das variáveis de cadeia pesada e variáveis de cadeia leve descritas na Tabela 8, qualquer combinação de uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável dos anteriores e fragmentos, derivados, conjugados, variantes e biossimilares dos mesmos.

[00472] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B da Figura 22 compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB compreendendo uma sequência 4-1BBL. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB compreendendo uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 46. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB compreendendo uma sequência de 4-1BBL solúvel. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB compreendendo uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 47.

[00473] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B da Figura 22 compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências

mostradas nas SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 23 e SEQ ID NO: 24, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de 4-1BB de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de 4-1BB que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências de V_H e V_L dadas na Tabela 8, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador.

TABELA 8. Domínios de polipeptídeo adicionais úteis como domínios de ligação de 4-1BB em proteínas de fusão ou como agonistas de anticorpo scFv de 4-1BB.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO: 47 domínio solúvel de 4-1BBL	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRV VAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168
SEQ ID NO: 48 cadeia pesada variável para 4B4- 1-1 versão 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO: 49 cadeia leve variável para 4B4- 1-1 versão 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DILHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 50 cadeia pesada variável para 4B4- 1-1 versão 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119

SEQ ID NO: 51 cadeia leve variável para 4B4- 1-1 versão 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DILHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 52 cadeia pesada variável para H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNIA PSLTNRFTIS RDNAKNSLIL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO: 53 cadeia leve variável para H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNIL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[00474] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (ii) um primeiro ligador peptídico, (iii) um segundo domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (iv) um segundo ligador peptídico e (v) um terceiro domínio de ligação de 4-1BB solúvel, compreendendo adicionalmente um domínio adicional na extremidade de terminal N e/ou de terminal C e em que o domínio adicional é um Domínio de fragmento Fab ou Fc. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (ii) um primeiro ligador peptídico, (iii) um segundo domínio de ligação de 4-1BB solúvel, (iv) um segundo ligador peptídico e (v) um terceiro domínio de ligação de 4-1BB solúvel, compreendendo adicionalmente um domínio adicional na extremidade de terminal N e/ou de terminal C, em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc, em que cada um dos domínios de 4-1BB solúveis carecem de uma região de seguimento (que contribui para a trimerização e provê uma certa distância da membrana celular, mas não é parte do domínio de ligação de 4-1BB) e o primeiro e o segundo ligadores peptídicos independentemente têm um comprimento de 3 a 8 aminoácidos.

[00475] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de 4-1BB compreendendo (i) um primeiro domínio de citocina da superfamília do fator de necrose de tumor (TNF) solúvel, (ii) um primeiro ligador peptídico, (iii) um segundo domínio de

citocina da superfamília do TNF solúvel, (iv) um segundo ligador peptídico e (v) um terceiro domínio de citocina da superfamília do TNF solúvel, em que cada um dos domínios de citocina da superfamília do TNF solúvel carece de uma região de seguimento e o primeiro e o segundo ligadores peptídicos independentemente têm um comprimento de 3-8 aminoácidos e em que cada domínios de citocina da superfamília do TNF é um domínio de ligação de 4-1BB.

[00476] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é um anticorpo scFv agonista de 4-1BB compreendendo qualquer um dos domínios V_H anteriores ligados a qualquer um dos domínios V_L anteriores.

[00477] Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é o anticorpo agonista de 4-1BB da BPS Bioscience catálogo no. 79097-2, comercialmente disponível da BPS Bioscience, San Diego, CA, USA. Em uma modalidade, o agonista de 4-1BB é o anticorpo agonista de 4-1BB da Creative Biolabs catálogo no. MOM-18179, comercialmente disponível da Creative Biolabs, Shirley, NY, USA.

[00478] O agonista de OX40 (CD134) pode ser qualquer molécula de ligação de OX40 conhecida na técnica. A molécula de ligação de OX40 pode ser um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão capaz de ligar ao OX40 de ser humano ou mamífero. Os agonistas de OX40 ou moléculas de ligação de OX40 pode compreender uma cadeia pesada da imunoglobulina de qualquer isótipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina. O agonista de OX40 ou molécula de ligação de OX40 pode ter tanto uma cadeia pesada quanto uma leve. Como aqui usada, o termo molécula de ligação também inclui anticorpos (incluindo anticorpos de comprimento total), anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpos

humanos, humanizados ou quiméricos e fragmentos de anticorpo, por exemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, fragmentos de ligação de epítipo de qualquer uma das formas acima e engenheiradas de anticorpos, por exemplo, moléculas scFv, que se ligam ao OX40. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de ligação de antígeno que é um anticorpo completamente humano. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de ligação de antígeno que é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, os agonistas de OX40 para o uso nos métodos e composições presentemente divulgados incluem anticorpos anti-OX40, anticorpos anti-OX40 de ser humano, anticorpos anti-OX40 de camundongo, anticorpos anti-OX40 de mamíferos, anticorpos anti-OX40 monoclonais, anticorpos anti-OX40 policlonais, anticorpos anti-OX40 quiméricos, adnectinas anti-OX40, anticorpos de domínio anti-OX40, fragmentos anti-OX40 de cadeia única, fragmentos anti-OX40 de cadeia pesada, fragmentos anti-OX40 de cadeia leve, proteínas de fusão anti-OX40 e fragmentos, derivados, conjugados, variantes ou biossimilares dos mesmos. Em uma modalidade preferida, o agonista de OX40 é um anticorpo anti-OX40 monoclonal agonístico, humanizado ou completamente humano (isto é, um anticorpo derivado a partir de uma única linhagem de célula).

[00479] Em uma modalidade preferida, o agonista de OX40 ou molécula de ligação de OX40 também podem ser uma proteína de fusão. As proteínas de fusão de OX40 compreendendo um domínio Fc fundido ao OX40L são descritas, por exemplo, em Sadun, *et al.*, *J. Immunother.* 2009, 182, 1481-89. Em uma modalidade preferida, um agonista de OX40 multimérico, tal como um agonista de OX40 trimérico ou hexamérico (com três ou seis domínios de ligação de ligante), pode induzir agrupamento de receptor superior (OX40L) e formação de complexo de sinalização celular interno comparado a um anticorpo monoclonal agonístico, que tipicamente

possui dois domínios de ligação de ligante. Proteínas de fusão triméricas (trivalentes) ou hexaméricas (ou hexavalentes) ou maiores compreendendo três domínios de ligação de TNFRSF e IgG1-Fc e opcionalmente adicionalmente ligando duas ou mais destas proteínas de fusão são descritas, por exemplo, em Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* 2013, 12, 2735-47.

[00480] Os anticorpos de OX40 agonísticos e proteínas de fusão são conhecidos induzir respostas imunes fortes. Curti, *et al.*, *Cancer Res.* 2013, 73, 7189-98. Em uma modalidade preferida, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal ou proteína de fusão que se ligam especificamente ao antígeno de OX40 em uma maneira suficiente para reduzir a toxicidade. Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal de OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a toxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), por exemplo citotoxicidade de célula NK. Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal de OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal de OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal de OX40 agonístico ou proteína de fusão que anula a funcionalidade da região Fc.

[00481] Em algumas modalidades, os agonistas de OX40 são distinguidos pela ligação ao OX40 humano (SEQ ID NO: 54) com alta afinidade e atividade agonística. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma molécula de ligação que se liga ao OX40 humano (SEQ ID NO: 54). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma molécula de ligação que se liga ao OX40 de murino (SEQ ID NO: 55). As sequências de aminoácido do antígeno de OX40 ao qual um agonista de OX40 ou molécula de ligação se ligam estão resumidas na Tabela 9.

TABELA 9. Sequências de aminoácido de antígenos de OX40.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 54 OX40 humano (<i>Homo sapiens</i>)	MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALILL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO: 55 OX40 de murino (<i>Mus musculus</i>)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYP SGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSL L ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LAILLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

[00482] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de OX40 que se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 100 pM ou mais baixo, liga OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 90 pM ou mais baixo, liga OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 80 pM ou mais baixo, liga OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 70 pM ou mais baixo, liga OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 60 pM ou mais baixo, liga OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 50 pM ou mais baixo, liga OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 40 pM ou mais baixo ou liga OX40 de ser humano ou murino com um K_D de cerca de 30 pM ou mais baixo.

[00483] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de OX40 que se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $7,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 8×10^5 1/M·s ou mais rápido, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $8,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 9×10^5 1/M·s ou

mais rápido, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de $9,5 \times 10^5$ 1/M·s ou mais rápido ou se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{assoc} de cerca de 1×10^6 1/M·s ou mais rápido.

[00484] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem um agonista de OX40 que se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de 2×10^{-5} 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,1 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,2 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,3 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,4 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,5 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,6 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,8 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de $2,9 \times 10^{-5}$ 1/s ou mais lento ou se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um k_{dissoc} de cerca de 3×10^{-5} 1/s ou mais lento.

[00485] Em algumas modalidades, as composições, processos e métodos descritos incluem agonista de OX40 que se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 10 nM ou mais baixo, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 9 nM ou mais baixo, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 8 nM ou mais baixo, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 7 nM ou mais baixo, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 6 nM ou mais baixo, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 5 nM ou mais baixo, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC_{50} de cerca de 4 nM ou mais baixo, se liga ao

OX40 de ser humano ou murino com um IC₅₀ de cerca de 3 nM ou mais baixo, se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC₅₀ de cerca de 2 nM ou mais baixo ou se liga ao OX40 de ser humano ou murino com um IC₅₀ de cerca de 1 nM ou mais baixo.

[00486] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é tavolixizumab, também conhecido como MEDI0562 ou MEDI-0562. Tavolixizumab está disponível da MedImmune subsidiária da AstraZeneca, Inc. Tavolixizumab é imunoglobulina G1-capa, anti-[TNFRSF4 de *Homo sapiens* (membro 4 da superfamília do receptor do fator de necrose de tumor (TNFR), OX40, CD134)], anticorpo monoclonal humanizado e quimérico. As sequências de aminoácido de tavolixizumab são apresentadas na Tabela 10. Tavolixizumab compreende sítios de N-glicosilação nas posições 301 e 301'', com glicanos tipo CHO biantenários complexos fucosilados; pontes de dissulfeto intracadeia de cadeia pesada nas posições 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_{H1}-C_L), 265-325 (C_{H2}) e 371-429 (C_{H3}) (e nas posições 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'' e 371''-429''); pontes de dissulfeto intracadeia de cadeia leve nas posições 23'-88' (V_H-V_L) e 134'-194' (C_{H1}-C_L) (e nas posições 23'''-88'' e 134'''-194'''); pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia pesada-cadeia pesada nas posições 230-230'' e 233-233''; e pontes de dissulfeto intercadeia de cadeia pesada-cadeia leve em 224-214' e 224''-214'''. os testes clínicos correntes de tavolixizumab em uma variedade de indicações de tumor sólido incluem U.S. National Institutes of Health clinicaltrials.gov identificadores NCT02318394 e NCT02705482.

[00487] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 56 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 57. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve tendo as sequências mostradas nas SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 57, respectivamente ou fragmentos de ligação de antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), variantes ou conjugados dos

mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 57, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 57, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 57, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 57, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 56 e SEQ ID NO: 57, respectivamente.

[00488] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de tavolixizumab. Em uma modalidade, a região variável de cadeia pesada (V_H) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 58 e a região variável de cadeia leve (V_L) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 59 e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 59,

respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 59, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende um anticorpo scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 59.

[00489] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 62, respectivamente e substituições conservativas de aminoácido das mesmas e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 e SEQ ID NO: 65, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido das mesmas.

[00490] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal agonista de OX40 bioessimililar aprovado pelas autoridades reguladoras de fármaco com referência ao tavolixizumab. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal bioessimililar compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácido de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumab. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-traducionais são selecionadas de uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e

truncagem. Em algumas modalidades, o biossimilar é um agonista de anticorpo OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o agonista de anticorpo OX40 é provido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumab. O agonista de anticorpo OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármaco tal como o U.S. FDA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumab. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é tavolixizumab.

TABELA 10. Sequências de aminoácido para anticorpos agonistas de OX40 relacionados com o tavolixizumab.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 56 cadeia pesada para tavolixizumab	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTCAVYGGSFSGYWNWIRKH
	PGKGLLEYIGY ISYNGITYHN 60
	PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY
	DYDGGHAMDY WGQGTSLTVS 120
	SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG
	VHTFPAVLQS 180
	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHPK SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC
	PPCPAPPELLG 240
	GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
	WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300
	NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
	QVYTLPPSRE 360
	EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFFL
	YSKLTVDKSR 420
	WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451

SEQ ID NO: 57 cadeia leve para tavolixizumab	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NILNWFYQQKPKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214
SEQ ID NO: 58 região variável de cadeia pesada para tavolixizumab	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTCAVYGGSFSGYWNWIRKH PGKGLYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLLV 118
SEQ ID NO: 59 região variável de cadeia leve para tavolixizumab	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NILNWFYQQKPKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO: 60 CDR1 de cadeia pesada para tavolixizumab	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO: 61 CDR2 de cadeia pesada para tavolixizumab	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO: 62 CDR3 de cadeia pesada para tavolixizumab	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO: 63 CDR1 de cadeia leve para tavolixizumab	QDISNILN 8
SEQ ID NO: 64 CDR2 de cadeia leve para tavolixizumab	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO: 65 CDR3 de cadeia leve para tavolixizumab	QQGSALPW 8

[00491] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é 11D4, que é um anticorpo completamente humano disponível da Pfizer, Inc. A preparação e propriedades de 11D4 são descritas nas Patentes U.S. Nos. 7.960.515, 8.236.930, e 9.028.824, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As sequências de aminoácido de 11D4 são apresentadas na Tabela 11.

[00492] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 66 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 67. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve tendo a sequências mostradas nas SEQ ID NO: 66 e SEQ ID

NO: 67, respectivamente ou fragmentos de ligação de antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 66 e SEQ ID NO: 67, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 66 e SEQ ID NO: 67, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 66 e SEQ ID NO: 67, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 66 e SEQ ID NO: 67, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 66 e SEQ ID NO: 67, respectivamente.

[00493] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de 11D4. Em uma modalidade, a região variável de cadeia pesada (VH) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 68 e a região variável de cadeia leve (VL) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 69 e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40

compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69, respectivamente.

[00494] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 e SEQ ID NO: 72, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 75, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos.

[00495] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal agonista de OX40 bioessimililar aprovado pelas autoridades reguladoras de fármaco com referência ao 11D4. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal bioessimililar compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácido de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 11D4. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-traducionais são selecionadas de uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncagem. Em algumas modalidades, o bioessimililar é um agonista de

anticorpo OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o agonista de anticorpo OX40 é provido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 11D4. O agonista de anticorpo OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármaco tal como o U.S. FDA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 11D4. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 11D4.

TABELA 11. Sequências de aminoácido para os anticorpos agonista de OX40 relacionados com 11D4.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 66 cadeia pesada para 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWILFDYWGQ GTLTVVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444

SEQ ID NO: 67 cadeia leve para 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO: 68 região variável de cadeia pesada para 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWILFDYWQG GTLTVVSS 118
SEQ ID NO: 69 região variável de cadeia leve para 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO: 70 CDR1 de cadeia pesada para 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO: 71 CDR2 de cadeia pesada para 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO: 72 CDR3 de cadeia pesada para 11D4	ESGWILFDY 9
SEQ ID NO: 73 CDR1 de cadeia leve para 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO: 74 CDR2 de cadeia leve para 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO: 75 CDR3 de cadeia leve para 11D4	QQYNSYPPT 9

[00496] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é 18D8, que é um anticorpo completamente humano disponível da Pfizer, Inc. A preparação e propriedades de 18D8 são descritas nas Patentes U.S. Nos. 7.960.515, 8.236.930 e 9.028.824, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As sequências de aminoácido de 18D8 são apresentadas na Tabela 12.

[00497] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende uma cadeia pesada dada pela SEQ ID NO: 76 e uma cadeia leve dada pela SEQ ID NO: 77. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve tendo as sequências mostradas nas SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, respectivamente ou fragmentos de ligação de antígeno, fragmentos Fab, fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), variantes ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias

pesada e leve que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as cadeias pesada e leve que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77, respectivamente.

[00498] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de 18D8. Em uma modalidade, a região variável de cadeia pesada (V_H) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 78 e a região variável de cadeia leve (V_L) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 79 e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as

regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79, respectivamente.

[00499] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 e SEQ ID NO: 82, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 e SEQ ID NO: 85, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos.

[00500] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal agonista de OX40 bioequivalente aprovado pelas autoridades reguladoras de fármaco com referência ao 18D8. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal bioequivalente compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácido de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 18D8. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-traducionais são selecionadas de uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncagem. Em algumas modalidades, o bioequivalente é um agonista de anticorpo OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o agonista de anticorpo OX40 é provido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em

que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 18D8. O agonista de anticorpo OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármaco tal como o U.S. FDA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 18D8. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é 18D8.

TABELA 12. Sequências de aminoácido para anticorpos agonistas de OX40 relacionados com 18D8.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 76 cadeia pesada para 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYFG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSFLT VVHQDWLNGK EYCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 77 cadeia leve para 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SILAWYQQK GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGTDT FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLT 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO: 78 região variável de cadeia pesada para 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYFG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124

SEQ ID NO: 79 região variável de cadeia leve para 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SILAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO: 80 CDR1 de cadeia pesada para 18D8	DYAMH 5
SEQ ID NO: 81 CDR2 de cadeia pesada para 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO: 82 CDR3 de cadeia pesada para 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO: 83 CDR1 de cadeia leve para 18D8	RASQSVSSIL UM 11
SEQ ID NO: 84 CDR2 de cadeia leve para 18D8	DASNRAT 7
SEQ ID NO: 85 CDR3 de cadeia leve para 18D8	QQRSNWPT 8

[00501] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é Hu119-122, que é um anticorpo humanizado disponível da GlaxoSmithKline plc. A preparação e propriedades de Hu119-122 são descritas nas Patentes U.S. Nos. 9.006.399 e 9.163.085 e na Publicação de Patente Internacional No. WO 2012/027328, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As sequências de aminoácido de Hu119-122 são apresentadas na Tabela 13.

[00502] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de Hu119-122. Em uma modalidade, a região variável de cadeia pesada (V_H) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 86 e a região variável de cadeia leve (V_L) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 87 e substituições conservativa de aminoácido das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 86 e SEQ ID NO: 87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 86 e SEQ ID NO: 87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 97% idênticas

às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 86 e SEQ ID NO: 87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 86 e SEQ ID NO: 87, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 86 e SEQ ID NO: 87, respectivamente.

[00503] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 90, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido das mesmas e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92 e SEQ ID NO: 93, respectivamente e substituições conservativas de aminoácido das mesmas.

[00504] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal agonista de OX40 bioessimililar aprovado pelas autoridades reguladoras de fármaco com referência ao Hu119-122. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal bioessimililar compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácido de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-traducionais são selecionadas de uma ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncagem. Em algumas modalidades, o bioessimililar é um agonista de anticorpo OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o agonista

de anticorpo OX40 é provido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. O agonista de anticorpo OX40 pode ser autorizado por uma autoridade reguladora de fármaco tal como o U.S. FDA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu119-122.

TABELA 13. Sequências de aminoácido para os anticorpos agonistas de OX40 relacionados com Hu119-122.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 86 região variável de cadeia pesada para Hu119-122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGMVTVSS 120
SEQ ID NO: 87 região variável de cadeia leve para Hu119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIILASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO: 88 CDR1 de cadeia pesada para Hu119- 122	SHDMS 5
SEQ ID NO: 89 CDR2 de cadeia pesada para Hu119- 122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO: 90 CDR3 de cadeia pesada para Hu119- 122	HYDDYYAWFA Y 11

SEQ ID NO: 91 CDR1 de cadeia leve para Hu119- 122	RASKSVSTSG YSYM H 15
SEQ ID NO: 92 CDR2 de cadeia leve para Hu119- 122	LASNLES 7
SEQ ID NO: 93 CDR3 de cadeia leve para Hu119- 122	QHSRELPLT 9

[00505] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é Hu106-222, que é um anticorpo humanizado disponível da GlaxoSmithKline plc. A preparação e propriedades de Hu106-222 são descritas nas Patentes U.S. Nos. 9.006.399 e 9.163.085 e na Publicação de Patente Internacional No. WO 2012/027328, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As sequências de aminoácido de Hu106-222 são apresentadas na Tabela 14.

[00506] Em uma modalidade, o agonista de OX40 compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis (VRs) de Hu106-222. Em uma modalidade, a região variável de cadeia pesada (V_H) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 94 e a região variável de cadeia leve (V_L) do agonista de OX40 compreende a sequência mostrada na SEQ ID NO: 95 e substituições conservativas de aminoácido das mesmas. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 99% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 95, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 98% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 95, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 97% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 95, respectivamente. Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 96% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 95, respectivamente. Em uma

modalidade, um agonista de OX40 compreende as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 95, respectivamente.

[00507] Em uma modalidade, um agonista de OX40 compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 e SEQ ID NO: 98, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido das mesmas e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve tendo as sequências apresentadas na SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 e SEQ ID NO: 101, respectivamente e substituições conservativa de aminoácido dos mesmos.

[00508] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo monoclonal agonista de OX40 bioessimilável aprovado pelas autoridades reguladoras de fármaco com referência ao Hu106-222. Em uma modalidade, o anticorpo monoclonal bioessimilável compreende um anticorpo OX40 compreendendo uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97% de identidade de sequência, por exemplo, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência, com a sequência de aminoácido de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência e que compreende uma ou mais modificações pós-traducionais quando comparado ao produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. Em algumas modalidades, a uma ou mais modificações pós-traducionais são selecionadas de um ou mais de: glicosilação, oxidação, desamidação e truncagem. Em algumas modalidades, o bioessimilável é um agonista de anticorpo OX40 autorizado ou submetido para autorização, em que o agonista de anticorpo OX40 é provido em uma formulação que difere das formulações de um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. O agonista de anticorpo OX40 pode ser autorizado por uma

autoridade reguladora de fármaco tal como o U.S. FDA e/ou a EMA da União Europeia. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222. Em algumas modalidades, o biossimilar é provido como uma composição que compreende adicionalmente um ou mais excipientes, em que o um ou mais excipientes são os mesmos ou diferentes dos excipientes compreendidos em um produto medicinal de referência ou produto biológico de referência, em que o produto medicinal de referência ou produto biológico de referência é Hu106-222.

TABELA 14. Sequências de aminoácido para anticorpos agonistas de OX40 relacionados com Hu106-222.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 94 região variável de cadeia pesada para Hu106-222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTY 120 SS 122
SEQ ID NO: 95 região variável de cadeia leve para Hu106-222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASILYTGVPV 60 RFGSGSGSTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 96 CDR1 de cadeia pesada para Hu106- 222	DYSMH 5
SEQ ID NO: 97 CDR2 de cadeia pesada para Hu106- 222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO: 98 CDR3 de cadeia pesada para Hu106- 222	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO: 99 CDR1 de cadeia leve para Hu106- 222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO: 100 CDR2 de cadeia leve para Hu106- 222	SASILYT 7

SEQ ID NO: 101 CDR3 de cadeia leve para Hu106- 222	QQHYSTPRT 9

[00509] Em algumas modalidades, o agonista de anticorpo OX40 é MEDI6469 (também aludido como 9B12). MEDI6469 é um anticorpo monoclonal de murino. Weinberg, *et al.*, *J. Immunother.* 2006, 29, 575-585. Em algumas modalidades o agonista de OX40 é um anticorpo produzido pelo hibridoma 9B12, depositado com Biovest Inc. (Malvern, MA, USA), como descrito em Weinberg, *et al.*, *J. Immunother.* 2006, 29, 575-585, a divulgação da qual é por meio deste incorporada por referência na sua totalidade. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende as sequências de CDR de MEDI6469. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma sequência da região variável de cadeia pesada e/ou uma sequência da região variável de cadeia leve de MEDI6469.

[00510] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é L106 BD (Produto Pharmingen #340420). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende as CDRs de anticorpo L106 (Produto BD Pharmingen #340420). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende uma sequência da região variável de cadeia pesada e/ou uma sequência da região variável de cadeia leve de anticorpo L106 (Produto BD Pharmingen #340420). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende as CDRs de anticorpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). Em algumas modalidades, o agonista de OX40 compreende uma sequência da região variável de cadeia pesada e/ou uma sequência da região variável de cadeia leve de anticorpo ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catálogo #20073). Em uma modalidade, o agonista de OX40 é o anticorpo monoclonal anti-mCD134/mOX40 de murino (clone OX86), comercialmente disponível da InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH.

[00511] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é selecionado dos

agonistas de OX40 descritos na Publicação de Pedido de Patente Internacional Nos. WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 e WO 2014/148895; pedido de Patente Europeu EP 0672141; Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 e US 2015/132288 (incluindo clones 20E5 e 12H3); e Patentes U.S. Nos. 7.504.101, 7.550.140, 7.622.444, 7.696.175, 7.960.515, 7.961.515, 8.133.983, 9.006.399 e 9.163.085, a divulgação de cada uma das quais é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[00512] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é uma proteína de fusão agonística de OX40 como representada na Estrutura I-A (Proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal C) ou Estrutura I-B (proteína de fusão de fragmento de anticorpo Fc de terminal N) ou um fragmento, derivado, conjugado, variante ou biossimilar da mesma. As propriedades das estruturas I-A e I-B estão descritas acima e nas Patentes U.S. Nos. 9.359.420, 9.340.599, 8.921.519 e 8.450.460, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. As sequências de aminoácido para os domínios de polipeptídeo da estrutura I-A são dadas na Tabela 6. O domínio Fc preferivelmente compreende um domínio constante completo (aminoácidos 17-230 da SEQ ID NO: 31), o domínio de dobradiça completo (aminoácidos 1-16 da SEQ ID NO: 31) ou uma porção do domínio de dobradiça (por exemplo, aminoácidos 4-16 da SEQ ID NO: 31). Os ligadores preferidos para conectar um anticorpo Fc de terminal C podem ser selecionados a partir das modalidades dadas na SEQ ID NO: 32 a SEQ ID NO: 41, incluindo ligadores adequados para fusão de polipeptídeos adicionais. Do mesmo modo, as sequências de aminoácido para os domínios de polipeptídeo da estrutura I-B são dadas na Tabela 7. Se um fragmento Fc de anticorpo é fundido ao terminal N de uma proteína de fusão de TNFRSF como na Estrutura I-B, a sequência do módulo Fc é preferivelmente aquela mostrada na SEQ ID NO:

42 e as sequências ligadoras são preferivelmente selecionadas daquelas modalidades apresentadas na SED ID NO: 43 até a SEQ ID NO: 45.

[00513] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 selecionados do grupo consistindo em uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de tavolixizumab, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de 11D4, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de 18D8, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de Hu119-122, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável de Hu106-222, uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável selecionadas das variáveis de cadeia pesada e variáveis de cadeia leve descritas na Tabela 15, qualquer combinação de uma cadeia pesada variável e cadeia leve variável dos anteriores e fragmentos, derivados, conjugados, variantes e biossimilares dos mesmos.

[00514] Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 compreendendo uma sequência de OX40L. Em uma modalidade, uma proteína de fusão agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 compreendendo uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 102. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 compreendendo uma sequência OX40L solúvel. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 compreendendo uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 103. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 compreendendo uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 104.

[00515] Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 59, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 86 e SEQ ID NO: 87, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de ligação de OX40 que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idênticas às sequências mostradas nas SEQ ID NO: 94 e SEQ ID NO: 95, respectivamente, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador. Em uma modalidade, uma proteína de fusão de agonista de OX40 de acordo com as estruturas I-A ou I-B compreende um ou mais domínios de

ligação de OX40 que é um domínio scFv compreendendo as regiões V_H e V_L que são cada uma pelo menos 95% idêntica às sequências de V_H e V_L dadas na Tabela 15, em que os domínios V_H e V_L são conectados por um ligador.

TABELA 15. Domínios de polipeptídeo adicionais úteis como domínios de ligação de OX40 nas proteínas de fusão (por exemplo, estruturas I-A e I-B) ou como agonista scFv de anticorpos de OX40.

Identificador	Sequência (Símbolos de Aminoácido de Uma Letra)
SEQ ID NO: 102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF ILISLKGYS QEVNLSLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO: 103 domínio solúvel de OX40L	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNN NSVIINCDGFIL ISLKGYSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVILN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO: 104 domínio solúvel de OX40L (alternativo)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNN SVII NCDGFILISL KGYSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVILNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO: 105 cadeia pesada variável para 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGLTVTVS 120
SEQ ID NO: 106 cadeia leve variável para 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNNGYNILDW ILQKAGQSPQ LLIILGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 107 cadeia pesada variável para 011	EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYTMTNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLILQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLTVTVSSA 120
SEQ ID NO: 108 cadeia leve variável para 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNNGYNILDW ILQKAGQSPQ LLIILGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 109 cadeia pesada variável para 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGLTVTVS 120
SEQ ID NO: 110 cadeia leve variável para 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNNGYNILDW ILQKPGQSPQ LLIILGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 111 cadeia pesada variável para 023	EVQLVESGGG LVHPPGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLIL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGLTVTVSS 120
SEQ ID NO: 112 cadeia leve variável para 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SILAWYQQK GPAPRLLIYD ASNRTATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108

SEQ ID NO: 113 região variável de cadeia pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANY Y GSSLMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO: 114 região variável de cadeia leve	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NILNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 115 região variável de cadeia pesada	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPLDFFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO: 116 região variável de cadeia leve	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 117 região variável de cadeia pesada de anticorpo humanizado	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNE TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO: 118 região variável de cadeia pesada de anticorpo humanizado	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTITVTV 120 SS 122
SEQ ID NO: 119 região variável de cadeia leve de anticorpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASILYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 120 região variável de cadeia leve de anticorpo humanizado	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASILYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 121 região variável de cadeia pesada de anticorpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGESEKL SCESNEYEP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTITVSA 120
SEQ ID NO: 122 região variável de cadeia pesada de anticorpo humanizado	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVSS 120
SEQ ID NO: 123 região variável de cadeia leve de anticorpo humanizado	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LILASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFLTNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO: 124 região variável de cadeia leve de anticorpo humanizado	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHY QQKPGQAPRL LILASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO: 125 região variável de cadeia pesada	MILGLNYVFI VLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV ILQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138

SEQ ID NO: 126 região variável de cadeia leve	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHQP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[00516] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de ligaduras OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de OX40 solúvel, (ii) um primeiro ligador peptídico, (iii) um segundo domínio de ligação de OX40 solúvel, (iv) um segundo ligador peptídico e (v) um terceiro domínio de ligação de OX40 solúvel, compreendendo adicionalmente um domínio adicional na extremidade de terminal N e/ou de terminal C e em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc. Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de ligação de OX40 solúvel, (ii) um primeiro ligador peptídico, (iii) um segundo domínio de ligação de OX40 solúvel, (iv) um segundo ligador peptídico e (v) um terceiro domínio de ligação de OX40 solúvel, compreendendo adicionalmente um domínio adicional na extremidade de terminal N e/ou de terminal C, em que o domínio adicional é um domínio de fragmento Fab ou Fc em que cada um dos domínios de ligação de OX40 solúveis carece de uma região de seguimento (que contribui para a trimerização e provê uma certa distância da membrana celular, mas não é parte do domínio de ligação de OX40) e o primeiro e o segundo ligadores peptídicos independentemente têm um comprimento de 3 a 8 aminoácidos.

[00517] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um polipeptídeo de fusão de cadeia única agonístico de OX40 compreendendo (i) um primeiro domínio de citocina da superfamília do fator de necrose de tumor (TNF) solúvel, (ii) um primeiro ligador peptídico, (iii) um segundo domínio de citocina da superfamília do TNF solúvel, (iv) um segundo ligador peptídico e (v) um terceiro domínio de citocina da superfamília do TNF solúvel, em que cada um dos domínios de citocina da superfamília do TNF solúvel carece de

uma região de seguimento e o primeiro e o segundo ligadores peptídicos independentemente têm um comprimento de 3 a 8 aminoácidos e em que os domínios de citocina da superfamília do TNF é um domínio de ligação de OX40.

[00518] Em algumas modalidades, o agonista de OX40 é MEDI6383. MEDI6383 é uma proteína de fusão agonística de OX40 e pode ser preparada como descrito na Patente U.S. No. 6.312.700, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência.

[00519] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é um anticorpo scFv agonístico de OX40 compreendendo qualquer um dos domínios V_H anteriores ligados a qualquer um dos domínios V_L anteriores.

[00520] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é o anticorpo monoclonal agonista de OX40 MOM-18455 da Creative Biolabs, comercialmente disponível da Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USA.

[00521] Em uma modalidade, o agonista de OX40 é o clone de anticorpo agonístico de OX40 Ber-ACT35 comercialmente disponível da BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA.

E. ETAPA E: Colheita de TILS

[00522] Depois da segunda etapa de expansão, as células podem ser colhidas. Em algumas modalidades os TILs são colhidos depois de um, dois, três, quatro ou mais etapas de expansão, por exemplo como provido na Figura 9. Em algumas modalidades os TILs são colhidos depois de duas etapas de expansão, por exemplo como provido na Figura 9.

[00523] Os TILs podem ser colhidos em qualquer maneira apropriada e estéril, incluindo por exemplo pela centrifugação. Os métodos para colher TILs são bem conhecidos na técnica e qualquer um de tais métodos conhecidos pode ser utilizado com o presente processo. Em algumas modalidades, TILS são colhidos usando um sistema automatizado.

[00524] Os sistemas coletores de célula e/ou sistemas processadores de

célula estão comercialmente disponíveis a partir de uma variedade de fontes, incluindo, por exemplo, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer e Inotech Biosystems International, Inc. Qualquer coletor com base em célula pode ser utilizado com os presentes métodos. Em algumas modalidades, o coletor de células e/ou sistemas processadores de célula são um coletor de célula com base em membrana. Em algumas modalidades, a colheita de célula é por intermédio de um sistema de processamento de célula, tal como o sistema LOVO (fabricado pela Fresenius Kabi). O termo “sistema de processamento de célula LOVO” também se refere a qualquer instrumento ou dispositivo fabricado por qualquer vendedor que possa bombear uma solução compreendendo células através de uma membrana ou filtro tal como uma membrana giratória ou filtro giratório em um ambiente de sistema estéril e/ou fechado, permitindo fluxo contínuo e processamento de célula para remover sobrenadante ou meios de cultura celular sem peletização. Em algumas modalidades, o coletor de células e/ou sistema de processamento de célula pode realizar a separação, lavagem, troca de fluido, concentração de célula e/ou outras etapas de processamento de célula em um sistema fechado, estéril.

[00525] Em algumas modalidades, a colheita, por exemplo, a Etapa E de acordo com a Figura 9, é realizada a partir de um biorreator de sistema fechado. Em algumas modalidades, um sistema fechado é utilizado para a expansão de TIL, como aqui descrito. Em algumas modalidades, um biorreator único é utilizado. Em algumas modalidades, o biorreator único utilizado é por exemplo um G-REX-10 ou um G-REX-100. Em algumas modalidades, o biorreator de sistema fechado é um biorreator único.

F. ETAPA F: Formulação Final e Transferência para Bolsa de Infusão

[00526] Depois da Etapas A até E como providas em uma ordem exemplar na Figura 9 e como resumidas em detalhes acima e aqui são completadas, as células são transferidas para um recipiente para o uso na administração a um paciente. Em algumas modalidades, uma vez que um

número terapeuticamente suficiente de TILs é obtida usando os métodos de expansão descritos acima, eles são transferidos para um recipiente para o uso na administração a um paciente.

[00527] Em uma modalidade, os TILs expandidos usando APCs da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. Os TILs expandidos usando PBMCs da presente divulgação podem ser administrados por qualquer via adequada como conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas como uma única infusão intra-arterial ou intravenosa, que preferivelmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

G. Composições Farmacêuticas, Dosagens e Regimes de Dosagem

[00528] Em uma modalidade, TILs expandidos usando os métodos da presente divulgação são administrados a um paciente como uma composição farmacêutica. Em uma modalidade, a composição farmacêutica é uma suspensão de TILs em um tampão estéril. Os TILs expandidos usando PBMCs da presente divulgação podem ser administrados por qualquer via adequada como conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as células T são administradas como uma única infusão intra-arterial ou intravenosa, que preferivelmente dura aproximadamente 30 a 60 minutos. Outras vias adequadas de administração incluem administração intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

[00529] Qualquer dose adequada de TILs pode ser administrada. Em algumas modalidades, de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$ TILs são administrados, com uma média em torno de $7,8 \times 10^{10}$ TILs, particularmente se o câncer for melanoma. Em uma modalidade, cerca de $1,2 \times 10^{10}$ a cerca de $4,3 \times 10^{10}$ de TILs são administrados. Em algumas modalidades, cerca de 3×10^{10} a cerca de 12×10^{10} TILs são administrados. Em algumas modalidades,

cerca de 4×10^{10} a cerca de 10×10^{10} TILs são administrados. Em algumas modalidades, cerca de 5×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs são administrados. Em algumas modalidades, cerca de 6×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs são administrados. Em algumas modalidades, cerca de 7×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs são administrados. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $7,8 \times 10^{10}$ TILs, particularmente se o câncer for melanoma. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $1,2 \times 10^{10}$ a cerca de $4,3 \times 10^{10}$ de TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 3×10^{10} a cerca de 12×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 4×10^{10} a cerca de 10×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 5×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 6×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs. Em algumas modalidades, a dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de 7×10^{10} a cerca de 8×10^{10} TILs.

[00530] Em algumas modalidades, o número dos TILs provido nas composições farmacêuticas da invenção é de cerca de 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} e 9×10^{13} . Em uma modalidade, o número dos TILs provido nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de 1×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9

a 5×10^9 , 5×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^{10} a 5×10^{10} , 5×10^{10} a 1×10^{11} , 5×10^{11} a 1×10^{12} , 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13} .

[00531] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs provida nas composições farmacêuticas da invenção é menor do que, por exemplo, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00532] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs provida nas composições farmacêuticas da invenção é maior do que 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00533] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs provida nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,0001% a cerca de 50%, cerca de 0,001% a cerca de 40%, cerca de 0,01% a

cerca de 30%, cerca de 0,02% a cerca de 29%, cerca de 0,03% a cerca de 28%, cerca de 0,04% a cerca de 27%, cerca de 0,05% a cerca de 26%, cerca de 0,06% a cerca de 25%, cerca de 0,07% a cerca de 24%, cerca de 0,08% a cerca de 23%, cerca de 0,09% a cerca de 22%, cerca de 0,1% a cerca de 21%, cerca de 0,2% a cerca de 20%, cerca de 0,3% a cerca de 19%, cerca de 0,4% a cerca de 18%, cerca de 0,5% a cerca de 17%, cerca de 0,6% a cerca de 16%, cerca de 0,7% a cerca de 15%, cerca de 0,8% a cerca de 14%, cerca de 0,9% a cerca de 12% ou cerca de 1% a cerca de 10% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00534] Em algumas modalidades, a concentração dos TILs provida nas composições farmacêuticas da invenção está na faixa de cerca de 0,001% a cerca de 10%, cerca de 0,01% a cerca de 5%, cerca de 0,02% a cerca de 4,5%, cerca de 0,03% a cerca de 4%, cerca de 0,04% a cerca de 3,5%, cerca de 0,05% a cerca de 3%, cerca de 0,06% a cerca de 2,5%, cerca de 0,07% a cerca de 2%, cerca de 0,08% a cerca de 1,5%, cerca de 0,09% a cerca de 1%, cerca de 0,1% a cerca de 0,9% p/p, p/v ou v/v da composição farmacêutica.

[00535] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs provida nas composições farmacêuticas da invenção é igual a ou menor do que 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g ou 0,0001 g.

[00536] Em algumas modalidades, a quantidade dos TILs provida nas composições farmacêuticas da invenção é maior do que 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g,

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

[00537] Os TILs providos nas composições farmacêuticas da invenção são eficazes em uma ampla faixa de dosagem. A dosagem exata dependerá da via de administração, da forma na qual o composto é administrado, do gênero e idade do indivíduo a ser tratado, do peso corporal do indivíduo a ser tratado e da preferência e experiência do médico atendente. As dosagens clinicamente estabelecidas dos TILs também podem ser usadas se apropriado. As quantidades das composições farmacêuticas administradas usando os métodos aqui, tais como as dosagens de TILs, serão dependentes do ser humano ou mamífero sendo tratado, da severidade do distúrbio ou condição, da taxa de administração, da disposição dos ingredientes farmacêuticamente ativos e do critério do médico prescrevente.

[00538] Em algumas modalidades, TILs podem ser administrados em uma única dose. Tal administração pode ser por injeção, por exemplo, injeção intravenosa. Em algumas modalidades, TILs podem ser administrados em doses múltiplas. A dosagem pode ser uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais do que seis vezes por ano. A dosagem pode ser uma vez ao mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana ou dia sim dia não. A administração de TILs pode continuar pelo tempo que for necessário.

[00539] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs é de cerca de 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 ,

3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} e 9×10^{13} . Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de 1×10^6 a 5×10^6 , 5×10^6 a 1×10^7 , 1×10^7 a 5×10^7 , 5×10^7 a 1×10^8 , 1×10^8 a 5×10^8 , 5×10^8 a 1×10^9 , 1×10^9 a 5×10^9 , 5×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^{10} a 5×10^{10} , 5×10^{10} a 1×10^{11} , 5×10^{11} a 1×10^{12} , 1×10^{12} a 5×10^{12} e 5×10^{12} a 1×10^{13} .

[00540] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 4,3 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 3,6 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3,2 mg/kg, cerca de 0,35 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 2,85 mg/kg, cerca de 0,3 mg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 0,15 mg/kg a cerca de 1,3 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 1,15 mg/kg, cerca de 0,45 mg/kg a cerca de 1 mg/kg, cerca de 0,55 mg/kg a cerca de 0,85 mg/kg, cerca de 0,65 mg/kg a cerca de 0,8 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 0,75 mg/kg, cerca de 0,7 mg/kg a cerca de 2,15 mg/kg, cerca de 0,85 mg/kg a cerca de 2 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 1,85 mg/kg, cerca de 1,15 mg/kg a cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 1,3 mg/kg mg a cerca de 1,6 mg/kg, cerca de 1,35 mg/kg a cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2,15 mg/kg a cerca de 3,6 mg/kg, cerca de 2,3 mg/kg a cerca de 3,4 mg/kg, cerca de 2,4 mg/kg a cerca de 3,3 mg/kg, cerca de 2,6 mg/kg a cerca de 3,15 mg/kg, cerca de 2,7 mg/kg a cerca de 3 mg/kg, cerca de 2,8 mg/kg a cerca de 3 mg/kg ou cerca de 2,85 mg/kg a cerca de 2,95 mg/kg.

[00541] Em algumas modalidades, uma dosagem eficaz de TILs está na faixa de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg, cerca de 10 mg a cerca de 300 mg, cerca de 20 mg a cerca de 250 mg, cerca de 25 mg a cerca de 200 mg, cerca de 1 mg a cerca de 50 mg, cerca de 5 mg a cerca de 45 mg, cerca de 10

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

[00542] Uma quantidade eficaz dos TILs pode ser administrada em doses únicas ou múltiplas por qualquer um dos modos aceitos de administração de agentes tendo utilidades similares, incluindo as vias intranasal e transdérmica, pela injeção intra-arterial, intravenosamente, intraperitonealmente, parenteralmente, intramuscularmente, subcutaneamente, topicamente, por transplante ou por inalação.

H. Criopreservação de TILs

[00543] Como debatido acima e exemplificado nas Etapas A até E como provido na Figura 9, a criopreservação pode ocorrer em numerosos pontos por todo o processo de expansão de TIL. Em algumas modalidades, a população de TILs expandida depois da segunda expansão (como provido por exemplo, de acordo com a etapa D da Figura 9) pode ser criopreservada. A criopreservação pode ser geralmente realizada colocando-se a população de TIL dentro de uma solução congelante, por exemplo, 85% de soro AB inativado por complemento e 15% de sulfóxido de dimetila (DMSO). As células em solução são colocadas dentro de frascos criogênicos e armazenadas por 24 horas a -80°C, com transferência opcional para congeladores de nitrogênio gasoso para a criopreservação. Ver Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados em 5% de DMSO. Em algumas modalidades, os TILs são

criopreservados em meios de cultura celular mais 5% de DMSO. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados de acordo com os métodos providos nos Exemplos 8 e 9.

[00544] Quando apropriado, as células são removidas do congelador e descongeladas em um banho de água a 37°C até que aproximadamente 4/5 da solução sejam descongelados. As células são geralmente recolocadas em suspensão em meios completos e opcionalmente lavadas uma ou mais vezes. Em algumas modalidades, os TILs descongelados podem ser contados e avaliados quanto à viabilidade como é conhecido na técnica.

I. Sistema Fechados para a Fabricação de TIL

[00545] A presente invenção provê o uso de sistema fechado durante o processo de cultivo de TIL. Tais sistemas fechados permitem prevenir e/ou reduzir a contaminação microbiana, permite o uso de menos frascos e permite reduções de custo. Em algumas modalidades, o sistema fechado usa dois recipientes.

[00546] Tais sistemas fechados são bem conhecidos na técnica e podem ser encontrados, por exemplo, em <http://pww.fda.gov/cber/guidelines.htm> e <https://pww.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>.

[00547] Como provido no sítio da web do FDA, os sistemas fechados com métodos estéreis são conhecidos e bem descritos. Ver, <https://pww.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>, como aludido acima e provido na parte pertinente abaixo.

[00548] Os dispositivos de conexão estéril (STCDs) produzem soldas estéreis entre dois pedaços compatíveis de tubulação. Este procedimento permite a conexão estéril de uma variedade de recipientes e diâmetros de tubo. Esta orientação descreve práticas e procedimentos recomendados para o

uso destes dispositivos. Esta orientação não trata dos dados ou informação de que um fabricante de um dispositivo de conexão estéril deve submeter ao FDA de modo a obter aprovação ou autorização para comercialização. Também é importante mencionar que o uso de um dispositivo de conexão estéril aprovado ou autorizado para propósitos não autorizados no rótulo pode fazer com que o dispositivo seja considerado adulterado e mal rotulado sob o Federal Food, Drug and Cosmetic Act.

[00549] Em algumas modalidades, o sistema fechado usa um recipiente a partir do momento que os fragmentos de tumor são obtidos até que os TILs estejam prontos para a administração ao paciente ou criopreservação. Em algumas modalidades quando dois recipientes são usados, o primeiro recipiente é um recipiente G fechado e a população de TILs é centrifugada e transferida para uma bolsa de infusão sem abrir o primeiro recipiente G fechado. Em algumas modalidades, quando dois recipientes são usados, a bolsa de infusão é uma bolsa de infusão contendo um HypoThermosol. Um sistema fechado ou sistema de cultura celular de TIL fechado é distinguido em que uma vez que a amostra de tumor e/ou fragmentos de tumor foram adicionados, o sistema é firmemente selado a partir do exterior para formar um ambiente fechado livre da invasão de bactérias, fungos e/ou qualquer outra contaminação microbiana.

[00550] Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana está entre cerca de 5% e cerca de 100%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana está entre cerca de 5% e cerca de 95%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana está entre cerca de 5% e cerca de 90%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana está entre cerca de 10% e cerca de 90%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana está entre cerca de 15% e cerca de 85%. Em algumas modalidades, a redução na contaminação microbiana é de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%,

cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou cerca de 100%.

[00551] O sistema fechado permite que o TIL cresça na ausência e/ou com uma redução significativa na contaminação microbiana.

[00552] Além disso, o pH, a pressão parcial de dióxido de carbono e a pressão parcial de oxigênio do ambiente de cultura celular de TIL cada um varia conforme as células são cultivadas. Consequentemente, mesmo que um meio apropriado para a cultura celular seja circulado, o ambiente fechado ainda precisa ser constantemente mantido como um ambiente ideal para a proliferação de TIL. Para esta finalidade, é desejável que os fatores físicos de pH, pressão parcial de dióxido de carbono e pressão parcial de oxigênio dentro do líquido de cultura do ambiente fechado sejam monitorados por meio de um sensor, o sinal do qual é usada para controlar um trocador de gás instalado na entrada do ambiente de cultura e a pressão parcial desse gás do ambiente fechado seja ajustada em tempo real de acordo com as mudanças no líquido de cultura de modo a otimizar o ambiente da cultura celular. Em algumas modalidades, a presente invenção provê um sistema de cultura celular fechado que incorpora na entrada para o ambiente fechado um trocador de gás equipado com um dispositivo de monitoramento que mede o pH, a pressão parcial de dióxido de carbono e a pressão parcial de oxigênio do ambiente fechado e otimiza o ambiente da cultura celular ajustando-se automaticamente as concentrações gasosas com base nos sinais do dispositivo de monitoramento.

[00553] Em algumas modalidades, a pressão dentro do ambiente fechado é contínua ou intermitentemente controlada. Isto é, a pressão no ambiente fechado pode ser variado por meio de um dispositivo de manutenção de pressão por exemplo, garantindo assim que o espaço seja

adequado para o crescimento de TILs em um estado de pressão positiva ou promovendo a exudação de fluido em um estado de pressão negativa e promovendo assim a proliferação celular. Aplicando-se pressão negativa intermitentemente, além disso, é possível recolocar uniforme e eficientemente o líquido circulante no ambiente fechado por meio de uma diminuição temporária no volume do ambiente fechado.

[00554] Em algumas modalidades, componentes de cultura ideais para a proliferação dos TILs podem ser substituídos ou adicionados e incluindo fatores tais como IL-2 e/ou OKT3, assim como combinações, podem ser adicionados.

C. Culturas Celulares

[00555] Em uma modalidade, um método para expandir TILs, incluindo aqueles debatidos acima assim como exemplificados na Figura 9, pode incluir o uso de cerca de 5.000 mL a cerca de 25.000 mL de meio de célula, cerca de 5.000 mL a cerca de 10.000 mL de meio de célula ou cerca de 5.800 mL a cerca de 8.700 mL de meio de célula. Em algumas modalidades, os meios são um meio livre de soro. Em algumas modalidades, os meios na primeira expansão são livres de soro. Em algumas modalidades, os meios na segunda expansão são livres de soro. Em algumas modalidades, os meios na primeira e na segunda expansões são ambos livres de soro. Em uma modalidade, expandir o número de TILs usa não mais do que um tipo de meio de cultura de célula. Qualquer meio de cultura de célula adequado pode ser usado, por exemplo, meio de célula AIM-V (L-glutamina, 50 μ M de meio de cultura de célula de sulfato de estreptomicina e 10 μ M de sulfato de gentamicina) (Invitrogen, Carlsbad CA). A este respeito, os métodos inventivos vantajosamente reduzem a quantidade de meio e o número de tipos de meio requeridos para expandir o número de TIL. Em uma modalidade, expandir o número de TIL pode compreender alimentar as células não mais frequentemente do que a cada terceiro ou quarto dia. Expandir o número de

células em um recipiente permeável a gás simplifica os procedimentos necessários para expandir o número de células pela redução da frequência de alimentação necessária para expandir as células.

[00556] Em uma modalidade, o meio de célula no primeiro e/ou segundo recipiente permeável a gás não é filtrado. O uso de meio de célula não filtrado pode simplificar os procedimentos necessários para expandir o número de células. Em uma modalidade, o meio de célula no primeira e/ou segundo recipientes permeáveis a gás carece de betamercaptoetanol (BME).

[00557] Em uma modalidade, a duração do método compreendendo obter uma amostra de tecido de tumor do mamífero; cultivar a amostra de tecido de tumor em um primeiro recipiente permeável a gás contendo meio de célula nele; obter TILs a partir da amostra de tecido de tumor; expandir o número de TILs em um segundo recipiente permeável a gás contendo meio de célula para uma duração de cerca de 7 a 14 dias, por exemplo, cerca de 11 dias. Em algumas modalidades a pré-REP é de cerca de 7 a 14 dias, por exemplo, cerca de 11 dias. Em algumas modalidades, REP é de cerca de 7 a 14 dias, por exemplo, cerca de 11 dias.

[00558] Em uma modalidade, TILs são expandidos em recipientes permeáveis a gás. Os recipientes permeáveis a gás foram usados para expandir TILs usando PBMCs usando métodos, composições e dispositivos conhecido na técnica, incluindo aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2005/0106717 A1, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência. Em uma modalidade, TILs são expandidos em bolsas permeáveis a gás. Em uma modalidade, TILs são expandidos usando um sistema de expansão de célula que expande TILs em bolsas permeáveis a gás, tais como o Sistema de Expansão de Célula Xuri W25 (GE Healthcare). Em uma modalidade, TILs são expandidos usando um sistema de expansão de célula que expande TILs em bolsas permeáveis a gás, tal como o Sistema de Biorreator WAVE, também conhecido como o Sistema de Expansão de

Célula Xuri W5 (GE Healthcare). Em uma modalidade, o sistema de expansão de célula inclui uma bolsa de usados célula permeável a gás com um volume selecionado do grupo consistindo em cerca de 100 mL, cerca de 200 mL, cerca de 300 mL, cerca de 400 mL, cerca de 500 mL, cerca de 600 mL, cerca de 700 mL, cerca de 800 mL, cerca de 900 mL, cerca de 1 L, cerca de 2 L, cerca de 3 L, cerca de 4 L, cerca de 5 L, cerca de 6 L, cerca de 7 L, cerca de 8 L, cerca de 9 L e cerca de 10 L.

[00559] Em uma modalidade, TILs podem ser expandidos em frascos G-Rex (comercialmente disponíveis da Wilson Wolf Manufacturing). Tais modalidades permitem que as populações de célula expandam de cerca de 5×10^5 células/cm² para entre 10×10^6 e 30×10^6 células/cm². Em uma modalidade isto é sem alimentação. Em uma modalidade, isto é sem alimentação contanto que o meio se encontre em uma altura de cerca de 10 cm no frasco G-Rex. Em uma modalidade isto é sem alimentação, mas com a adição de uma ou mais citocinas. Em uma modalidade, a citocina pode ser adicionada como um bolo sem qualquer necessidade de misturar a citocina com o meio. Tais recipientes, dispositivos e métodos são conhecidos na técnica e foram usadas para expandir TILs e incluem aqueles descritos na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2014/0377739A1, Publicação Internacional No. WO 2014/210036 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2013/0115617 A1, Publicação Internacional No. WO 2013/188427 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2011/0136228 A1, Patente U.S. No. US 8.809.050 B2, Publicação Internacional No. WO 2011/072088 A2, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2016/0208216 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2012/0244133 A1, Publicação Internacional No. WO 2012/129201 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2013/0102075 A1, Patente U.S. No. US 8.956.860 B2, Publicação Internacional No. WO 2013/173835 A1, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2015/0175966 A1, as

divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. Tais processos também são descritos em Jin *et al.*, *J. Immunotherapy*, 2012, 35: 283-292.

D. Criopreservação Opcional de TILs

[00560] A população de TIL volumosa ou a população de TILs expandida podem ser opcionalmente criopreservadas. Em algumas modalidades, a criopreservação ocorre na população de TIL terapêutica. Em algumas modalidades, a criopreservação ocorre nos TILs colhidos depois da segunda expansão. Em algumas modalidades, a criopreservação ocorre nos TILs na Etapa F exemplar da Figura 9. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados na bolsa de infusão. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados antes da colocação em uma bolsa de infusão. Em algumas modalidades, os TILs são criopreservados e não colocados em uma bolsa de infusão. Em algumas modalidades, a criopreservação é realizada usando um meio de criopreservação. Em algumas modalidades, o meio de criopreservação contém sulfóxido de dimetila (DMSO). Isto é geralmente realizada colocando-se a população de TIL dentro de uma solução congelante, por exemplo 85% de soro AB inativado por complemento e 15% de sulfóxido de dimetila (DMSO). As células em solução são colocadas dentro de frascos criogênicos e armazenadas por 24 horas a -80°C, com transferência opcional para congeladores de nitrogênio gasoso para criopreservação. Ver, Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986.

[00561] Quando apropriado, as células são removidas do congelador e descongeladas em um banho de água a 37°C até que aproximadamente 4/5 da solução sejam descongelados. As células são geralmente recolocadas em suspensão em meios completos e opcionalmente lavadas uma ou mais vezes. Em algumas modalidades, os TILs descongelados podem ser contados e avaliados quanto à viabilidade como é conhecido na técnica.

[00562] Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é criopreservada usando meio de criopreservação CS10 (CrioStor 10, BioLife

Solutions). Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é criopreservada usando um meio de criopreservação contendo sulfóxido de dimetila (DMSO). Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é criopreservada usando uma razão 1:1 (vol:vol) de CS10 e meios de cultura celular. Em uma modalidade preferida, uma população de TILs é criopreservada usando uma razão em torno de 1:1 (vol:vol) de CS10 e meios de cultura celular, compreendendo adicionalmente mais IL-2.

[00563] De acordo com modalidades particulares, uma composição de criopreservação (também aqui aludida como um “meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila”) compreende uma população de TILs preparada de acordo com a presente invenção (por exemplo, em uma quantidade de 1×10^6 a 9×10^{13}), um meio crioprotetor compreendendo DMSO que é adequado para preservar células em ambientes de temperatura baixa tal como -70°C a -196°C (por exemplo, CrioStor® CS10) e uma solução de eletrólito (por exemplo, uma solução isotônica tal como PlasmaLyte® A). Em uma modalidade preferida, o meio crioprotetor e a solução de eletrólito estão presentes em uma razão dentre cerca de 1,2:1 e cerca de 1:1,2 ou entre cerca de 1,1:1 e cerca de 1:1,1 ou preferivelmente em torno de 1:1. De acordo com uma modalidade, a solução de eletrólito compreende um ou mais de sódio, potássio, magnésio, acetato, cloreto e gluconato ou uma combinação dos mesmos; por exemplo, a solução de eletrólito pode compreender cloreto de sódio, gluconato de sódio, acetato de sódio trihidratado, cloreto de potássio e cloreto de magnésio. De acordo com uma modalidade, a solução de eletrólito tem um pH entre cerca de 7 e cerca de 8, preferivelmente entre cerca de 7,2 e cerca de 7,6 ou cerca de 7,4. Preferivelmente, a composição de criopreservação compreende adicionalmente um ou mais estabilizantes (por exemplo, albumina sérica humana) e/ou um ou mais fatores de crescimento de linfócito (por exemplo, IL-2). Por exemplo, cada um do meio crioprotetor e da solução de eletrólito

podem estar presentes na composição de criopreservação em uma quantidade de cerca de 20 mL a cerca de 100 mL ou cerca de 30 mL a cerca de 70 mL ou cerca de 40 mL a cerca de 60 mL ou cerca de 50 mL; albumina sérica humana pode estar presente em uma quantidade de cerca de 0,01 g a cerca de 2,0 g ou de cerca de 0,1 g a cerca de 1,0 g ou cerca de 0,5 g; e IL-2 pode estar presente em uma quantidade de cerca de 0,001 mg a cerca de 0,005 mg ou de cerca de 0,0015 mg a cerca de 0,0025 mg ou cerca de 0,0018 mg. O meio de criopreservação pode opcionalmente compreender um ou mais aditivos ou excipientes adicionais, tais como ajustadores de pH, preservantes, etc.

[00564] De acordo com uma modalidade, uma composição de criopreservação contendo uma população de TILs é composta dos seguintes:

Composição Nominal (%v/V) de Produto de Fármaco (base de 100 mL)		
Ingrediente	Quantidade Nominal por 100 mL cheios	Função
Linfócitos Infiltrantes de Tumor	83×10^7 a $3,0 \times 10^{10}$	Ingrediente ativo
CryoStor® CS10*	50 mL	Meio de criopreservação
PlasmaLyte A	50 mL	Agente isotônico
Albumina Sérica Humana (HSA)	0,5 g	Estabilizante
Interleucina 2	0,0018 mg (30.000 IU)	Fator de crescimento de linfócito
Total	100 mL	

* CryoStor CS10 contém 10% de sulfóxido de dimetila (DMSO)

[00565] Como debatido acima nas Etapas A até E, a criopreservação pode ocorrer em numerosos pontos por todo o processo de expansão de TIL. Em algumas modalidades, a população de TIL volumosa depois da primeira expansão de acordo com a etapa B ou a população de TILs expandida depois da uma ou mais expansões secundárias de acordo com a etapa D podem ser criopreservadas. A criopreservação pode ser geralmente realizada colocando-se a população de TIL dentro de uma solução congelante, por exemplo, 85% de soro AB inativado por complemento e 15% de sulfóxido de dimetila (DMSO). As células em solução são colocadas dentro de frascos criogênicos e armazenados por 24 horas a -80°C , com transferência opcional para congeladores de nitrogênio gasoso para criopreservação. Ver Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986.

[00566] Quando apropriado, as células são removidas do congelador e

descongeladas em um banho de água a 37°C até que aproximadamente 4/5 da solução estejam descongeladas. As células são geralmente recolocadas em suspensão em meios completos e opcionalmente lavadas um ou mais vezes. Em algumas modalidades, os TILs descongeladas podem ser contados e avaliados quanto à viabilidade como é conhecido na técnica.

[00567] Em alguns casos, a população de TIL da etapa B pode ser criopreservada imediatamente, usando os protocolos debatidos abaixo. Alternativamente, a população de TIL volumosa pode ser submetida à etapa C e Etapa D e depois criopreservada depois da Etapa D. Similarmente, no caso onde TILs geneticamente modificados serão usadas em terapia, as populações de TIL da Etapa B ou Etapa D podem ser submetidas às modificações genéticas para tratamentos adequados.

V. Métodos de Tratar Canceres e Outras Doenças

[00568] As composições e métodos aqui descritos podem ser usadas em um método para tratar doenças. Em uma modalidade, eles são para o uso no tratamento de distúrbios hiperproliferativos. Eles também podem ser usados no tratamento de outros distúrbios como aqui descritos e nos parágrafos seguintes.

[00569] Em algumas modalidades, o distúrbio hiperproliferativo é câncer. Em algumas modalidades, o distúrbio hiperproliferativo é um câncer de tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer de tumor sólido é selecionado do grupo consistindo em melanoma, câncer ovariano, câncer cervical, câncer pulmonar de célula não pequena (NSCLC), câncer pulmonar, câncer de bexiga, câncer mamário, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço (HNSCC)), câncer renal e carcinoma de célula renal. Em algumas modalidades, o distúrbio hiperproliferativo é uma malignidade hematológica. Em algumas modalidades, o câncer de tumor sólido é selecionado do grupo consistindo em leucemia linfocítica crônica, leucemia

linfoblástica aguda, linfoma de célula B grande difusa, linfoma de não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma folicular e linfoma de célula do manto.

[00570] Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratar um câncer com uma população de TILs, em que um paciente é pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa antes de uma infusão de TILs de acordo com a presente divulgação. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d por 2 dias (dias 27 e 26 antes da infusão de TIL) e fludarabina 25 mg/m²/d por 5 dias (dias 27 a 23 antes da infusão de TIL). Em uma modalidade, depois da quimioterapia não mieloablativa e infusão de TIL (no dia 0) de acordo com a presente divulgação, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 intravenosamente a 720.000 IU/kg a cada 8 horas para tolerância fisiológica.

[00571] A eficácia dos TILs aqui descritos no tratamento, prevenção e/ou controle das doenças ou distúrbios indicados pode ser testada usando vários modelos conhecidos na técnica, que proveem orientação para o tratamento de doença humana. Por exemplo, modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer ovariano são descritos, por exemplo, em Mullany, *et al.*, *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92; e Fong, *et al.*, *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12. Os modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer pancreáticos são descritos em Herreros-Villanueva, *et al.*, *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294. Os modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer mamário são descritos, por exemplo, em Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212. Os modelos para determinar a eficácia de tratamentos para melanoma são descritos, por exemplo, em Damsky, *et al.*, *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2010, 23, 853-859. Os modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer pulmonar são descritos, por exemplo, em Meuwissen, *et al.*, *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664. Os modelos para determinar a eficácia de tratamentos para câncer pulmonar

são descritos, por exemplo, em Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2, 55-60; e Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32.

[00572] Em algumas modalidades, IFN-gama (IFN- γ) é indicativo da eficácia de tratamento para tratamento de distúrbio hiperproliferativo. Em algumas modalidades, IFN- γ no sangue de indivíduos tratados com TILs é indicativo de TILs ativos. Em algumas modalidades, um ensaio de potência para a produção de IFN- γ é utilizado. A produção de IFN- γ é uma outra medida do potencial citotóxico. A produção de IFN- γ pode ser medida determinando-se os níveis do IFN- γ da citocina no sangue de um indivíduo tratado com TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles como descritos por exemplo na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, os TILs obtida pelo presente método proveem IFN- γ aumentado no sangue de indivíduos tratados com os TILs do presente método quando comparados aos indivíduos tratados com TILs preparados usando os métodos aludidos como processo 1C, como exemplificado na Figura 13. Em algumas modalidades, um aumento no IFN- γ é indicativo de eficácia de tratamento em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, IFN- γ é aumentado uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes ou cinco vezes ou mais quando comparado com o de um paciente não tratado e/ou quando comparado com o de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, a secreção de IFN- γ é aumentada uma vez quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, a secreção de IFN- γ é aumentada duas vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a

de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, a secreção de IFN- γ é aumentada três vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, a secreção de IFN- γ é aumentada quatro vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, a secreção de IFN- γ é aumentada cinco vezes quando comparado com o de um paciente não tratado e/ou quando comparado com o de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, IFN- γ é medido usando um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN- γ é medido usando um kit Quantikine ELISA. Em algumas modalidades, IFN- γ é medido em TILs *ex vivo* de um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, IFN- γ é medido no sangue em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, IFN- γ é medido no soro em um paciente tratado com os TILs produzidos pelos métodos da presente invenção.

[00573] Em algumas modalidades, os TILs preparados pelos métodos da presente invenção, incluindo aqueles como descritos por exemplo na Figura 20 ou Figura 21, exibem uma dosagem terapeuticamente eficaz aumentada quando comparados com os TILs produzidos pelos outros

métodos, incluindo aqueles não exemplificados na Figura 20 ou Figura 21, tais como por exemplo, métodos aludidos como métodos de processo 1C. Em algumas modalidades, uma dosagem terapeuticamente eficaz significativamente melhorada e/ou uma dosagem terapeuticamente eficaz aumentada são indicativas da eficácia de tratamento e/ou eficácia clínica aumentada para tratamento de câncer. Em algumas modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz se refere à diversidade de repertório de célula T. Em algumas modalidades, um aumento em uma dosagem terapeuticamente eficaz pode ser indicativo de eficácia de tratamento com respeito à administração dos TILs produzidos pelos métodos da presente invenção. Em algumas modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz é aumentada uma vez, duas vezes, dez vezes, 100 vezes, 500 vezes ou 1000 vezes quando comparada com a dos TILs preparados usando métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 20 ou Figura 21. Em algumas modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz é aumentada uma vez quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparado com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 9. Em algumas modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz é aumentada duas vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 9. Em algumas modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz é aumentada dez vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 9. Em algumas

modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz é aumentada 100 vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 9. Em algumas modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz é aumentada 500 vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 9. Em algumas modalidades, a uma dosagem terapeuticamente eficaz é aumentada 1000 vezes quando comparada com a de um paciente não tratado e/ou quando comparada com a de um paciente tratado com TILs preparados usando outros métodos que não aqueles aqui providos incluindo por exemplo, métodos outros que não aqueles inseridos na Figura 9.

1. Métodos de coadministração

[00574] Em algumas modalidades, os TILs produzidos como aqui descritos, incluindo por exemplo TILs derivados a partir de um método descrito na Figura 20 ou Figura 21, podem ser administrados em combinação com um ou mais reguladores do ponto de checagem imune, tais como os anticorpos descritos abaixo. Por exemplo, anticorpos que alvejam PD-1 e que podem ser coadministrados com os TILs da presente invenção incluem, por exemplo, mas não são limitadas a nivolumab (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475 ou MK-3475, Merck; Keytruda®), anticorpo anti-PD-1 humanizado JS001 (ShangHai JunShi), anticorpo anti-PD-1 monoclonal TSR-042 (Tesar, Inc.), Pidilizumab (mAb anti-PD-1 CT-011, Medivation), anticorpo monoclonal anti-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) e/ou anticorpo anti-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), anticorpo monoclonal humano REGN2810 (Regeneron), anticorpo monoclonal humano MDX-1106 (Bristol-Myers

Squibb) e/ou anticorpo de IgG4 anti-PD-1 humanizado PDR001 (Novartis). Em algumas modalidades, o anticorpo PD-1 é do clone: RMP1-14 (IgG de rato) - BioXcell cat# BP0146. Outros anticorpos adequados para o uso nos métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F como aqui descritas são anticorpos anti-PD-1 divulgados na Patente U.S. No. 8.008.449, aqui incorporada por referência. Em algumas modalidades, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo se liga especificamente ao PD-L1 e inibe a sua interação com PD-1, aumentando deste modo a atividade imune. Qualquer anticorpo conhecido na técnica que se ligue ao PD-L1 e rompa a interação entre o PD-1 e PD-L1 e estimule uma resposta imune antitumor, é adequado para o uso nos métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F como aqui descritas. Por exemplo, anticorpos que alvejam PD-L1 e estão em testes clínicos, incluem BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) e MPDL3280A (Genentech). Outros anticorpos adequados que alvejam PD-L1 são divulgados na Patente U.S. No. 7.943.743, aqui incorporada por referência. Será entendido por uma pessoa versada comum que qualquer anticorpo que se ligue ao PD-1 ou PD-L1, rompe a interação PD-1/PD-L1 e estimule uma resposta imune antitumor, é adequado para o uso nos métodos de coadministração com TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F como aqui descritos. Em algumas modalidades, o indivíduo administrado com a combinação de TILs produzidos de acordo com as Etapas A a F é coadministrado com um e anticorpo anti-PD-1 quando o paciente tem um tipo de câncer que seja refratário à administração do anticorpo anti-PD-1 sozinho. Em algumas modalidades, o paciente é administrado com TILs em combinação com e anti-PD-1 quando o paciente tem melanoma refratário. Em algumas modalidades, o paciente é administrado com TILs em combinação com e anti-PD-1 quando o paciente tem carcinoma pulmonar de célula não pequena (NSCLC).

2. Pré-condicionamento com Linfodepleção Opcional de Pacientes

[00575] Em uma modalidade, a invenção inclui um método de tratar um câncer com uma população de TILs, em que um paciente é pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa antes de uma infusão de TILs de acordo com a presente divulgação. Em uma modalidade, a invenção inclui uma população de TILs para o uso no tratamento de câncer em um paciente que foi pré-tratado com quimioterapia não mieloablativa. Em uma modalidade, a população de TILs é para a administração pela infusão. Em uma modalidade, a quimioterapia não mieloablativa é ciclofosfamida 60 mg/kg/d por 2 dias (dias 27 e 26 antes da infusão de TIL) e fludarabina 25 mg/m²/d por 5 dias (dias 27 a 23 antes da infusão de TIL). Em uma modalidade, depois da quimioterapia não mieloablativa e infusão de TIL (no dia 0) de acordo com a presente divulgação, o paciente recebe uma infusão intravenosa de IL-2 (aldesleucina, comercialmente disponível como PROLEUCINA) intravenosamente a 720.000 IU/kg a cada 8 horas para tolerância fisiológica. Em certas modalidades, a população de TILs é para o uso no tratamento de câncer em combinação com IL-2, em que a IL-2 é administrada depois da população de TILs.

[00576] Achados experimentais indicam que a linfodepleção antes da transferência adotiva de linfócitos T específicos de tumor desempenha um papel chave no realce da eficácia de tratamento pela eliminação de células T reguladoras e elementos de competição do sistema imune ('coletores de citocina'). Consequentemente, algumas modalidades da invenção utilizam uma etapa de linfodepleção (algumas vezes também aludida como "condicionamento imunossupressivo") no paciente antes da introdução dos TILs da invenção.

[00577] No geral, a linfodepleção é obtida usando a administração de fludarabina ou ciclofosfamida (a forma ativa sendo aludida como mafosfamida) e combinações dos mesmos. Tais métodos são descritos em Gassner, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 2011, 60, 75–85, Muranski, *et*

al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668–681, Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233-5239 e Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346–2357, todas das quais são aqui incorporadas por referência nas suas totalidades.

[00578] Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma concentração de 0,5 µg/mL a 10 µg/mL de fludarabina. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma concentração de 1 µg/mL de fludarabina. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada em uma dosagem de 10 mg/kg/dia, 15 mg/kg/dia, 20 mg/kg/dia, 25 mg/kg/dia, 30 mg/kg/dia, 35 mg/kg/dia, 40 mg/kg/dia ou 45 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 2 a 7 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 4 a 5 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com fludarabina é administrado por 4 a 5 dias a 25 mg/kg/dia.

[00579] Em algumas modalidades, a mafosfamida, a forma ativa da ciclofosfamida, é obtida em uma concentração de 0,5 µg/mL a 10 µg/mL pela administração de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, a mafosfamida, a forma ativa da ciclofosfamida, é obtida em uma concentração de 1 µg/mL pela administração de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada em uma dosagem de 100 mg/m²/dia, 150 mg/m²/dia, 175 mg/m²/dia, 200 mg/m²/dia, 225 mg/m²/dia, 250 mg/m²/dia, 275 mg/m²/dia ou 300 mg/m²/dia. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada intravenosamente (isto é, i.v.). Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 2 a 7 dias a 35 mg/kg/dia. Em algumas modalidades, o tratamento com ciclofosfamida é administrado por 4 a 5 dias a 250 mg/m²/dia i.v. Em algumas modalidades, o tratamento com

ciclofosfamida é administrado por 4 dias a 250 mg/m²/dia i.v.

[00580] Em algumas modalidades, a linfodepleção é realizada pela administração da fludarabina e da ciclofosfamida juntas a um paciente. Em algumas modalidades, a fludarabina é administrada a 25 mg/m²/dia i.v. e a ciclofosfamida é administrada a 250 mg/m²/dia i.v. em 4 dias.

[00581] Em uma modalidade, a linfodepleção é realizada pela administração de ciclofosfamida em uma dose de 60 mg/m²/dia durante dois dias seguidos pela administração de fludarabina em uma dose de 25 mg/m²/dia durante cinco dias.

3. Regimes de IL-2

[00582] Em uma modalidade, o regime de IL-2 compreende um regime de alta dose de IL-2, em que o regime de alta dose de IL-2 compreende aldesleucina ou um biossimilar ou variante da mesma, administrados intravenosamente começando no dia depois da administração de uma porção terapêuticamente eficaz da população terapêutica de TILs, em que a aldesleucina ou um biossimilar ou variante da mesma é administrada em uma dose de 0,037 mg/kg ou 0,044 mg/kg IU/kg (massa corporal do paciente) usando infusões intravenosas de bolo de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância, para um máximo de 14 doses. A seguir de 9 dias de repouso, este programa pode ser repetido por mais 14 doses, para um máximo de 28 doses no total.

[00583] Em uma modalidade, o regime de IL-2 compreende um regime de IL-2 decrescente. Os regimes de IL-2 decrescentes foram descritos em O'Day, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 1999, 17, 2752-61 e Eton, *et al.*, *Cancer* 2000, 88, 1703-9, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência. Em uma modalidade, um regime de IL-2 decrescente compreende 18×10⁶ IU/m² administrados intravenosamente durante 6 horas, seguidos por 18×10⁶ IU/m² administrados intravenosamente durante 12 horas, seguidos por 18×10⁶ IU/m² administrados intravenosamente durante 24 horas, seguidos por 4,5×10⁶

IU/m² administrados intravenosamente durante 72 horas. Este ciclo de tratamento pode ser repetido a cada 28 dias para um máximo de quatro ciclos. Em uma modalidade, um regime de IL-2 decrescente compreende 18.000.000 IU/m² no Dia 1, 9.000.000 IU/m² no Dia 2 e 4.500.000 IU/m² nos Dias 3 e 4.

[00584] Em uma modalidade, o regime de IL-2 compreende a administração de IL-2 peguilada a cada 1, 2, 4, 6, 7, 14 ou 21 dias em uma dose de 0,10 mg/dia a 50 mg/dia.

4. Transferência de Célula Adotiva

[00585] A transferência de célula adotiva (ACT) é uma forma muito eficaz de imunoterapia e envolve a transferência de células imunes com atividade antitumor em pacientes com câncer. ACT é um método de tratamento que envolve a identificação, *in vitro*, de linfócitos com atividade antitumor, a expansão *in vitro* destas células para números grandes e a sua infusão no hospedeiro carregando câncer. Os linfócitos usados para a transferência adotiva podem ser derivados do estroma de tumores ressecados (linfócitos infiltrantes de tumor ou TILs). TILs para ACT podem ser preparados como aqui descrito. Em algumas modalidades, os TILs são preparados, por exemplo, de acordo com um método como descrito na Figura 9. Eles também podem ser derivados ou do sangue se eles forem geneticamente engenheirados para expressar receptores de célula T (TCRs) antitumor ou receptores de antígeno quiméricos (CARs), enriquecidos com culturas celulares de linfócito de tumor misto (MLTCs) ou clonados usando células apresentando antígeno e peptídeos derivados de tumor autólogos. A ACT na qual os linfócitos se originam do hospedeiro carregando câncer para serem infundidos é chamada de ACT autóloga. A Publicação U.S. No. 2011/0052530 se refere a um método para realizar a terapia de célula adotiva para promover a regressão do câncer, primariamente para o tratamento de pacientes sofrendo de melanoma metastático, que é incorporada por referência na sua totalidade quanto a estes métodos. Em algumas modalidades, TILs

podem ser administrados como aqui descrito. Em algumas modalidades, TILs podem ser administrados em uma dose única. Tal administração pode ser pela injeção, por exemplo, injeção intravenosa. Em algumas modalidades, TILs e/ou linfócitos citotóxicos podem ser administrados em doses múltiplas. A dosagem pode ser de uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes ou mais do que seis vezes por ano. A dosagem pode ser de uma vez ao mês, uma vez a cada duas semanas, uma vez por semana ou uma vez dia sim dia não. A administração de TILs e/ou linfócitos citotóxicos pode continuar tanto tempo quanto necessário.

EXEMPLOS

[00586] As modalidades aqui abrangidas são agora descritas com referência aos seguintes exemplos. Estes exemplos são providos apenas para o propósito de ilustração e a divulgação aqui abrangida não deve de nenhum modo ser interpretada como sendo limitada por estes exemplos, mas ao invés deve ser interpretada abranger qualquer e todas as variações que se tornam evidentes como um resultado da divulgação aqui provida.

EXEMPLO 1. Produção de uma terapia de TIL criopreservada.

[00587] Este exemplo descreve a fabricação com cGMP de terapia de TIL em Frascos G-Rex de acordo com as Boas Práticas de tecido correntes e as Boas Práticas de Fabricação correntes.

REFERÊNCIA DE PROCESSO Plano de Expansão

Dia Estimado (pós-semeadura)	Atividade	Critérios Alvos	Vasos Previstos	Volume Total Estimado (mL)
0	Dissecação de Tumor	≤ 50 fragmentos de tumor por G-Rex100MCS desejável	1 frasco G-Rex100MCS	≤ 1000
11	Semeadura no REP	5 a 200×10^6 células viáveis por G-Rex500MCS	1 frasco G-Rex500MCS	≤ 5000
16	Divisão no REP	1×10^9 células viáveis por G-Rex500MCS	≤ 5 frascos G-Rex500MCS	≤ 25000
22	Colheita	Células disponíveis totais	3 a 4 bolsas CS-750	≤ 530

Volumes do Frasco:

Tipo de Frasco	Volume de Trabalho/Frasco (mL)
G-Rex100MCS	1000
G-Rex500MCS	5000

EQUIPAMENTO

Lista de Equipamento: Dia 0 Preparação de Meios CM1 /Preparação da Lavagem de Tumor/Dissecação de Tumor:

- [00588]
- Medidor Magnehelic
 - Cabine de Segurança Biológica (BSC)
 - Incubador
 - Analisador de CO₂
 - Micropipetador (100 a 1000 µL)
 - Pipet-Aid®
 - Bomba de Repetição Baxa
 - Selador de Tubo Sebra
 - Refrigerador 2 a 8°C
 - Congelador -80°C
 - Congelador -20°C
 - Cronômetro

Lista de Equipamento: Preparação CM2/Dia 11 semeadura no REP

- [00589]
- Medidor Magnehelic
 - Cabine de Segurança Biológica (BSC)
 - Incubador
 - Incubador
 - Analisador de CO₂
 - Banho Seco
 - Banho de Água
 - CytoTherm
 - Soldador
 - Gatherex
 - NC200 NucleoCounter
 - Bomba de Repetição Baxa
 - Balança Seladora de Tubo Sebra

Lista de Equipamento: Preparação CM2/Dia 11 semeadura no REP

- [00590]
- Centrífuga
 - Micropipetador (100-1000µL)
 - Pipet-Aid
 - Cronômetro
 - Refrigerador 2-8°C
 - Congelador -80°C
 - Congelador de Taxa Congelada
 - Congelador de Armazenagem LN2 (Quarentena)
 - Congelador -20°C

Lista de Equipamento: Preparação CM4 /Dia 16

- [00591]
- Medidor Magnehelic
 - Cabine de Segurança Biológica (BSC)
 - Incubador
 - Incubador
 - Analisador de CO2
 - soldador
 - soldador
 - Gatherex
 - NC200 NucleoCounter
 - Bomba de Repetição Baxa
 - Balança Seladora de Tubo Sebra
 - Micropipetador (100-1000µL)
 - Pipet-Aid
 - Refrigerador 2-8°C
 - Congelador -80°C

Lista de Equipamento: Formulação Dia 22, Enchimento, Criopreservação

- [00592]
- Medidor Magnehelic
 - Cabine de Segurança Biológica (BSC)

- Incubador
- Incubador
- Analisador de CO₂
- soldador
- Gatherex
- NC200 NucleoCounter
- Bomba de Repetição Baxa
- Balança Seladora de Tubo Sebra
- Micropipetador (20-200µL) Pipet-Aid

Lista de Equipamento: Formulação Dia 22, Enchimento, Criopreservação

- [00593]
- Pipet-Aid
 - Refrigerador 2-8°C
 - Congelador -80°C
 - Congelador de Taxa Congelada
 - Congelador de Armazenagem LN₂
 - Congelador de Armazenagem LN₂ (Quarentena)
 - Sistema de processamento de célula LOVO

7.0 MATERIAIS

Materiais: Dia 0 Preparação de Meios CM1 /Preparação da Lavagem de Tumor/Tumor

- [00594]
- Dissecção
 - Bisturis Descartáveis, Estéril
 - Pipetas Sorológicas de 50 mL, Estéril
 - Pipeta Plástica Sorológica de 1 mL, Estéril
 - Pipeta Sorológica de 10 mL, Estéril
 - Tubo de Centrífuga, 50 mL, 28 x 114 mm, Base Cônica, Tampa de Rosca, PP, Estéril
 - Pipeta Sorológica de 25 mL, Estéril
 - Pipeta Sorológica de 5 mL, Estéril

- Filtro de Cultura de Tecido Descartável, Série MF75, 1000 mL, Filtro aPES, 0,2 µm, Estéril
- Pipetas, Sorológicas de 100 mL
- 2-mercaptoetanol 1000X, líquido, 55 mM em D-PBS
- Solução Salina de Sódio Balanceada de Hank (1X), Líquido, w/o Cloreto de Cálcio, Cloreto de Magnésio, Sulfato de Magnésio
- GlutaMAX 1-200 mM (100X), líquido
- Pontas de Pipeta ART Barrier, 1000 µL, Individualmente Embalada, Estéril
- Placa de Petri de 150 mm, Extra-Profunda, Estéril
- Placas de Fixação de 6 poços, Ultra-Baixa, Área de Crescimento do Poço 9,5 cm², PS, Estéril
- Pipetas de Transferência de Uso Geral da Thermo Scientific Samco. 7,7 mL, Estéril
- Extremidade de Luer Lock Macho de Transferência de Fluido de Bomba Repetidora
- Forceps Longo 8", Estéril
- Sulfato de Gentamicina, 50 mg/mL estoque
- Forceps Descartável Científico, 4,5", Aço Inoxidável, Estéril
- Placa de Petri 100 mm, Profundidade Extra Estéril
- Sistema de Dispensa de Líquido Pumpmatic
- Sulfato de Gentamicina, 50 mg/mL estoque
- Tampa de Seringa de Função Dual, Vermelha
- RPMI-1640, Garrafa de 1 L
- Frasco de Sistema Fechado G-Rex 100M
- Régua estéreis
- IL-2 Reconstituído
- Amostra de Tumor Humano, Cabeça e Pescoço ☐ N/A
- Amostra de Tumor Humano, Cervical ☐ N/A

- Soro Humano GemCell AB, Inativado por calor □ N/A
- Amostra de Tumor Humano, Melanoma
- Soro Humano GemCell AB, Inativado por Calor

Materiais: Preparação CM2/Dia 11 semeadura no REP

- [00595]
- Seringa Luer-Lok, 60 mL Agulha Estéril 16G x 1,5” Estéril
 - Pipetas Sorológicas de 50 mL, Estéril
 - Pipeta Plástica Sorológica de 1 mL, Estéril
 - Frascos Criotubo Internamente Rosqueado Nunc, Estéril
 - Pipeta Sorológica de 10 mL, Estéril
 - Tubo de Centrífuga, 15 mL
 - Tubo de Centrífuga, 50 mL
 - Pipetas, Sorológicas de 100 mL
 - Seringa, 1 cc Estéril Luer-Lok
 - Seringa de 3 mL, Ponto Luer-Lok, Estéril
 - Pipeta Sorológica de 5 mL, Estéril
 - Recebedor de Unidade de Filtração Nalgene Série *MF75*, 250 mL, Estéril
 - Recebedor de Unidade de Filtração Nalgene Série MF75, 500 mL, Estéril
 - Unidade de Filtração Descartável Estéril de Fluxo Rápido de 1000 mL Nalgene, 0,22 µm de PES
 - CrioStor CS-10
 - 2-mercaptoetanol 1000X Líquido, 55 mM em D-PBS
 - GlutaMAX 1-200 mM (100X), líquido
 - Pontas de Pipeta Estéril de 1.000 µL ART Barrier, Embalagem Individual
 - Cassetes VIA1
 - Recipiente de Pacote de Transferência, 1000 mL p/ Acoplador, Estéril

- Pacote de Transferência 300 mL p/ Acoplador
- Almofadas de Álcool Estéreis
- Extremidades Luer Lock Macho de Transferência de Fluido

de Bomba Repetidora

- CTS AIM V Garrafa 1L
- MACS GMP CD3 puro (OKT-3)
- Sulfato de Gentamicina, 50 mg/mL Estoque
- Tubo de 4" p/ Pino de Perfuração e Adaptador de Seringa
- Seringa Apenas Luer-Lok 10 mL
- Tubulação, Tubo de Distribuição Luer Macho de Quatro

Pontas

• Conjunto de Administração de Sangue por Gravidade tipo Y
sem nenhum sítio de injeção, filtro de sangue de 170 µm

- Sistema de Dispensa de Líquido Pumpmatic
- Bolsa de 3 Orifícios Labtainer de 10 L
- Sulfato de Gentamicina, 50 mg/mL estoque
- Seringa de 100 mL
- Bolsa de Cultura de 3000 mL
- Origen Cell Connect CC2
- Tampa de Seringa de Função Dual Vermelha
- RPMI-1640, Garrafa 1 L
- Frasco G-Rex 500M Sistema Fechado
- IL-2 Reconstituído
- Células De alimentação Irradiadas Alogênicas
- Alogênica Irradiadas Células De alimentação
- Soro Humano, tipo AB(HI) Gemini
- Soro Humano, tipo AB(HI) Gemini

Materiais: CM4 Preparação/Dia 16

- Seringa Luer-Lok, 60 mL Estéril

- Pipeta Plástica Sorológica de 1 mL, Estéril
- Frascos Cryotube Nunc Internamente Rosqueados, Estéril
- Pipetas Sorológicas 10 mL, Estéril
- Tubo de Centrífuga, 15 mL
- Tubo de Centrífuga, 50 mL
- Pipetas, Sorológicas 100 mL
- Seringa com Luer-Lock, estéril, 3 mL
- Pipeta Sorológica de 5 mL, Estéril
- Seringa apenas Luer-Lok 10 mL
- Nalgene Série *MF75*
- Recebedor de Unidade de Filtração, 250 mL, Estéril
- GlutaMAX1-200 mM (100X), líquido
- Pontas de Pipeta ART Barrier, 1000 µL, Individualmente

Embalada, Estéril

- Cassetes VIA1

Materiais: Preparação CM4 /Dia 16

[00596] • Recipiente de Pacote de Transferência, 1000 mL com Acoplador, Estéril

- Almofadas de Álcool Estéreis
- Extremidades Luer Lock Macho de Transferência de Fluido

de Bomba Repetidora

- CTS AIM-V 1000 mL □ N/A
- Tubulação de 4" de Conjunto de Transferência de Plasma

com Adaptador Luer Fêmea

- Seringa Estéril Luer-Lok de 30 mL
- Bolsa CTS AIM V de 10 L
- Sistema de Dispensa de Líquido Pumpmatic
- Bolsa de 3 Orifícios de 10 L Labtainer
- Tampa de Seringa de Função Dual Vermelha

- Frasco G-Rex500M Sistema Fechado
- IL-2 Reconstituído

[00597] Materiais: Formulação do Dia 22, Enchimento, Criopreservação

- Seringa Luer-Lok, 60 mL Estéril
- Agulha 16G x 1,5” Estéril
- Pipetas Sorológicas 50 mL, Estéril
- Frascos Criotubes Nunc Internamente Rosqueados, Estéril
- Pipeta Sorológica de 10 mL, Estéril
- Tubo de Centrífuga, 15 mL
- Tubo de Centrífuga, 50 mL
- Seringa, 1cc Estéril Luer-Lok
- Seringa de 3 mL, Ponto Luer-Lok, Estéril
- Pipeta Sorológica de 25 mL, Estéril
- Pipeta Sorológica de 5 mL, Estéril
- Seringa apenas Luer-Lok 10 mL
- Pipetas, Sorológicas 100 mL
- Pontas de Pipeta Estéreis ART Barrier, 200 µL Embalagem

Individual

- Cassetes VIA1
- Injeção Plasma-Lyte A 1L
- Conjunto Descartável de Lavagem de Célula LOVO
- Kit de Bolsa Auxiliar LOVO
- Almofadas de Álcool Estéril
- Extremidades Luer Lock Macho de Transferência de Fluido

de Bomba Repetidora

- CTS AIM V Garrafa de 1 L
- Albumina Humana 25%
- Tubulação de 4” de Conjunto de Transferência de Plasma

com Adaptador Luer Fêmea

- Tubulação, Tubo de Distribuição de Macho Quatro
- Administração de Sangue por Gravidade
- Conjunto tipo Y sem nenhum sítio de injeção, filtro de

sangue de 170 µm

- Sistema de Dispensa de Líquido Pumpmatic
- Bolsa de 3 Orifícios Labtainer de 10 L
- Seringa de 100 mL
- Crio bolsa CS750
- Bolsa de Cultura de 3 L
- Origen Cell Connect CC2
- Tampa de Seringa de Função Dual Vermelha
- Criostor CS10, Bolsa de 100 mL
- Ponta de Dispensa, Ventilada
- IL-2 Reconstituída

PROCESSO

[00598] 8.1 Dia 0 Preparação de Meios CM1

8.1.1 Sanitização de sala checada, depuração de linha e materiais. Sanitização de sala confirmou-se,

8.1.2 Conclusão garantida da tabela de pré-processamento.

[00599] 8.1.3 Monitoramento Ambiental. Antes do processamento, monitoramento ambiental pré-processo garantiu-se que foi iniciado.

[00600] 8.1.4 Meios RPMI 1640 Preparou-se Na BSC, usando uma pipeta apropriadamente dimensionada, removeu-se 100,0 mL de 1000 mL de Meios RPMI 1640 e colocou-se dentro de um recipiente apropriadamente dimensionado rotulou-se “Resíduo”.

[00601] 8.1.5 Na BSC adicionou-se reagentes à garrafa de Meios RPMI 1640. Adicionou-se os seguintes reagentes à garrafa de Meios RPMI 1640 como mostrado na tabela. Volumes adicionou-se registrou-se.

[00602] Quantidade Adicionou-se por garrafa: Soro AB Humano Inativado por Calor (100,0 mL); GlutaMax (10,0 mL); Sulfato de gentamicina, 50 mg/mL (1,0 mL); 2-mercaptoetanol (1,0 mL)

[00603] 8.1.6 Misturou-se meios. Garrafa de Meios RPMI 1640 da etapa 8.1.5 tampada e garrafa agitada para garantir que os reagentes fossem completamente misturou-se.

[00604] 8.1.7 Meios RPMI filtrados. Meios RPMI 1640 da etapa 8.1.6 filtrados através da unidade de filtração de 0,22 micron de 1 L.

[00605] 8.1.8 Meios filtrados rotulados. Os meios filtrados assepticamente tampados e rotulados com a seguinte informação.

[00606] 8.1.9 Removeu-se os materiais desnecessários da BSC. Reagentes de meios passados para fora da BSC, deixados Sulfato de gentamicina e HBSS na BSC para Preparação de Meios Lavados Formulados na Seção 8.2.

[00607] 8.1.10 Consumíveis não usados armazenados. Transferiu-se quaisquer reagentes de meios abertos/descongelados remanescentes para condições de armazenagem apropriadas ou descartadas no resíduo.

[00608] NOTA: Designada a validade aberta apropriada para os reagentes de meios para a Nota de Processo 5,9 e rotulou-se com número de lote do registro de batelada

[00609] 8.1.11 Descongelou-se a alíquota de IL-2. Descongelou-se uma alíquota de IL-2 de 1,1 mL (6×10^6 IU/mL) (BR71424) até que todo o gelo tenha derretido. IL-2 Registrada: Lote # e Validade (NOTA: Garantiu-se que o rótulo de IL-2 foi fixado).

[00610] 8.1.12 Solução de estoque de IL-2 transferiu-se para os meios. Na BSC, transferiu-se 1,0 mL de solução de estoque de IL-2 para a Garrafa de Meios CM1 Dia 0 preparada na etapa 8.1.8. Adicionou-se Meios CM1 Dia 0 garrafa 1 e IL-2 (6×10^6 IU/mL) 1,0 mL.

[00611] 8.1.13 Misturou-se e Rerrotulou-se. Tampada e turbilhonada a

garrafa para misturar meios contendo IL-2. Rotulou-se como “Meios CM1 Dia 0 Completos” e designado novo número de lote.

[00612] 8.1.14 Meios de Amostra por Plano de Amostra. Removeu-se 20,0 mL de meios usando uma pipeta apropriadamente dimensionada e dispensou-se dentro de um tubo cônico de 50 mL.

[00613] 8.1.15 Rotulou-se e armazenou-se. Amostra rotulada com rótulo de inventário de plano de amostra e amostra armazenada “Reter Meios” a 2-8°C até submetida ao Login para testar por Plano de Amostra.

[00614] 8.1.16 Assinado para Amostragem. Garantiu-se que que folha de plano de amostra LIMS foi completado para remoção da amostra.

[00615] 8.1.17 Preparou-se tubo cônico “Pedaços de Tecido”. Na BSC, transferiu-se 25,0 mL de “Meios CM1 Dia 0 Completo” (preparada na etapa 8.1.13) para um tubo cônico de 50 mL. Rotulou-se o tubo como “Pedaços de Tecido” e número de lote do registro de batelada.

[00616] 8.1.18 Passado G-Rex100MCS dentro da BSC. G-Rex100MCS assepticamente passado (W3013130) dentro da BSC.

[00617] 8.1.19 Preparou-se G-Rex100MCS. Na BSC, fechadas todas as braçadeiras no G-Rex100MCS, deixando a braçadeira do filtro de ventilação aberta.

[00618] 8.1.20 Preparou-se G-Rex100MCS. Conectada a linha vermelha do frasco G-Rex100MCS à extremidade de diâmetro maior do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora (W3009497) por intermédio da conexão luer.

[00619] 8.1.21 Preparou-se a Bomba Baxa. Bomba Baxa Montou-se próxima à BSC. Seção de tubulação de bomba removida do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora da BSC e instalada na bomba repetidora.

[00620] 8.1.22 Preparou-se para bombear meios. Dentro da BSC, removida a seringa do Sistema de Dispensa de Líquido Pumpmatic (PLDS)

(W3012720) e descartada.

[00621] NOTA: Garantiu-se que não comprometer a esterilidade da pipeta PLDS.

[00622] 8.1.23 Preparou-se para bombear meios. Conectada pipeta PLDS à extremidade de diâmetro menor do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora por intermédio de conexão luer e colocada a ponta da pipeta nos “Meios CM1 Dia 0 Completo” (preparada na etapa 8.1.13) para aspiração. Abertas todas as braçadeiras entre meios e G-Rex100MCS.

[00623] 8.1.24 Meios CM1 Completos Bombeados dentro do frasco G-Rex100MCS. Ajustar a velocidade da bomba para “Alto” e “9” e bombeados todos os Meios CM1 Dia 0 Completos dentro do frasco G-Rex100MCS. Uma vez que todos os meios foram transferidos, depurada a linha e parada a bomba.

[00624] 8.1.25 Desconectada a bomba do frasco. Garantiu-se que que todas as braçadeiras foram fechadas no frasco, exceto filtro de ventilação. Removeu-se o conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora da linha de meios vermelha e colocada uma tampa vermelha (W3012845) na linha de meios vermelha.

[00625] 8.1.26 Selo aquecido. Removeu-se frasco G-Rex100MCS da BSC, selo aquecido (pela Nota de Processo 5.12) fora da tampa vermelha da linha vermelha próxima ao luer terminal.

[00626] 8.1.27 G-Rex100MCS Rotulou-se. O frasco G-Rex100MCS rotulou-se com QA provido no rótulo de processo “Dia 0”. Rótulo de amostra “Dia 0” fixado abaixo.

[00627] 8.1.28 Incubadora Monitorado. Parâmetros de Incubadora: Mostrador LED de Temperatura: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; Porcentagem de CO_2 : $5,0 \pm 1,5\%$ de CO_2

[00628] 8.1.29 Aqueceu-se os Meios. Colocou-se os tubos cônicos de 50 mL rotulou-se “Fragmentos de Tecido” preparada na etapa 8.1.17 e os G-

Rex100MCS preparada na etapa 8.1.27 em incubadora por ≥ 30 minutos de aquecimento. Tempos de aquecimento registrou-se abaixo. Registrou-se se o Tempo de Aquecimento foi ≥ 30 minutos (Sim/Não).

[00629] [Cônicos de Fragmentos de Tecido ou GRex100MCS]

[00630] 8.1.30 Revisada a Seção 8.1.

[00631] 8.2 Preparação de Meios de Lavagem de Tumor Dia 0

[00632] 8.2.1 Adicionou-se Gentamicina ao HBSS. Na BSC, adicionou-se 5,0 mL de Gentamicina (W3009832 ou W3012735) a 1 x 500 mL da garrafa de Meios HBSS (W3013128). Volumes registrou-se. Adicionou-se por garrafa: HBSS (500,0 mL); Sulfato de gentamicina, 50 mg/ml (5,0 mL)

[00633] 8.2.2 Garrafa de HBSS tampada e turbilhonada. HBSS tampada contendo gentamicina preparada na etapa 8.2.1 e garrafa agitada para garantir que os reagentes são completamente misturou-se.

[00634] 8.2.3 Solução Filtrada. HBSS filtrado contendo gentamicina preparada na etapa 8.2.1 através de uma unidade de filtração de 0,22 microns de 1 L (W1218810).

[00635] 8.2.4 Os meios filtrados assepticamente tampados e rotulados. Os meios filtrados assepticamente tampados e rotulados com as seguintes informações. Prosseguido para a SEÇÃO 8.3.

[00636] 8.2.5 Revisada a Seção 8.2.

[00637] 8.3 Processamento do Tumor Dia 0

8.3.1 Tumor Obteve-se. Espécime de tumor obteve-se da QAR e transferiu-se em conjunto de 2 a 8°C imediatamente para processamento. Garantiu-se que toda a informação necessária fosse registrada no Registro de Lote de Remessa de tumor.

[00638] 8.3.2 Informação de Tumor Registrada.

[00639] 8.3.3 Rótulo de Tumor Anexado. Fixação de Tumor Anexado. Adesivo de liberação de QAR abaixo. Registro de Lote de Remessa de Tumor

fixado como #5.

[00640] 8.3.4 Passado em materiais necessários para dissecação de tumor dentro da BSC.

[00641] 8.3.5 Materiais Abertos. Abertos todos os materiais dentro da BSC, garantindo não comprometer a esterilidade dos itens.

[00642] 8.3.6 Rotulou-se os materiais. Rotulou-se três tubos cônicos de 50 ml: o primeiro como “Fórceps,” o segunda como “Bisturi,” e o terceiro como “Meios de Lavagem de Tumor Fresco”. Placas de Petri 5 x 100 mm rotuladas como “Lavagem 1,” “Lavagem 2,” “Lavagem 3,” “Retenção,” e “Desfavoráveis.” Rotulada uma placa de 6 poços como “Fragmentos Intermediários Favoráveis.”

[00643] 8.3.7 Meios de Lavagem de Tumor Aliquotados. Usando uma pipeta apropriadamente dimensionada, transferiu-se 5,0 mL de “Meios de Lavagem de Tumor” preparada na etapa 8.2.4 dentro de cada poço de uma placa de 6 poços para fragmentos de tumor intermediários favoráveis (30,0 mL totais). NOTA: Os fórceps e bisturis foram armazenados em seus respectivos cônicos de Meios de Lavagem de Tumor como necessário durante a lavagem de tumor e processos de dissecação.

[00644] 8.3.8 Meios de Lavagem de Tumor Aliquotados. Usando uma pipeta apropriadamente dimensionada, transferiu-se 50,0 mL de “Meios de Lavagem de Tumor” preparada na etapa 8.2.4 dentro de cada placa de Petri de 100 mm para “Lavagem 1,” “Lavagem 2,” “Lavagem 3,” e “Retenção” (200,0 mL totais).

[00645] 8.3.9 Meios de Lavagem de Tumor Aliquotados. Usando uma pipeta apropriadamente dimensionada, transferência de 20,0 mL de “Meios de Lavagem de Tumor” preparada na etapa 8.2.4 dentro de cada cônico de 50 mL (60,0 mL totais).

[00646] 8.3.10 Tampas Preparou-se para Pedacos de Tumor. Tampas assepticamente removidas de duas placas de 6 poços. As tampas foram

utilizadas para pedaços de tumor selecionados. NOTA: Por todo o processamento de tumor, NÃO cruzar as placas de cultura de tecido abertas e tampas.

[00647] 8.3.11 Passado o tumor para dentro da BSC. Assepticamente passado o tumor para dentro da BSC. Registrou-se o tempo de início de processamento.

[00648] 8.3.12 Lavagem de Tumor 1 Usando fórceps de 8” (W3009771), removeu-se o tumor da garrafa de espécimen transferiu-se para a placa “Lavagem 1” preparada na etapa 8.3.8.

[00649] NOTA: retida a solução em garrafa de espécime.

[00650] 8.3.13 Lavagem de Tumor 1 Usando fórceps, tumor suavemente lavado tempo do cronômetro abaixo: espécime e deixado descansar por ≥ 3 minutos. Tempo de lavagem registrou-se (MM:SS).

[00651] 8.3.14 Amostra de Biocarga Preparou-se por Plano de Amostra. Transferiu-se 20,0 mL (ou volume disponível) de solução da garrafa de espécime de tumor dentro de um cônico de 50 mL por Plano de Amostra.

[00652] 8.3.15 Amostra rotulada e armazenada. Amostra de biocarga colhida na etapa 8.3.14 rotulada com rótulo de inventário de plano de amostra e armazenada de 2 a 8°C até submetida para teste.

[00653] 8.3.16 Assinado para Amostragem. Garantiu-se que que folha de plano de amostra LIMS foi completado para remoção da amostra.

[00654] 8.3.17 Lavagem de Tumor 2. Usando um novo conjunto de fórceps removeu-se o tumor da placa de “Lavagem 1” e transferiu-se para a placa de “Lavagem 2” preparada na etapa 8.3.8.

[00655] 8.3.18 Lavagem de Tumor 2. Usando fórceps, espécime de tumor lavado pela agitação suave por ≥ 3 minutos e deixado descansar. Tempo registrou-se.

[00656] 8.3.19 Preparou-se gotas de Meios de Lavagem de Tumor para os pedaços de tumor desejados. Usando uma pipeta de transferência,

colocadas 4 gotas individuais de Meios de Lavagem de Tumor a partir do cônico preparada na etapa 8.3.9 dentro de cada um dos 6 círculos nas tampas erguidas das placas de 6 poços (2 tampas). Colocada uma gota extra nos dois círculos para um total de 50 gotas.

[00657] 8.3.20 Lavagem de Tumor 3. Usando fórceps, removeu-se o tumor da placa de “Lavagem 2” e transferiu-se para a placa de “Lavagem 3” preparada na etapa 8.3.8.

[00658] 8.3.21 Lavagem de Tumor 3. Usando fórceps, espécime de tumor lavado agitando-se suavemente e deixado descansar por ≥ 3 minutos. Tempo registrou-se.

[00659] 8.3.22 Preparou-se a placa de dissecação de tumor. Colocada uma régua sob a tampa da placa de 150 mm.

[00660] 8.3.23 Transferiu-se Tumor para a Placa de Dissecação. Usando fórceps, assepticamente transferiu-se o espécime de tumor para a tampa da placa de dissecação de 150 mm.

[00661] 8.3.24 Tumor Medido. Arranjados todos os pedaços de espécime de tumor de ponta a ponta e registrou-se o comprimento global aproximado e o número de fragmentos. Tirada uma foto clara de cada espécime de tumor.

[00662] 8.3.25 Tumor Avaliado. Avaliado o tumor quanto ao tecido necrótico/ gorduroso. Avaliado se $> 30\%$ da área de tumor inteira observada ser necrótica e/ou tecido gorduroso; se sim, controle da área contatada para garantir que o tumor fosse de tamanho apropriado, depois prosseguido para a etapa 8.3.26. Avaliado se $< 30\%$ da área de tumor inteira foram observados ser necrótica ou tecido gorduroso; se sim, prosseguido para a etapa 8.3.27 e a limpeza da dissecação NÃO foi realizada.

[00663] 8.3.26 Se aplicável: Dissecação de Limpeza. Se o tumor foi grande e $>30\%$ de tecido exterior foi observado ser necrótico/gorduroso, realizou-se “dissecação de limpeza” pela remoção de tecido

necrótico/gorduroso enquanto preserva a estrutura interna do tumor usando uma combinação de bisturi e/ou fórceps. NOTA: Para manter a estrutura interna de tumor, usar apenas pressão de corte vertical. Não cortar em um movimento de serra com bisturi. NOTA: Tecidos gordurosos, necróticos e estranhos foram colocou-se na placa de desfavoráveis.

[00664] 8.3.27 Dissecção de Tumor Usando uma combinação de bisturi e/ou fórceps, cortar o espécime de tumor em fragmentos uniformes, apropriadamente dimensionados (até 6 fragmentos intermediários). NOTA: Para manter a estrutura interna de tumor, usar apenas pressão de corte vertical. Não cortar em um movimento de serra com bisturi. NOTA: Garantiu-se que manter os fragmentos intermediários não dissecados completamente submergidos em “Meios de Lavagem de Tumor” (preparada na etapa 8.2.4).

[00665] 8.3.28 Transferiu-se Fragmentos de Tumor Intermediários. Transferiu-se cada fragmento intermediário para a placa de “retenção” da etapa 8.3.8.

[00666] 8.3.29 Fragmentos de Tumor Dissecados. Manipulado um fragmento intermediário em um tempo, dissecado o fragmento de tumor intermediário na placa de dissecção em pedaços de aproximadamente 3 x 3 x 3 mm no tamanho, minimizando a quantidade de tecidos hemorrágicos, necróticos e/ou gordurosos em cada pedaço. NOTA: Para manter a estrutura interna de tumor, usar apenas pressão de corte vertical. Não cortar em um movimento de serra com bisturi.

[00667] 8.3.30 Seleccionados Pedaços de Tumor. Seleccionados até oito (8) pedaços de tumor sem tecido hemorrágico, necrótico e/ou gorduroso. Usou-se a régua para referência. Continuada a dissecção até que 8 pedaços favoráveis tenham sido obteve-se ou o fragmento intermediário inteiro tenha sido dissecado. Transferiu-se cada pedaço selecionado para umas das gotas de “Meios de Lavagem de Tumor” preparada na etapa 8.3.19.

[00668] 8.3.31 Armazenado Fragmentos Intermediários para Prevenir

Secagem. Depois selecionar até oito (8) pedaços do fragmento intermediário, colocadas as sobras de fragmento intermediário dentro de um novo poço único da placa de 6 poços de “Fragmentos Intermediários Favoráveis” preparada na etapa 8.3.7. NOTA: Tecido gorduroso ou necrótico foi colocou-se na placa “Desfavoráveis” (preparada na etapa 8.3.6).

[00669] 8.3.32 Repetida a Dissecação de Fragmento Intermediário. Prosseguido para o fragmento intermediário seguinte, repetida as Etapas 8.3.29-8.3.31 até que todos fragmentos intermediários tivessem sido processados, obteve-se bisturis e fórceps frescos como necessário.

[00670] 8.3.33 Número determinou-se de pedaços colhidos. Se desejável tecido permanece, Pedaços favoráveis de tumor selecionados adicionais a partir dos “fragmentos intermediários favoráveis” placa de 6 poços para enchimento das gotas para um máximo de 50 pedaços. Registrou-se o número total de pedaços dissecados criados. NOTA: Garantir manter os fragmentos intermediários de tumor hidratados com Meio de Lavagem como necessário por toda a dissecação. Registrada a quantidade total de pedaços dissecados colhidos.

[00671] 8.3.34 Removeu-se o Tubo cônico da incubadora. Removeu-se o tubo cônico de 50 mL “Pedaços de Tecido” da incubadora. Tempo registrou-se na etapa 8.1.29. Garantiu-se que o tubo cônico foi aquecido por ≥ 30 min.

[00672] 8.3.35 Preparou-se Tubos cônicos. Passou-se cônico de 50 mL “Pedaços de Tecido” para dentro da BSC, garantir não comprometer a esterilidade das superfícies de processamento abertas.

[00673] 8.3.36 Transferiu-se Pedaços de tumor para Tubo cônico de 50 mL. Usando uma pipeta de transferência, bisturi, fórceps ou combinação, transferiu-se os 50 melhores fragmentos de tumor selecionados das tampas de placa de favoráveis para o tubo cônico de 50 mL de “Pedaços de Tecido”.

[00674] NOTA: Se um pedaço de tumor foi deixado cair durante a

transferência e tecido desejável permanece, pedaços adicionais dos poços de fragmento intermediário de tumor favorável foram adicionou-se. Registrou-se números de pedaços.

[00675] 8.3.37 Preparou-se BSC para G-REX100MCS. Removeu-se todos os itens desnecessários da BSC para vasos semeados, retendo as placas de tecido favorável se elas contiveram fragmentos extras.

[00676] 8.3.38 Removeu-se G-REX100MCS da incubadora. Removeu-se G-Rex100MCS contendo meios da incubadora. Completada a Etapa 8.1.29.

[00677] 8.3.39 Passado frasco para dentro da BSC. Passou-se assepticamente o frasco G-Rex100MCS para dentro da BSC. NOTA: Quando transferir o frasco, não segurar pela tampa ou pelo fundo do vaso. Transferiu-se o vaso manipulando-se pelas laterais. NOTA: Apenas IPA WIPES utilizados quando do manuseio dos frascos G-Rex.

[00678] 8.3.40 Adicionou-se fragmentos de tumor ao frasco G-Rex100MCS. Na BSC, tampa do frasco G-Rex100MCS levantada, garantindo que a esterilidade da tubulação interna seja mantida. Tubo cônico turbilhonado com pedaços de tumor para colocar em suspensão e rapidamente vertido os conteúdos dentro do frasco G-Rex100MCS.

[00679] 8.3.41 Pedaços uniformemente distribuídos. Garantiu-se que que os pedaços de tumor foram uniformemente distribuídos através da membrana do frasco. Suavemente inclinado o frasco para trás e para frente o frasco se necessário para distribuir uniformemente os pedaços de tumor.

[00680] 8.3.42 Registrou-se número total de fragmentos de tumor no vaso. Registrou-se número de fragmentos de tumor na membrana de fundo do vaso e número de observados estar flutuando no vaso. NOTA: Se o número de fragmentos semeados NÃO foi equivalente ao número de colhido na etapa 8.3.36H, contatada a Gestão de Área e documento na Secção 10.0.

[00681] 8.3.43 Incubar frasco G-Rex G-Rex100MCS incubado nos seguintes parâmetros: Frasco G-Rex incubado: Mostrador LED de

Temperatura: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; Porcentagem de CO_2 : $5,0 \pm 1,5\%$ de CO_2

[00682] 8.3.44 Janela de incubação calculou-se. Cálculos realizados para determinar o tempo apropriado para remover G-Rex100MCS da incubadora no Dia 11. Cálculos: Tempo de incubação; limite inferior = tempo de incubação + 252 horas; limite superior = tempo de incubação + 276 horas

[00683] 8.3.45 Monitoramento Ambiental. Depois do processamento, verificada BSC e monitoramento de pessoal foi realizada.

[00684] 8.3.46 Materiais descartados. Armazenados os Meios Não Aquecidos remanescentes de 2 a 8°C e rotulados. Depois que o processo foi completado, descartados quaisquer Meios Aquecidos remanescentes e alíquotas descongeladas de IL-2.

[00685] 8.3.47 Submissão de amostra. Garantiu-se que que todas as amostras do Dia 0 fossem submetidas ao Login e transferidas em LIMS.

[00686] 8.3.48 Revisar a Seção 8.3.

[00687] 8.4 Dia 11 – Meios Preparação

[00688] 8.4.1 Sala, sanitização, depuração de linha e materiais checados. Sanitização de sala, depuração de linha e que os materiais estão dentro da validade confirmou-se.

[00689] 8.4.2 Tabela de pré-processamento. Lista de equipamento: BSC; Balança; Selador de Tubo Sebra; Meios de Remoção Gatherex® e Dispositivo de Recuperação de Célula; Garantir que o armário provido de QA seja colocou-se na BSC apropriada; Garantir que o número de lote do armário provido de QA e mostrador de ID do paciente equiparem o número de lote e ID do paciente neste registro de Lote.

[00690] 8.4.3 Incubadora Monitorado. Incubadora Monitorado. Parâmetros da incubadora:

[00691] Mostrador LED de Temperatura: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; Porcentagem de CO_2 : $5,0 \pm 1,5\%$ de CO_2 . NOTA: A seção 8.4 pode ser conduzida concorrentemente com a seção 8.5.

[00692] 8.4.4 Meios Aquecidos. Aquecidas 3x garrafas de 1000 mL de Meios RPMI 1640 (W3013112) e 3x garrafas de 1000 mL de AIM-V (W3009501) em um incubadora por ≥ 30 minutos. Tempo registrou-se. Meios: RPMI 1640 e AIM-V. NOTA: Colocou-se uma garrafa adicional 1 x 1000 ml de Meios AIM-V (W3009501) na temperatura da sala para o uso na etapa 8.5.34. Rotulada a garrafa “Apenas para Diluições de Contagem de Célula” e o número de lote do registro de batelada.

[00693] 8.4.5 Monitoramento Ambiental. Antes do processamento, o monitoramento ambiental pré-processo garantiu-se que foi realizada como para SOP-00344.

[00694] 8.4.6 Removeu-se os Meios RPMI 1640 da incubadora. Removeu-se os Meios RPMI 1640 quando o tempo foi atingido. Registrar o tempo final de incubação na etapa 8.4.4. Garantir que os meios fossem aquecidos por ≥ 30 min.

[00695] 8.4.7 Meios RPMI 1640 Preparou-se. Na BSC, removeu-se 100,0 mL de cada uma das três garrafas de 1000 mL de Meios RPMI 1640 pré-aquecidos e colocou-se dentro de um recipiente apropriadamente dimensionado rotulou-se “Resíduo”.

[00696] 8.4.8 Na BSC adicionou-se reagentes à garrafa de Meios RPMI 1640. Na BSC adicionou-se os seguintes reagentes a cada uma das três garrafas de Meios RPMI 1640. Registrou-se os volumes adicionados para cada garrafa. Soro Humano GemCell, Tipo AB Inativado por Calor (100,0 mL), GlutaMax (10,0 mL), Sulfato de gentamicina, 50 mg/ml (1,0 mL), 2-mercaptoetanol (1,0 mL)

[00697] 8.4.9 Meios de Filtração. Garrafas tampadas da etapa 8.4.8 e turbilhonadas para garantir que os reagentes fossem completamente misturou-se. Filtrada cada garrafa de meios através de uma unidade de filtração de 0,22 micron de 1 L separada.

[00698] 8.4.10 Meios filtrados rotulados. Os meios filtrados

aspticamente cada garrafa tampada e rotulada com Meios CM1 Dia 11.

[00699] 8.4.11 Descongelou-se alíquota de IL-2. Descongelou-se 3 x alíquotas de 1,1 mL de IL-2 (6×10^6 IU/mL) (BR71424) até que todo o gelo tenha fundido registrou-se lote # e Validade IL 2.

[00700] NOTA: Garantir que os rótulos de IL-2 estejam fixados.

[00701] 8.4.12 Removeu-se os Meios AIM-V da incubadora. Removidas as três garrafas de Meios AIM-V da incubadora. Registrou-se tempo final de incubação na etapa 8.4.4. Garantiu-se que os meios fossem aquecidos por ≥ 30 minutos.

[00702] 8.4.13 Adicionar IL-2 ao AIM-V. Na BSC, usando uma micropipeta, adicionou-se 3,0 mL de IL-2 descongelou-se dentro de uma garrafa de 1L de meios AIM-V pré-aquecidos. Enxaguar a ponta da micropipeta com meios depois de dispensar IL-2. Usar uma nova ponta de micropipeta estéril for cada alíquota. Registrou-se o volume total adicionou-se. Rotulada a garrafa como “AIM-V Contendo IL-2”.

[00703] 8.4.14 Transferiu-se os materiais. Transferiu-se aspticamente para uma Bolsa Labtainer de 10 L e um conjunto de transferência de bomba repetidora para dentro da BSC.

[00704] 8.4.15 Preparou-se Bolsa de Meios Labtainer de 10L. Fechadas todas as linhas em uma Bolsa Labtainer de 10 L. Fixou-se a extremidade de tubulação de diâmetros maior de um conjunto de transferência de bomba repetidora para o orifício fêmea do meio da Bolsa Labtainer de 10 L por intermédio de conexão luer lock.

[00705] 8.4.16 Preparar a Bomba Baxa. Montou-se a Bomba Baxa próxima à BSC. Alimentada a tubulação do conjunto de transferência através da Bomba Baxa situada fora da BSC. Ajustar a Bomba Baxa para “Alto” e “9”.

[00706] 8.4.17 Preparou-se a bolsa de meios Labtainer de 10L. Na BSC, removida a seringa do Sistema de Dispensa de Líquido Pumpmatic

(PLDS) e descartada. NOTA: Garantiu-se que não comprometer a esterilidade da pipeta PLDS.

[00707] 8.4.18 Preparou-se a bolsa de meios Labtainer de 10L. Conectada a pipeta PLDS à extremidade de diâmetro menor do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora por intermédio de conexão luer e colocada a ponta da pipeta nos meios AIM-V contendo garrafa IL-2 (preparada na etapa 8.4.13) para aspiração. Abertas todas as braçadeiras entre a garrafa de meios e a Labtainer de 10L.

[00708] 8.4.19 meios bombeados dentro da Labtainer de 10L. Na BSC, usando a PLDS, transferência de meios AIM-V pré-aquecidos contendo IL-2 preparada na etapa 8.4.13, assim como duas garrafas de AIM-V adicionais dentro da Bolsa Labtainer de 10 L. Adicionou-se as três garrafas de Meios CM1 Dia 11 filtrados da etapa 8.4.10. Depois da adição de garrafa final, depurada a linha para a bolsa. NOTA: Parada a bomba entre a adição de cada garrafa de meios.

[00709] 8.4.20 Removida a pumpmatic da bolsa Labtainer. Removida PLDS do conjunto de transferência e colocada uma tampa vermelha sobre o luer da linha na BSC.

[00710] 8.4.21 Misturou-se meios. Suavemente massageada a bolsa para misturar.

[00711] 8.4.22 Rotulou-se os meios. Na BSC, rotulada a bolsa de meios com as seguintes informações. A data de validade foi 24 horas da data de preparação.

[00712] 8.4.23 Meios de amostra por Plano de Amostra. Na BSC, fixou-se uma seringa de 60 mL ao orifício fêmea disponível da bolsa dos “Meios CM2 Completos do Dia 11” preparada na etapa 8.4.22. Removeu-se 20,0 mL de meios e colocou-se em um Tubo cônico de 50 mL. Colocada uma tampa vermelha no orifício fêmea da Bolsa dos “Meios CM2 Completos do Dia 11 Meios”.

[00713] 8.4.24 Amostra rotulada e armazenada. Rotulada com rótulo de inventário de plano de amostra e armazenada Meios de Retenção de Amostra de 2 a 8°C até submetido ao Login para teste.

[00714] 8.4.25 Assinatura para Amostragem. Garantiu-se que que folha de plano de amostra LIMS foi completado para remoção da amostra.

[00715] 8.4.26 Selada a linha do conjunto de transferência. Fora da BSC, selada por aquecimento (pela Nota de Processo 5.12) a tampa vermelha na linha do conjunto de transferência, próximo à tampa vermelha. Manter o conjunto de transferência na bolsa.

[00716] 8.4.27 Tubos de Diluição de Contagem de Célula Preparou-se Na BSC, adicionou-se 4,5 mL de Meios AIM-V que foram rotulados com “Diluições Para Contagem de Célula” e número de lote para quatro tubos cônicos de 15 mL. Rotulou-se os tubos com o número de lote e número de tubo (1-4). Rotulou-se 4 criofrascos “Alimentadora” e número do frasco (1 a 4). Manter os frascos sob BSC para serem usados na etapa 8.5.30.

[00717] 8.4.28 Transferiu-se os reagentes da BSC para 2 a 8°C. Transferiu-se qualquer 2-mercaptoetanol, GlutaMax e soro Humano remanescentes da BSC para 2 a 8°C. Garantiu-se que que todos os reagentes foram rotulados com o número de lote do registro de batelada e a validade aberta apropriada para a Nota de Processo 5.9.

[00718] 8.4.29 Preparou-se a Embalagem de Transferência de 1L. Fora da BSC soldou-se (para a Nota de Processo 5.11) uma Embalagem de Transferência de 1L para o conjunto de transferência fixado à bolsa “Meios CM2 Completos Dia 11” preparada na etapa 8.4.22. Embalagem de Transferência rotulada como “Meios CM2 do Alimentadora de Célula” e número de lote.

[00719] 8.4.30 Preparou-se Embalagem de Transferência de 1L. Feita uma marca na tubulação da tubulação de Embalagem de Transferência de 1L umas poucas polegadas afastada da bolsa. Colocada a Embalagem de

Transferência vazia sobre a balança de modo que a tubulação estivesse sobre a balança no ponto da marca.

[00720] 8.4.31 Balança tarada. Tarada a balança e deixada a Embalagem de Transferência vazia sobre a balança.

[00721] 8.4.32 Preparou-se Embalagem de Transferência de célula Alimentadora. Ajustar a Bomba Baxa para “Médio” e “4.” Bombeados 500,0 $\pm$ 5,0 mL de meios “CM2 Completo Dia 11” preparada na etapa 8.4.22 dentro da Embalagem de Transferência de “Meios de Célula CM2”. Medida em peso e registrou-se o volume de meios CM2 Completos adicionou-se à Embalagem de Transferência.

[00722] 8.4.33 Linha de selo aquecida. Uma vez cheia, selo aquecido a linha pela Nota de Processo 5.12. Separada bolsa de meios CM2 Dia 11 com conjunto de transferência da Embalagem de Transferência dos meios de célula Alimentadora, mantida solda para a Embalagem de Transferência de 1L.

[00723] 8.4.34 Se aplicável: Embalagem de Transferência de meios de Célula Alimentadora incubada. Quando aplicável, colocada a Embalagem de Transferência “Meios CM2 de Célula Alimentadora” na incubadora até usou-se na etapa 8.6.6.

[00724] 8.4.35 Meios CM2 Completos Dia 11 Incubados. Colocou-se “Meios CM2 Completos Dia 11” preparada na etapa 8.4.22 na incubadora até o uso na etapa 8.7.2.

[00725] 8.4.36 Revisada a Seção 8.4.

[00726] 8.5 Dia 11 – Colheita de TIL

[00727] 8.5.1 Tabela de pré-processamento. Incubadora Monitorado. Parâmetros da incubadora: Mostrador LED de Temperatura: 37,0 $\pm$ 2,0°C; Porcentagem de CO₂: 5,0 $\pm$ 1,5 % de CO₂.

[00728] NOTA: Seção 8.5 pode ser conduzida concorrentemente com as Seções 8.4 e 8.6.

[00729] 8.5.2 Removeu-se G-Rex100MCS da incubadora. Realizou-se

checagem abaixo para garantir que os parâmetros de incubação sejam atingidos antes de remover G-Rex100MCS da incubadora. Limite inferior da etapa 8.3.44 B. Limite superior da etapa 8.3.44 C.

[00730] Registro de Tempo de Remoção da incubadora. Determinou-se: É $8.3.44\ B \leq \text{Tempo de Remoção da incubadora} < \text{Etapa } 8.3.44\ C$? *SE NENHUMA GESTÃO DE ÁREA DE CONTATO. G-Rex100MCS cuidadosamente removeu-se da incubadora e garantiu-se que que todas as braçadeiras estivessem fechadas exceto a linha de filtro grande. Tempo de início de processamento registrou-se.

[00731] 8.5.3 Preparou-se Embalagem de Transferência de 300 mL. Rotulada uma Embalagem de Transferência de 300 mL como “Suspensão de TIL”.

[00732] 8.5.4 Preparou-se Embalagem de Transferência de 300 mL. Soldou-se estéril (para a Nota de Processo 5.11) a transferência de Suspensão TIL (linha única) de um Filtro de Sangue por Gravidade. Ver, por exemplo.

[00733] 8.5.5 Preparou-se Embalagem de Transferência de 300 mL. Colocada a Embalagem de Transferência de 300 mL sobre uma balança e registrar peso seco.

[00734] 8.5.6 Preparou-se Embalagem de Transferência de 1L. Rotulada Embalagem de Transferência de 1L como “Sobrenadante” e Número de lote.

[00735] 8.5.7 Soldou-se as embalagens de transferência para G-Rex100MCS. Soldou-se estéril (para Nota de Processo 5.11) a linha de remoção de meios vermelha do G-Rex100MCS para a Embalagem de Transferência “Sobrenadante”. Soldou-se estéril a linha de remoção de célula clara do G-Rex100MCS para uma das duas linhas de ponta no topo do filtro de sangue conectado à Embalagem de Transferência “Suspensão de TIL” preparada na etapa 8.5.4. Ver, por exemplo.

[00736] 8.5.8 Instalou-se GatheRex. Colocou-se G-Rex100MCS sobre

o lado esquerdo do GatheRex e as Embalagens de transferência “Sobrenadante” e “Suspensão de TIL” para o lado direito.

[00737] 8.5.9 Instalou-se GatheRex. Instalar a linha de remoção de meios vermelha do G Rex100MCS à braçadeira de topo (marcada com uma linha vermelha) e guias de tubulação no GatheRex. Instalada a linha de colheita clara do G-Rex100MCS à braçadeira de fundo (marcada com uma linha azul) e guias de tubulação no GatheRex.

[00738] 8.5.10 Instalou-se GatheRex. Fixou-se a linha de gás do GatheRex para o filtro estéril do frasco G-Rex100MCS. NOTA: Antes de remover o sobrenadante do frasco G-Rex100MCS, garantiu-se que todas as braçadeiras nas linhas de remoção de célula foram fechadas.

[00739] 8.5.11 Redução de Volume de G-Rex100MCS. Transferiu-se ~900 mL de sobrenadante cultura do G-Rex100MCS para a Embalagem de Transferência de 1L. Visualmente inspecionar o frasco G-Rex100MCS para garantir que o frasco esteja nivelado e os meios tenham sido reduzidos até o final do tubo de ponta de aspiração. NOTA: Se o Gatherex para prematuramente, o mesmo foi reiniciado pressionando o botão com a seta apontando para a direita mais uma vez.

[00740] 8.5.12 Preparar o frasco para a Colheita de TIL. Depois da remoção do sobrenadante, fechadas todas as braçadeiras para a linha vermelha.

[00741] 8.5.13 Iniciação da Colheita de TIL. Registrou-se o tempo de início da colheita de TIL.

[00742] 8.5.14 Iniciação da Colheita de TIL. Frasco vigorosamente tampado e meios turbilhonados para a liberação de células. Realizou-se uma inspeção do frasco para garantir que todas as células tenham descolado. NOTA: Contatada a gestão de área se as células não descolaram.

[00743] 8.5.15 Iniciação da Colheita de TIL. Frasco inclinado fora da tubulação de colheita e deixado os pedaços de tumor sedimentar ao longo da

borda. Frasco lentamente inclinado para a tubulação de colheita de modo que pedaços permanecessem no lado oposto do frasco. NOTA: Se o canudo de colheita de célula não estiver na junção da parede e membrana de fundo, bater o frasco enquanto inclinado em um ângulo de 45º é usualmente suficiente para a posicionar apropriadamente o canudo.

[00744] 8.5.16 TIL Colhido. Liberadas todas as braçadeiras levando à Embalagem de Transferência da Suspensão de TIL.

[00745] 8.5.17 TIL Colhido. Usando o Gatherex, transferiu-se a suspensão de célula através do filtro de sangue dentro da Embalagem de Transferência de 300 mL. NOTA: Estar seguro de manter a borda inclinada até que todas as células e meios fossem colhidos.

[00746] 8.5.18 TIL Colhido. Inspeccionar a membrana quanto às células aderidas.

[00747] 8.5.19 Membrana do frasco enxaguada. Enxaguado o fundo do G-Rex100MCS. Cobrir ~1/4 da membrana de troca gasosa com meios de enxágue. NOTA: Se pedaços de tumor obstruem a linha de colheita, pausar a coleta pressionando o “X” na linha de coleta de célula. Pressionar o botão “Braçadeiras de Liberação” no Gatherex e pegar a Embalagem de Transferência e apertar suavemente com pressão crescente até que o fragmento fosse removeu-se. Não apertar a bolsa em demasia, visto que isto pode fazer com que a linha ou bolsa se rompam. Retomar a coleta uma vez que a obstrução tenha sido removida.

[00748] 8.5.20 As braçadeiras fechadas no G-Rex100MCS. Garantiu-se que todas as braçadeiras estão fechadas.

[00749] 8.5.21 Termicamente selada. Termicamente selada (pela Nota de Processo 5.12) a Embalagem de Transferência de suspensão de TIL como fechada pela solda como possível de modo que o comprimento global da tubulação permaneça aproximadamente a mesma.

[00750] 8.5.22 Termicamente selada. Termicamente selada a

Embalagem de Transferência “Sobrenadante” pela Nota de Processo 5.12. Mantida linha suficiente para a soldagem.

[00751] 8.5.23 Volume calculou-se de suspensão de TIL. Peso registrou-se de Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL e calculou-se o volume de suspensão de célula.

[00752] 8.5.24 Preparou-se Embalagem de Transferência de Sobrenadante para Amostragem. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) um 4” plasma transferência set à Embalagem de Transferência “sobrenadante”, retendo a conexão luer no conjunto de transferência de plasma de 4” e transferiu-se para dentro da BSC.

[00753] 8.5.25 Preparou-se Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL para Amostragem. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) um conjunto de transferência de plasma de 4” à Embalagem de Transferência de “Suspensão de TIL” de 300 mL, retida a conexão luer no conjunto de transferência de plasma de 4” e transferiu-se para dentro da BSC.

[00754] 8.5.26 Amostra Bac-T Puxada. Na BSC, usando uma seringa apropriadamente dimensionada, puxar aproximadamente 20,0 mL de sobrenadante da Embalagem de Transferência “Sobrenadante” de 1L e dispensar dentro de um Tubo cônico estéril de 50 mL rotulou-se “Bac-T.” Manter na BSC para o uso na etapa 8.5.27.

[00755] 8.5.27 BacT Inoculado por Plano de Amostra. Removeu-se uma amostra de 1,0 mL do cônico de 50 mL rotulou-se BacT preparada na etapa 8.5.26 usando uma seringa apropriadamente dimensionada e inoculado na garrafa anaeróbica. Registrou-se o tempo que a garrafa foi inoculada usando o espaço provido no rótulo da garrafa. Repetido o acima para a garrafa aeróbica. NOTA: Esta etapa pode ser realizada fora da sequência.

[00756] 8.5.28 Amostra rotulada e armazenada. Rotulada com rótulo de inventário de plano de amostra e armazenada amostra Bac-T na temperatura da sala, protegido da luz, até submetido ao Login para teste pelo

Plano de Amostra. NOTA: Não cobrir o código de barras na garrafa com rótulos.

[00757] 8.5.29 Assinado para Amostragem. Garantiu-se que a folha de plano de amostra LIMS foi completada para remoção da amostra.

[00758] 8.5.30 Amostras da Contagem de Célula de TIL. Rotulou-se 4 criofrascos com número do frasco (1-4).

[00759] Usando seringas de 3 mL separadas, puxados 4 x 1,0 mL de amostras de contagem de célula da Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL usando a conexão luer e colocadas nos respectivos criofrascos.

[00760] 8.5.31 Fechada a conexão luer. Colocada uma tampa vermelha (W3012845) na linha.

[00761] 8.5.32 TIL Incubado. Colocada Embalagem de Transferência de TIL na incubadora até necessário.

[00762] 8.5.33 Realizar as Contagens de Célula Contagens de célula realizadas e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. Realizar as contagens de célula inicial não diluída.

[00763] 8.5.34 Registrou-se os volumes de amostra de Contagem de Célula. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0.

[00764] 8.5.35 Fator de Multiplicação Determinou-se. Volume de amostra da contagem de célula total: 8.5.34A + 8.5.34B. Fator de Multiplicação $C \div 8.5.34A$.

[00765] 8.5.36 Protocolos selecionados e fatores de multiplicação inseridos. Garantiu-se que o protocolo do “Ensaio de Contagem de Célula Viável” foi selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0

[00766] 8.5.37 Nome de Arquivo Registrou-se, Viabilidade e

Contagens de Célula de Nucleoview

[00767] 8.5.38 Determinou-se a Média de Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas. Viabilidade $(8.5.37A + 8.5.37B) \div 2$. Concentração de Célula Viável $(8.5.37C + 8.5.37D) \div 2$

[00768] 8.5.39 Limites superior e inferior Determinados para as contagens. Limite inferior: $8.5.38F \times 0,9$. Limite superior: $8.5.38F \times 1,1$.

[00769] 8.5.40 Ambas as contagens estavam dentro dos limites aceitáveis? Limite inferior: $8.5.37 C \text{ e } D \geq 8.5.39G$. Limite superior: $8.5.37 C \text{ e } D \leq 8.5.39H$. *Se cada resultado foi “Não” realizou-se o segundo conjunto de contagens nas etapas 8.5.41 a 8.5.48*.

[00770] 8.5.41 Se Aplicável: Realizou-se contagens de célula. Realizou-se contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. NOTA: A diluição foi ajustada conforme baseado fora da concentração esperada de células. Realizou-se

[00771] 8.5.42 Se Aplicável: Volumes de amostra da Contagem de Célula Registrada.

[00772] 8.5.43 Se Aplicável: Fator de Multiplicação Determinou-se. Volume de amostra da contagem de célula total: $8.5.42A + 8.5.42B$. Fator de Multiplicação $C \div 8.5.42A D$

[00773] 8.5.44 Se Aplicável: Protocolos selecionados e fatores de multiplicação inseridos. Garantiu-se que o protocolo do “Ensaio de Contagem de Célula Viável” foi selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [μ L]” = 200, “Diluição [μ L]” = 0.

[00774] 8.5.45 Se Aplicável: Registradas Contagens de célula da Nucleoview

[00775] 8.5.46 Se Aplicável: Determinou-se a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas.

Determinou-se a concentração de célula viável calculou-se em média.

[00776] 8.5.47 Se Aplicável: Limites Superior e Inferior Determinados para as contagens. Limite inferior: $8.5.46F \times 0,9$. Limite superior: $8.5.46F \times 1,1$.

[00777] 8.5.48 Se Aplicável: As contagens estavam dentro de limites aceitáveis? Limite inferior: $8.5.45 C \text{ e } D \geq 8.5.47G$. Limite superior: $8.5.45 C \text{ e } D \leq 8.5.47H$. NOTA: Se cada resultado é “Não” continuar para a etapa 8.5.49 para determinar uma média.

[00778] 8.5.49 Se Aplicável: Determinou-se uma Concentração de Células Viáveis média de todas as quatro contagens realizadas. Concentração de Células Viáveis média $(A+B+C+D) \div 4 = \text{MÉDIA}$

[00779] 8.5.50 Volume Ajustado de Suspensão de TIL Calcular o volume Ajustado de Suspensão de TIL depois da remoção das amostras de contagem de célula. Volume de Célula TIL Total da etapa 8.5.23C (a). Volume da Amostra de Contagem de Célula Removida (4,0 ml) (B) Volume de Célula TIL Total Ajustado $C=A-B$.

[00780] 8.5.51 Células TIL Viáveis Totais Calculadas. Concentração de Células Viáveis média*: 8.5.38 F* ou 8.5.46 F* ou *8.5.49E*; Volume Total: 8.5.50; Células viáveis totais: $C = A \times B$. *Referência da etapa de círculo usou-se para determinar a Concentração de Células Viáveis. NOTA: Se as Células TIL Viáveis Totais forem $< 5 \times 10^6$ células contatar a Gestão de Área e prosseguir para a etapa 8.7.1. Se as Células TIL Viáveis Totais forem $> 5 \times 10^6$, prosseguir para a etapa 8.5.52.

[00781] 8.5.52 Cálculo para citometria de fluxo. Se a contagem de Célula TIL Viável Total da etapa 8.5.51C foi $\geq 4,0 \times 10^7$, calculou-se o volume para se obter $1,0 \times 10^7$ células para a amostra da citometria de fluxo. *Se houverem $< 4,0 \times 10^7$ células, N/A os campos remanescentes na tabela. Prosseguir para a etapa 8.7.1. Células viáveis totais requeridas para a citometria de fluxo: $1,0 \times 10^7$ células. Volume de células requeridas para a

citometria de fluxo: Concentração de Células Viáveis de 8.5.51 dividido pelas $1,0 \times 10^7$ células A.

[00782] 8.5.53 Se Aplicável: Removeu-se TIL da incubadora. Removida Suspensão de TIL da incubadora e registrou-se tempo final de incubação na etapa 8.5.32.

[00783] 8.5.54 Se Aplicável: Removida a amostra de citometria de fluxo como para o Plano de Amostra. Usando uma seringa apropriadamente dimensionada, removeu-se o volume calculou-se (8.5.52 C) para a amostra de fenotipagem da Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL e colocar em um Tubo cônico de 50 mL.

[00784] 8.5.55 Se Aplicável: Rotulou-se e armazenada a amostra de citometria de fluxo. Rotulou-se com rótulo de inventário de plano de amostra e armazenar a amostra de Citometria de Fluxo de 2 a 8°C até submetido ao Login para testar por Plano de Amostragem.

[00785] 8.5.56 Assinado para Amostragem. Garantir que a folha de plano de amostra LIMS fosse completada para remoção da amostra.

8.5.57 Se Aplicável: Recalculou-se Células viáveis totais e Fluxo de Volume. Calculou-se as Células viáveis totais remanescentes e volume remanescente depois da remoção da amostra de citometria abaixo.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
TIL Viável Total	Etapa 8.5.51C	A. células
Removeu-se TIL para Citometria de Fluxo	1×10^7 células	B. 1×10^7 células
TIL Viável Total Remanescente	$C = A - B$	C. células
Volume de TIL	Etapa 8.5.50C	D. mL
Removeu-se Volume de TIL	Etapa 8.5.52 C	E. mL
Volume Remanescente de TIL	$F = D - E$	F. mL

[00786] 8.5.58 Se Aplicável: Calculou-se volume de TIL. Calculou-se o volume de Suspensão de TIL igual a $2,0 \times 10^8$ células viáveis.

Células Viáveis Totais Requeridas	Concentração de Células Viáveis da etapa 8.5.51A	Volume de Suspensão de TIL contendo $2,0 \times 10^8$ células viáveis $C = A \div B$
A. $2,0 \times 10^8$ células	B. células/mL	C. mL

[00787] 8.5.59 Se Aplicável: Calculou-se volume de TIL para remover

[00788] Calcular o volume de excesso de células TIL para remover.

Volume Total de Suspensão de TIL da etapa 8.5.57F	Volume de suspensão contendo $2,0 \times 10^8$ TIL da etapa 8.5.58C	Volume de TIL em excesso para Remover $C=A-B$
A. mL	B. mL	C. mL

[00789] 8.5.60 Se Aplicável: Removeu-se TIL em excesso. Na BSC, usando uma seringa apropriadamente dimensionada, remover o volume calculou-se (Etapa 8.5.59C) da Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL. NOTA: Não usar uma seringa mais do que uma vez. Seringas de uso múltiplo se aplicável. Colocou-se em recipiente estéril apropriadamente dimensionado e rotulou-se como data e número de lote. Colocada uma tampa vermelha na linha de Embalagem de Transferência de “Suspensão de TIL”.

[00790] 8.5.61 Se Aplicável: Colocou-se TIL na incubadora. Colocada Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL na incubadora até necessário. Tempo registrou-se.

[00791] 8.5.62 Se Aplicável: Cálculos. Calculou-se o Excesso total de TIL removido. Etapa 8.5.51A Volume de TIL para remover da etapa 8.5.59C. Calculou-se o Excesso total de TIL removido.

Concentração de Célula Viável da Etapa 8.5.51A	Volume de TIL para remover da etapa 8.5.59C	Excesso total de TIL removido $C = A \times B$
A. células/mL	B. mL	C. células

[00792] 8.5.63 Se Aplicável: Cálculos. Calculou-se quantidade de meios CS-10 a adicionar às células TIL em excesso da etapa 8.5.62C. A concentração da célula alvo para congelamento é $1,0 \times 10^8$ células/ml.

Excesso total de TIL Removeu-se da Etapa 8.5.62C	Concentração Alvo para congelar	Volume de CS-10 para Adicionar (mL) $C=A \div B$
A. células	B. $1,0 \times 10^8$ células/mL	C. mL

[00793] 8.5.64 Se Aplicável: TIL em excesso centrifugado. Centrifugada a Suspensão de célula de TIL em excesso. Velocidade: 350 x g. Tempo: 10:00 minutos. Temperatura: Ambiente. Freio: Total (9). Aceleração: Total (9).

[00794] 8.5.65 Se Aplicável: Tubo cônico observado. Observações registradas: Grânulo observado? Sobrenadante foi claro? *NOTA: Se cada resposta foi não, contatar Gestão de Área.

[00795] 8.5.66 Se Aplicável: CS-10 adicionou-se. Na BSC, sobrenadante assepticamente aspirado. Bater suavemente no fundo do tubo para recolocar em suspensão as células no fluido remanescente.

[00796] 8.5.67 Se Aplicável: CS10 adicionou-se. Lentamente adicionar o volume de CS10 calculado na etapa 8.5.63C

[00797] 8.5.68 Se Aplicável: Rotulou-se os Frascos. Rotulou-se os frascos com rótulos providos com QA. Fixado um rótulo de amostra.

[00798] 8.5.69 Se Aplicável: Frascos Cheios. Aliquotado 1,0 mL de suspensão de célula, dentro de criofrascos apropriadamente dimensionados. NOTA: Não encher mais do que 10 frascos de TIL em Excesso.

[00799] 8.5.70 Se Aplicável: Frascos Cheios. Volume residual aliquotado dentro de criofrasco apropriadamente dimensionado para SOP-00242. Se o volume for $\leq 0,5$ mL, adicionar CS10 ao frasco até que o volume seja 0,5 mL.

[00800] 8.5.71 Se Aplicável: Frascos Cheios. Cheio um frasco com 1,0 mL de CS10 e rotulou-se como “em Branco”.

[00801] 8.5.72 Se Aplicável: Registrou-se número de frascos cheios. Registrou-se número de frascos cheios abaixo, não incluindo branco.

[00802] 8.5.73 Se Aplicável: Monitoramento Ambiental. Depois de processar, BSC verificada e monitoramento de pessoal foi realizada

Criopreservação de TIL da Amostra

[00803] 8.5.74 Se Aplicável: Volume calculou-se para Criopreservação. Calculou-se o volume de células requeridas para se obter 1×10^7 células para criopreservação.

TIL Viável Total requerido para criopreservação	Concentração de Célula Viável da Etapa 8.5.51A	Volume de Células requeridas para criopreservação $C=A \div B$
A. 1×10^7 células	B. células/ mL	C. mL

[00804] 8.5.75 Se Aplicável: Amostra removida para Criopreservação. Na BSC, usando a seringa apropriadamente dimensionada, removeu-se o volume calculou-se (Etapa 8.5.74C) da Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL. Colocou-se em tubo cônico apropriadamente dimensionado e rotulou-se como “Amostra de Criopreservação de 1×10^7 células,” datado e número de lote. Colocada uma tampa vermelha (W3012845) na Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL.

[00805] 8.5.76 Se Aplicável: Colocou-se TIL na incubadora. Colocada Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL na incubadora até necessário.

[00806] 8.5.77 Se Aplicável: Amostra de criopreservação. Centrifugada a “Amostra de criopreservação de 1×10^7 células” de acordo com os seguintes parâmetros:

[00807] Velocidade: 350 x g, Tempo: 10:00 minutos, Temperatura: Ambiente, Freio: Total (9). Aceleração: Total (9). NOTA: Garantir que as unidades apropriadas sejam ajustadas quanto à velocidade e tempo na centrífuga.

[00808] 8.5.78 Se Aplicável: Tubo cônico observado. Registradas observações: Granulado observado? O sobrenadante está claro? *NOTA: Se cada resposta for não, contatar a Gestão de Área.

[00809] 8.5.79 Se Aplicável: Adicionou-se CS-10. Na BSC, assepticamente aspirar o sobrenadante. Suavemente bater no fundo do tubo para recolocar em suspensão as células no fluido remanescente.

[00810] 8.5.80 Se Aplicável: Adicionou-se CS-10. Lentamente adicionou-se. 0,5 mL de CS10. Registrou-se volume adicionou-se.

[00811] 8.5.81 Se Aplicável: Frasco rotulou-se. Frasco rotulou-se com Rótulo editado com QA.

[00812] 8.5.82 Se Aplicável: Frascos Cheios. Volume aliqotado recolocou-se em suspensão dentro de criofrasco rotulou-se.

[00813] 8.5.83 Se Aplicável: em Branco cheio. Cheio um outro frasco com 0,5 mL de CS10 e rotulou-se como “em Branco”.

[00814] 8.5.84 Se Aplicável: Registrou-se número de frascos cheios, não incluindo “branco”. Frascos de Amostra de Criopreservação Cheios a ~0,5 mL

[00815] 8.5.85 Se Aplicável: Monitoramento Ambiental. Depois de processar, verificação de BSC e o monitoramento de pessoal foi realizada.

[00816] 8.5.86 Revisar a Seção 8.5

[00817] 8.6 Dia 11 - Células Alimentadoras

[00818] 8.6.1 Obteve-se Células Alimentadoras. Obteve-se 3 bolsas de Células Alimentadoras com pelo menos dois números de lote diferentes do congelador de LN2. Manter as células no gelo seco até pronta para descongelar. NOTA: Seção 8.6 pôde ser realizou-se concorrentemente com a Seção 8.5.

[00819] 8.6.2 Obteve-se Células Alimentadoras. Registrou-se informação de célula Alimentadora. Confirmou-se que pelo menos dois lotes diferentes de Células Alimentadoras foram obtidos.

[00820] 8.6.3 Preparou-se banho de água ou Criotherm. Preparou-se banho de Água ou Cytotherm para descongelar Célula Alimentadora.

[00821] 8.6.4 Descongelou-se Células Alimentadoras. Colocou-se as bolsas de Alimentadora Célula dentro das bolsas zip top individuais, com base no Número de lote e descongelou-se em banho de Água ou cytotherm a $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ por ~3 a 5 minutos ou até tão logo o gelo desaparecesse. Registrou-se

[00822] os tempos de descongelamento abaixo a partir do cronômetro.

[00823] 8.6.5 Preparação do equipamento da célula Alimentadora. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) 4S-4M60 a um Conector de Célula CC2 (W3012820), substituir uma ponta única do aparelho Conectado à Célula (B) com a extremidade de 4 pontas do tubo de distribuição 4S-4M60 em (G). Soldou-se H a G.

[00824] 8.6.6 Se aplicável: Removeu-se os Meios da incubadora. Removeu-se a Embalagem de Transferência de Meios CM2 de Célula Alimentadora preparada na etapa 8.4.34 da incubadora.

[00825] 8.6.7 Fixou-se a Embalagem de Transferência de Meios Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) a Embalagem de Transferência dos “Meios CM2 de Célula Alimentadora” a um luer CC2. NOTA: A bolsa será fixada ao lado do equipamento com orifício de injeção desnecessário.

[00826] 8.6.8 Equipamento de transferência. Transferiu-se a montagem contendo os Meios CM2 Completos Dia 11 para dentro da BSC.

[00827] 8.6.9 Células Alimentadoras descongeladas em grupo. Dentro da BSC, puxaram-se 10 mL de ar dentro de uma Seringa de 100 mL. Usou-se isto para substituir a seringa 60 mL no CC2.

[00828] 8.6.10 Células Alimentadoras descongeladas em grupo. Limpou-se cada orifício nas bolsas de Célula Alimentadora com uma almofada de álcool antes de remover a tampa. Spike as três bolsas Alimentadora usando três das pontas do CC2. NOTA: Manteve-se pressão constante enquanto girou-se o ponta em uma direção. Garantir que não perfure o lado do orifício.

[00829] 8.6.11 As Células Alimentadoras descongeladas em grupo. Abriu-se a válvula reguladora de modo que a linha das bolsas de Célula Alimentadora estivesse aberta e a linha para o orifício de injeção desnecessário é fechada.

[00830] 8.6.12 Células Alimentadoras descongeladas em grupo. Preparou-se os conteúdos das bolsas de Célula Alimentadora dentro da seringa. Todas as três bolsas escoaram de uma vez. Uma vez que as bolsas de Célula Alimentadora foram drenadas, enquanto se mantém a pressão na seringa, preso fora da linha para as bolsas de célula Alimentadora.

[00831] 8.6.13 Registrou-se o volume de Células Alimentadoras. Não descolar a seringa abaixo. A seringa do equipamento. Registrou-se o volume

total das Células Alimentadoras na seringa.

[00832] 8.6.14 Adicionou-se Células Alimentadoras para Embalagem de Transferência. Girou-se a válvula reguladora de modo que a linha para a total das bolsas de Célula Alimentadora é fechada e a linha para a Embalagem de Transferência de Meios foi aberta. Garantiu-se que a linha para a Embalagem de Transferência de Meios estivesse desimpedida.

[00833] 8.6.15 Adicionou-se as Células Alimentadoras à Embalagem de Transferência. Dispensou-se as Células Alimentadoras a partir da seringa dentro da Embalagem de Transferência dos “Meios CM2 de Célula Alimentadora”. Presa fora a linha para a Embalagem de Transferência contendo as Células Alimentadoras e deixou-se a seringa fixada ao equipamento.

[00834] 8.6.16 Misturou-se as Células Alimentadoras reunidas. Massageou-se a bolsa para misturar as Células Alimentadoras reunidas na Embalagem de Transferência.

[00835] 8.6.17 Embalagem de Transferência rotulada. Rotulou-se a bolsa como “Suspensão de Célula Alimentadora” e Número de lote.

[00836] 8.6.18 Volume calculou-se total na Embalagem de Transferência. Calculou-se o volume total da suspensão de célula Alimentadora.

[00837] 8.6.19 Removeu-se Amostra de Contagem de Células. Usando uma seringa de 3 mL separada para cada amostra, puxaram-se 4x1,0 mL de Amostra de Contagem de Células da Embalagem de Transferência de Suspensão de Célula Alimentadora usando orifício de injeção desnecessário. Aliquotada cada amostra dentro dos criofrascos rotulados na etapa 8.4.27. NOTA: Limpou-se o orifício de injeção desnecessário com uma almofada de álcool estéril (W3009488) e misturou-se a Suspensão de Célula Alimentadora entre cada amostragem para as contagens de célula.

[00838] 8.6.20 Realizou-se Contagens de Célula. Realizou-se

contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. Diluiu-se a amostra de contagem de células adicionando-se 0,5 mL de suspensão de célula dentro 4,5 mL de meios AIM-V rotulada com o número de lote e “Para as Diluições de Contagem de Célula”. Isto dará uma diluição 1:10. Ajustou-se se necessário.

[00839] 8.6.21 Registrou-se A Contagem de Célula. Volumes de amostra

[00840] 8.6.22 Determinar o Fator de Multiplicação

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Contagem de Célula Total Volume de Amostra	$8.6.21A + 8.6.21B$	C. μL
Multiplicação Factor	$C \div 8.6.21A$	D.

[00841] 8.6.23 Protocolos selecionados e fatores de multiplicação inseridos. Garantiu-se que o protocolo “Ensaio de Contagem de Célula Viável” foi selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos.

[00842] 8.6.24 Registrou-se Nome de Arquivo, Viabilidade e Contagens de Célula a partir do Nucleoview.

[00843] 8.6.25 Determinou-se a Média da Concentração e Viabilidade de Célula Viável das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.6.24A + 8.6.24B) \div 2$	E. %
Concentração de Célula Viável	$(8.6.24C + 8.6.24D) \div 2$	F. células/ mL

[00844] 8.6.26 Limites Superior e Inferior Determinados para as contagens.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.6.25F \times 0,9$	G. células/ mL
Limite superior	$8.6.25F \times 1,1$	H. células/ mL

[00845] 8.6.27 Foram ambas as contagens dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.6.24 C e D \geq 8.6.26G$	
Limite superior	$8.6.24 C e D \leq 8.6.26H$	

[00846] NOTA: Se cada resultado foi “Não” realizou-se segundo conjunto de contagens nas etapas 8.6.28 – 8.6.35.

[00847] 8.6.28 Se Aplicável: Realizou-se contagens de célula. Realizar as contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 para SOP-00314 e Nota de Processo 5.14

[00848] NOTA: A diluição pôde ser ajustada consequentemente com base na concentração esperada de células.

[00849] 8.6.29 Se Aplicável: Registrou-se a Contagem de Células, volumes de amostra. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0.

[00850] 8.6.30 Se Aplicável: Fator de Multiplicação Determinou-se.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Contagem de Célula Total Volume da Amostra	8.6.29A + 8.6.29B	C. mL
Fator de Multiplicação	C ÷ 8.6.29A	D.

[00851] 8.6.31 Selecionar protocolos e inserir fatores de multiplicação. Garantir que o protocolo “Ensaio de Contagem de Célula Viável” foi selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0.

[00852] 8.6.32 Se Aplicável: Registrou-se as Contagens de célula a partir de Nucleoview

[00853] 8.6.33 Se Aplicável: Determinou-se a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	(8.6.32A + 8.6.32B) ÷ 2	E. %
Concentração de Célula Viável	(8.6.32C + 8.6.32D) ÷ 2	F. células/ mL

[00854] 8.6.34 Se Aplicável: Limites Superior e Inferior Determinados para contagens.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	8.6.33F x 0,9	G. células/ mL
Limite superior	8.6.33F x 1,1	H. células/ mL

[00855] 8.6.35 Se Aplicável: As contagens estavam dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	8.6.32 C e D ≥ 8.6.34G	

Limite superior	8.6.32 C e D $\leq$ 8.6.34H	

[00856] NOTA: Se cada resultado foi “Não,” continua-se para a etapa 8.6.36 para achar uma Concentração de Células Viáveis média total e prosseguir com os cálculos.

[00857] 8.6.36 Se Aplicável: Determinou-se uma Concentração de Células Viáveis média a partir de todas as quatro contagens realizadas.

[00858] 8.6.37 Volume Ajustado de Suspensão de Célula Alimentadora. Calculou-se o volume Ajustado de Suspensão de Célula Alimentadora depois da remoção da Amostra de Contagem de Células. Volume de Célula Alimentadora Total da etapa 8.6.18C menos 4,0 mL removidos.

[00859] 8.6.38 Calculou-se Células Alimentadoras viáveis totais.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Concentração Média de Células Viáveis*	8.6.25 F* -ou- 8.6.33 F* -ou- 8.6.36 E*	A. células/ mL
Volume Total	8.6.37 C	B. mL
Células viáveis totais	A x B	C. células

[00860] Se células viáveis totais são $< 5 \times 10^9$, prosseguir para a etapa 8.6.39. Se as células viáveis totais forem $\geq 5 \times 10^9$, prosseguir para a etapa 8.5.70.

[00861] 8.6.39 Se Aplicável: Obteve-se Células Alimentadoras adicionais. Obteve-se uma bolsa adicional de Células Alimentadoras a partir do congelador de LN2. Manter as células sobre gelo seco até pronto para descongelar.

[00862] 8.6.40 Se Aplicável: Obteve-se Células Alimentadoras adicionais. Registrou-se informação de célula Alimentadora.

[00863] 8.6.41 Se Aplicável: Descongelou-se Células Alimentadoras adicionais. Colocou-se a 4ª a bolsa de Célula Alimentadora dentro de uma bolsa de topo zip e descongelado em um banho de Água ou cytotherm a $37.0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ por ~3 a 5 minutos ou até tão logo o gelo desaparecesse. Registrou-se o tempo de descongelamento.

[00864] 8.6.42 Se aplicável: Células Alimentadoras adicionais reunidas. Na BSC, puxaram-se 10 mL de ar dentro de uma Seringa de 100 mL nova. Usou-se esta para substituir a seringa no equipamento.

[00865] 8.6.43 Se aplicável: Células Alimentadoras adicionais reunidas
Limpou-se o orifício da bolsa de Célula Alimentadora com uma almofada de álcool antes de remover a tampa. Perfurou-se a bolsa de Célula Alimentadora usando uma das pontas remanescentes do equipamento preparado na etapa 8.6.7
NOTA: Manteve-se pressão constante enquanto girou-se a ponta em uma direção. Garantiu-se que não perfurar o lado do orifício.

[00866] 8.6.44 Se aplicável: Células Alimentadoras adicionais reunidas. Abriu-se a válvula reguladora de modo que a linha da bolsa de Célula Alimentadora foi aberta e a linha para o orifício de injeção desnecessário foi fechada.

[00867] 8.6.45 Se aplicável: Células Alimentadoras adicionais reunidas. Preparou-se os conteúdos da bolsa de Célula Alimentadora dentro da seringa. Registrou-se o volume.

[00868] 8.6.46 Se Aplicável: Volume Medido. Medido o volume das Células Alimentadoras na seringa e registrou-se abaixo (B). Calculou-se o novo volume total das Células Alimentadoras.

Volume de Célula Alimentadora da Etapa 8.6.37C	Volume de Célula Alimentadora da Etapa 8.6.45	Volume De Célula Alimentadora Total $C=A+B$
A. mL	B. mL	C. mL

[00869] 8.6.47 Se Aplicável: Adicionou-se Células Alimentadoras para Embalagem de Transferência. Girou-se a válvula reguladora de modo que a linha para a bolsa de Célula Alimentadora fosse fechada e a linha para a Embalagem de Transferência da “Suspensão de Célula Alimentadora” fosse aberta. Garantiu-se que a linha para a Embalagem de Transferência estivesse desimpedida. Dispensou-se as Células Alimentadoras da seringa dentro da Embalagem de Transferência de “Suspensão de Célula Alimentadora”. Fechou-se a linha para a Embalagem de Transferência e deixou-se a seringa

fixa ao equipamento.

[00870] 8.6.48 Se Aplicável: Adicionou-se Células Alimentadoras à Embalagem de Transferência. Massageou-se a bolsa para misturar as Células Alimentadoras reunidas na Embalagem de Transferência de Suspensão de Célula Alimentadora.

[00871] 8.6.49 Se Aplicável: Preparou-se diluições. Na BSC, adicionou-se 4,5 mL de Meios AIM-V que foram rotulados com “Diluições Para a Contagem de Célula” e número de lote para quatro tubos cônicos de 15 mL. Rotulou-se os tubos com o número de lote e número do tubo (1 a 4). Rotulou-se 4 criofrascos “Alimentação Adicional” e número do frasco (1 a 4).

[00872] 8.6.50 Se Aplicável: Preparou-se as contagens de célula. Usando uma seringa de 3 mL separada para cada amostra, removeu-se 4 x 1,0 mL de Amostra de Contagem de Células da Embalagem de Transferência de Suspensão de Célula Alimentadora, usando o orifício de injeção desnecessário. Cada amostra aliquoteada dentro de criofrascos rotulados na etapa 8.6.49. NOTA: Limpou-se o orifício de injeção desnecessário com uma almofada de álcool estéril e mistura da Suspensão de Célula Alimentadora entre cada amostragem para as contagens de célula.

[00873] 8.6.51 Se Aplicável: Realizou-se as Contagens de Célula. Realizou-se contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. Amostras de Contagem de Células Diluídas adicionando-se 0,5 mL de suspensão de célula dentro de 4,5 mL de meios AIM-V rotulada com o número de lote e “Diluições Para a Contagem de Célula”. Isto dará uma diluição 1:10. Ajustou-se se necessário.

[00874] 8.6.52 Se Aplicável: Volumes de Amostra da Contagem de Célula Registrada.

[00875] 8.6.53 Se Aplicável: Determinou-se o Fator de Multiplicação

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume da Amostra da Contagem de Célula Total	8.6.52A + 8.6.52B	C. µL
Fator de Multiplicação	$C \div 8.6.52A$	D.

[00876] 8.6.54 Se Aplicável: Protocolos selecionados e fatores de multiplicação inseridos. Garantiu-se que o protocolo de “Ensaio de Contagem de Célula Viável” fosse selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos.

[00877] 8.6.55 Se Aplicável: Registrou-se o Nome de Arquivo, Viabilidade e Contagens de célula a partir de Nucleoview.

[00878] 8.6.56 Se Aplicável: Determinar a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizada.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.6.55A + 8.6.55B) \div 2$	E. %
Concentração de Célula Viável	$(8.6.55C + 8.6.55D) \div 2$	F. células/ mL

[00879] 8.6.57 Se Aplicável: Determinar Limites superior e inferior para contagens.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.6.56F \times 0,9$	G. células/ mL
Limite superior	$8.6.56F \times 1,1$	H. células/ mL

[00880] Ambas as contagens estão dentro dos limites aceitáveis?
NOTA: Se cada resultado for “Não” realizar segundo conjunto de contagens nas Etapas 8.5.59 a 8.5.65

[00881] 8.6.59 Se Aplicável: Realizou-se as contagens de célula. Realizou-se contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. NOTA: A diluição pôde ser ajustada consequentemente com base na concentração esperada de células.

[00882] 8.6.60 Se Aplicável: Volumes de Amostra da Contagem de Célula Registrados. NOTA: Se nenhuma diluição foi necessária, inserida “Amostra [µL]” = 200, “Diluição [µL]” = 0

[00883] 8.6.61 Se Aplicável: Fator de Multiplicação Determinado.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume da Amostra da Contagem de Célula Total	$8.6.60A + 8.6.60B$	C. µL
Fator de Multiplicação	$C \div 8.6.60A$	D.

[00884] 8.6.62 Se Aplicável: Selecionar protocolos e inserir fatores de

multiplicação. Garantiu-se que o protocolo “Ensaio de Contagem de Célula Viável” fosse selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos.

[00885] NOTA: Se nenhuma diluição foi necessária, inseridos “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0

[00886] 8.6.63 Se Aplicável: Registrou-se as contagens de célula a partir do Nucleoview.

[00887] 8.6.64 Se Aplicável: Determinou-se a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.6.63A + 8.6.63B) \div 2$	E. %
Concentração de Célula Viável	$(8.6.63C + 8.6.63D) \div 2$	F. células/ mL

[00888] 8.6.65 Se Aplicável: Limites Superior e Inferior Determinados para Contagens

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.6.64F \times 0,9$	G. células/ mL
Limite superior	$8.6.64F \times 1,1$	H. células/ mL

[00889] 8.6.66 Se Aplicável: As contagens estavam dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.6.63 C e D \geq 8.6.65G$	
Limite superior	$8.6.63 C e D \leq 8.6.65H$	

[00890] NOTA: Se cada resultado foi “Não,” continuar para a etapa 8.6.67 para achar uma Concentração de Células Viáveis média total e prosseguiu-se com os cálculos.

[00891] 8.6.67 Se Aplicável: Determinou-se uma Concentração de Células Viáveis média a partir de todas as quatro contagens realizadas.

[00892] 8.6.68 Se Aplicável: Volume Ajustado da Suspensão de Célula Alimentadora. Calculou-se o Volume Ajustado de Suspensão de Célula Alimentadora depois da remoção de Amostra de Contagem de Células. Volume de Célula Alimentadora Total da etapa 8.6.46C menos 4,0 mL removidos.

[00893] 8.6.69 Se Aplicável: Calculou-se Células Alimentadoras Viáveis Totais.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Concentração Média de Célula Viável*	8.6.56 F*	A. células/ mL
	-ou-	
	8.6.64 F*	
	-ou-	
	8.6.67 E*	
Volume Total	8.6.68 C	B. mL
Células viáveis totais	A x B	C. células

*Usou-se a referência da etapa de círculo para determinar a Concentração de Células Viáveis.

[00894] 8.6.70 Calculou-se o volume de Células Alimentadoras. Calculou-se o volume de Suspensão de Célula Alimentadora que foi requerido para se obter 5×10^9 células alimentadoras viáveis.

Número de Células Alimentadoras Requerido	Concentração de Células Viáveis da Etapa 8.6.38A* ou Etapa 8.6.69A*	Volume de Células Alimentadoras = 5×10^9 células viáveis $C = A \div B$
A. 5×10^9 Células viáveis	B. células/ mL	C. mL

*Etapa de círculo aplicável

[00895] 8.6.71 Calculou-se Volume de Célula Alimentadora em excesso. Calculou-se o volume de Células Alimentadoras em excesso para remover. Arredondado até o número inteiro mais próximo.

Volume Total de Células Alimentadoras na Embalagem de Transferência da Etapa 8.6.46C* ou Etapa 8.6.68C*	Volume de Células Alimentadoras = 5×10^9 células viáveis da etapa 8.6.70C	Volume de Células Alimentadoras em Excesso para remover. Células Viáveis $C = A - B$
A. mL	B. mL	C. mL

*Etapa de círculo aplicável

[00896] 8.6.72 Removeu-se as Células Alimentadoras em excesso. Em uma nova Seringa de 100 mL, puxaram-se 10 mL de ar e fixou-se a seringa ao equipamento.

[00897] 8.6.73 Removeu-se Células Alimentadoras em excesso. Aberta a linha para a Embalagem de Transferência de “Suspensão de Célula Alimentadora”. Usando a seringa extraiu-se o volume de Células Alimentadoras calculadas na etapa 8.6.71C mais um adicional de 10,0 mL da Embalagem de Transferência dentro de uma Seringa de 100 mL. Fechou-se a linha para a Embalagem de Transferência de Suspensão de Célula

Alimentadora uma vez que o volume de Células Alimentadoras foi removido. Não remover a seringa final. NOTA: Uma vez que uma seringa tenha sido enchida, substituí-la com uma nova seringa. Múltiplas seringas podem ser usadas para remover o volume total. Com cada nova seringa, puxaram-se 10 mL de ar.

[00898] 8.6.74 Registrou-se o volume. Registrou-se o volume total (incluindo os 10 mL adicionais) de Células Alimentadoras removidas.

[00899] 8.6.75 Adicionou-se OKT3. Na BSC, usando uma seringa de 1,0 mL e agulha 16G, extraiu-se 0,15 mL de OKT3.

[00900] 8.6.76 Adicionou-se OKT3. Assepticamente removeu-se a agulha da seringa e fixou-se a seringa ao orifício de injeção desnecessário. Injetou-se o OKT3.

[00901] 8.6.77 Adicionou-se OKT3. Abriu-se a válvula reguladora para a Embalagem de Transferência de “Suspensão de Célula Alimentadora” e adicionou-se 10 mL de Células Alimentadoras removidas na etapa 8.6.73 para limpar o OKT3 através da linha.

[00902] 8.6.78 Adicionou-se OKT3. Girou-se a seringa de cabeça para baixo e empurrou-se ar através da linha para limpá-la para a Embalagem de Transferência de Suspensão de Célula Alimentadora.

[00903] 8.6.79 Adicionou-se OKT3. Deixou-se o remanescente de suspensão de Célula Alimentadora na seringa. Fechadas todas as braçadeiras e removeu-se o equipamento da BSC.

[00904] 8.6.80 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a Embalagem de Transferência de Suspensão de Célula Alimentadora, deixando tubulação suficiente para soldar. Descartado o equipamento.

[00905] 8.6.81 Revisar a Seção 8.6

[00906] 8.7 Dia 11 Enchimento e Semeadura de G-Rex

[00907] 8.7.1 Preparar G-Rex500MCS. Fora da BSC, removeu-se um

G-Rex500MCS da embalagem e inspecionou-se o frasco quanto a quaisquer trincas ou dobras na tubulação. Garantiu-se que todas as conexões luer e fechamentos estavam firmes. Fecharam-se todas as braçadeiras nas linhas do G-Rex500MCS exceto para a linha do filtro de ventilação. Usando um marcador desenhou-se uma linha na graduação de 4,5L.

[00908] 8.7.2 Removeu-se os Meios da incubadora. Removeu-se os “Meios CM2 Completos Dia 11”, preparados na etapa 8.4.35, da incubadora.

[00909] 8.7.3 Preparou-se para bombear meios. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) a linha vermelha do G-Rex500MCS ao conjunto de transferência de bomba repetidora fixou-se aos Meios CM2 Completos Dia 11.

[00910] 8.7.4 Preparar para bombear meios. Suspendeu-se a bolsa de “Meios CM2 Completos Dia 11” em um varão IV. Alimentou-se a tubulação da bomba através da Bomba Baxa.

[00911] 8.7.5 Bombeou-se meios dentro do G-Rex500MCS. Ajustou-se a Bomba Baxa para “Alto” e “9”. Bombeou-se 4,5L de meios dentro do G-Rex500MCS, enchendo a linha marcada no frasco na etapa 8.7.1.

[00912] 8.7.6 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente a linha vermelha (pela Nota de Processo 5.12) do G-Rex500MCS próximo à solda criada na etapa 8.7.3.

[00913] 8.7.7 Rotulou-se o Frasco. Rotulou-se o frasco com a Colagem de um rótulo de uma amostra “Dia 11 QA provido no processo “Dia 11”.

[00914] 8.7.8 Se aplicável: Incubou-se o frasco. Manteve-se o frasco na incubadora enquanto espera-se para semear com TIL.

[00915] 8.7.9 Soldou-se a Célula Alimentadora: Soldou-se a Embalagem de Transferência de Suspensão ao frasco. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a linha vermelha do G-Rex500MCS à Embalagem de Transferência da “Suspensão de Célula Alimentadora”.

[00916] 8.7.10 Adicionou-se Células Alimentadoras ao G-

Rex500MCS. Abriu-se todas as braçadeiras entre a Suspensão de Célula Alimentadora e G-Rex500MCS e adicionou-se Suspensão de Célula Alimentadora ao frasco pela alimentação por gravidade. Garantiu-se que a linha foi completamente depurada.

[00917] 8.7.11 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a linha vermelha próximo da solda criada na etapa 8.7.9.

[00918] 8.7.12 Soldou-se a Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL ao frasco. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a linha vermelha do G-Rex500MCS à Embalagem de Transferência de “Suspensão de TIL”.

[00919] 8.7.13 Adicionou-se TIL ao G-Rex500MCS. Abertas todas as braçadeiras entre a Suspensão de TIL e G-Rex500MCS e adicionou-se Suspensão de TIL ao frasco pela alimentação por gravidade. Garantiu-se que a linha estivesse completamente depurada.

[00920] 8.7.14 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a linha vermelha próximo da solda criada na etapa 8.7.12 para remover a bolsa de Suspensão de TIL.

[00921] 8.7.15 G-Rex500MCS Incubado. Checado que todas as braçadeiras no G-Rex500MCS foram fechadas exceto a linha de filtração grande e colocar na incubadora. Parâmetros da incubadora: Mostrador LED de Temperatura: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, Porcentagem de CO₂: $5,0 \pm 1,5\%$ de CO₂.

[00922] 8.7.16 Calculou-se a janela de incubação. Realizou-se cálculos para determinar o tempo apropriado para remover G-Rex500MCS da incubadora no Dia 16. Tempo de incubação (Etapa 8.7.15). Limite inferior: Tempo de incubação + 108 horas. Limite superior: Tempo de incubação + 132 horas.

[00923] 8.7.17 Monitoramento Ambiental. Depois de processar, verificada a BSC e monitoramento de pessoal foi realizado.

- [00924] 8.7.18 Submeter as Amostras. Submeter as amostras ao Login.
- [00925] 8.7.19 Revisar a Seção 8.7
- [00926] 8.8 Dia 11 Criopreservação de TIL em Excesso
- [00927] 8.8.1 Se Aplicável: Congelou-se os Frascos de TIL em Excesso. Verificou-se se o CRF foi preparado antes do congelamento. Realizou-se a Criopreservação.
- [00928] 8.8.2 Se Aplicável: Iniciou-se CRF. Registrou-se o número total de frascos colocou-se dentro do CRF (não incluindo branco). Verificação do número de frascos transferiu-se dentro da CRF número total igual de frascos preparados na Etapa 8.5.72 ou Etapa 8.5.84
- [00929] Etapa 8.5.72C ou Etapa 8.5.84
- [00930] 8.8.3 Se aplicável: Iniciou-se a porção automatizada do perfil de congelamento. Registrou-se TEMPO DE PARTIDA para o início da porção automatizada do perfil de congelamento.
- [00931] 8.8.4 Se Aplicável: Transferiu-se os frascos do Congelador de Taxa Controlada para armazenagem apropriada. Na conclusão do congelamento, transferência dos frascos do CRF para o recipiente de armazenagem apropriado.
- [00932] 8.8.5 Se aplicável: Transferiu-se os frascos para armazenagem apropriada. Registrou-se localização de armazenagem no LN2.
- [00933] 8.8.6 Revisar a Seção 8.8
- [00934] 8.9 Dia 16 Preparação de Meios
- [00935] 8.9.1 Meios AIM-V Pré-aquecidos. Removeu-se três bolsas dos meios CTS AIM V de 10L de 2 a 8°C pelo menos 12 horas antes do uso e colocadas na temperatura ambiente protegidas da luz. Verificação se cada bolsa está dentro da validade. Rotulou-se cada bolsa com Número de Bolsa (1 a 3), número de lote, data e “tempo de início de aquecimento HHMM”. Registrou-se o tempo de início de aquecimento e data.
- [00936] 8.9.2 Calculou-se o tempo no qual os meios da etapa 8.9.1

foram aquecidos. Calculou-se o tempo de aquecimento das bolsas de meios 1, 2 e 3 da etapa 8.9.1. Garantiu-se que todas as bolsas tenham sido aquecidas para uma duração entre 12 e 24 horas.

[00937] 8.9.3 Sanitização da sala checada, depuração da linha e materiais. Confirmou-se a sanitização da sala, depuração da linha e materiais.

[00938] 8.9.4 Conclusão garantida da tabela de pré-processamento.

[00939] 8.9.5 Monitoramento Ambiental. Antes do processamento, garantiu-se que o monitoramento ambiental pré-processo foi iniciado.

[00940] 8.9.6 Instalou-se Labtainer de 10L para sobrenadante. Na BSC fixou-se a extremidade de diâmetro maior de uma bomba transferência de fluido ajustada a um dos orifícios fêmea de uma Bolsa Labtainer de 10 L usando os conectores de Luer.

[00941] 8.9.7 Instalou-se Labtainer de 10L para sobrenadante. Rotulado como “Sobrenadante” e Número de lote.

[00942] 8.9.8 Instalou-se Labtainer de 10L para sobrenadante. Garantiu-se que todas as braçadeiras foram fechadas antes de remover da BSC. NOTA: A bolsa de sobrenadante foi usada durante a Colheita de TIL (Seção 8.10), que pôde ser realizada concorrentemente com a preparação dos meios.

[00943] 8.9.9 Descongelou-se IL-2. Descongelou-se 5 alíquotas x 1,1 mL de IL-2 (6×10^6 IU/ mL) (BR71424) por bolsa de meios CTS AIM V até que todo o gelo tivesse fundido. Registrou-se Número de lote e Validade da IL-2. Fixou-se rótulos de IL-2.

[00944] 8.9.10 GlutaMax Aliquotado. Na BSC, aliquotou-se 100,0 mL de Glutamax dentro de um recipiente apropriadamente dimensionado. Registrou-se o volume adicionado a cada recipiente

[00945] NOTA: Inicialmente preparou-se uma bolsa de meios AIM-V seguindo a Etapa 8.9.10 a Etapa 8.9.28. Bolsas adicionais requeridas foram determinadas na etapa 8.10.59.

[00946] 8.9.11 Rotulou-se os recipientes. Rotulou-se cada recipiente como “GlutaMax.”

[00947] 8.9.12 Adicionou-se IL-2 ao GlutaMax. Usando uma micropipeta, adicionou-se 5,0 mL de IL-2 a cada recipiente GlutaMax. Garantiu-se que a ponta fosse enxaguada pela Nota de Processo 5.18 e usou-se uma nova ponta de pipeta para cada mL adicionado. Registrou-se o volume adicionado a cada recipiente Glutamax abaixo.

[00948] 8.9.13 Rotulou-se os recipientes. Rotulou-se cada recipiente como “GlutaMax + IL-2” e número do recipiente.

[00949] 8.9.14 Preparou-se a bolsa de meios CTS AIM V para formulação. Garantiu-se que a bolsa de meios CTS AIM V de 10L (W3012717) fosse aquecida na temperatura ambiente e protegida da luz por 12 a 24 horas antes do uso. Registrou-se o tempo final de incubação na etapa 8.9.2.

[00950] 8.9.15 Preparou-se a bolsa de meios CTS AIM V para formulação. Na BSC, braçadeira fechada sobre um conjunto de transferência de plasma de 4”, depois conectada à bolsa usando os orifícios de ponta. NOTA: Manteve-se pressão constante enquanto girou-se a ponta em uma direção. Garantiu-se não perfurar o lado do orifício.

[00951] 8.9.16 Preparou-se bolsa de meios CTS AIM V para formulação. Conectada à extremidade de diâmetro maior de um conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora para o conjunto de transferência de plasma de 4” por intermédio de luer.

[00952] 8.9.17 Estagiar Bomba Baxa. Estagiar Bomba Baxa próximo à BSC. Seção de tubulação de bomba removida do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora da BSC e instalada na bomba repetidora.

[00953] 8.9.18 Preparou-se para formular meios. Na BSC, removeu-se a seringa do Sistema de Dispensa de Líquido Pumpmatic (PLDS) e descartada. NOTA: Garantiu-se não comprometer a esterilidade da pipeta

PLDS.

[00954] 8.9.19 Preparou-se para formular meios. Conectada pipeta PLDS à extremidade de diâmetro menor do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora por intermédio de conexão luer e colocada a ponta da pipeta no “GlutaMax + IL-2” preparado na etapa 8.9.13 para aspiração. Todas as braçadeiras abertas entre recipiente e bolsa de 10L.

[00955] 8.9.20 GlutaMax +IL-2 bombeado dentro da bolsa. Ajustar a velocidade da bomba para “Médio” e “3” e bomba todo “GlutaMax + IL-2” dentro da bolsa de meios CTS AIM V de 10L. Uma vez que nenhuma solução permanece, linha clara e bomba parada. Registrou-se o volume de GlutaMax contendo IL-2 adicionou-se a cada bolsa de Aim V abaixo. Registrou-se/

[00956] 8.9.21 Removeu-se PLDS. Garantiu-se que todas as braçadeiras foram fechadas e removeu-se a pipeta de PLDS do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora. Removeu-se o conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora e tampa vermelha do conjunto de transferência de plasma de 4”.

[00957] 8.9.22 Rotulou-se as Bolsas. Rotulou-se cada bolsa de “Meios CM4 completo Dia 16” preparada.

[00958] 8.9.23 Removeu-se Meios de retenção por Plano de Amostra. Usando uma seringa de 30 mL, removeu-se 20,0 mL de “meios CM4 Completos Dia 16” fixando-se a seringa ao conjunto de transferência de plasma de 4” e dispensou-se a amostra dentro de um Tubo cônico de 50 mL.

[00959] NOTA: Apenas removeu-se a Amostra de Meios de Retenção da primeira bolsa de meios preparada. NOTA: Garante-se o conjunto de transferência de plasma de 4” foi fechada ou tampada vermelha depois da remoção de seringa.

[00960] 8.9.24 Fixou-se novo conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora. Fixou-se a extremidade de diâmetro maior de um novo conjunto de transferência de bomba de fluido no conjunto de transferência de

plasma de 4” que foi conectado à bolsa de “Meios CM4 Completo Dia 16”.

[00961] 8.9.25 Amostra rotulada e armazenada. Rotulou-se com rótulo de inventário de plano de amostra e armazenada para reter amostra de Meios de 2 a 8°C até submetido ao Login para testar por Plano de Amostra.

[00962] 8.9.26 Assinado para Amostragem. Garantiu-se que a folha de plano de amostra LIMS fosse completado para remoção da amostra.

[00963] 8.9.27 Monitorar Incubadora. Incubadora Monitorada. Se aplicável, para Etapa 8.9.10, monitorar quanto às bolsas adicionais preparadas. Parâmetros da incubadora:

[00964] Mostrador LED de Temperatura: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, Porcentagem de CO_2 : $5,0 \pm 1,5$ % de CO_2 .

[00965] 8.9.28 Aqueceu-se Meios CM4 Completos Dia 16. Aqueceu-se a primeira bolsa de Meios CM4 Completos Dia 16 na incubadora por ≥ 30 minutos até pronta para o uso. Se aplicável, para Etapa 8.10.59, aqueceu-se bolsas adicionais.

[00966] 8.9.29 Preparou-se Diluições. Na BSC, adicionou-se 4,5 mL de Meios AIM-V que foram rotulados com Número de lote do registro de batelada e “Para As Diluições de Contagem de Célula” para cada 4 x tubos cônicos de 15 mL. Rotulou-se os tubos cônicos com o número de lote e número de tubo (1 a 4). Rotulou-se 4 criofrascos com número do frasco (1 a 4). Manter os frascos sob a BSC para serem usados na etapa 8.10.31.

[00967] 8.9.30 Revisada a Seção 8.9

[00968] 8.10 Dia 16 Divisão de REP

[00969] 8.10.1 Tabela de pré-processamento.

[00970] 8.10.2 Incubadora Monitorada. Incubadora Monitorada. Parâmetros da incubadora: Mostrador LED de Temperatura: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, Porcentagem de CO_2 : $5,0 \pm 1,5$ % de CO_2

[00971] 8.10.3 Removeu-se G-Rex500MCS da incubadora. Realizou-se checagem abaixo para garantir que parâmetros de incubação sejam

atingidos antes de remover G-Rex500MCS da incubadora.

Limite inferior da Etapa 8.7.16B (DDMMYY HHMM)	Limite superior da Etapa 8.7.16C (DDMMYY HHMM)	Tempo de Remoção da incubadora (DDMMYY HHMM)	É 8.7.16B < Tempo de Remoção da < Etapa 8.7.16C Sim/Não*

[00972] Removeu-se G-Rex500MCS da incubadora.

[00973] 8.10.4 Instalação da Embalagem de Transferência de 1L. Selou-se termicamente uma Embalagem de Transferência de 1L (W3006645) pela Nota 5.12 processada, deixando ~12” (30 cm) de linha.

[00974] 8.10.5 Preparou-se a Embalagem de Transferência de 1L. Rotulou-se a Embalagem de Transferência de 1L como Suspensão de TIL.

[00975] 8.10.6 Pesou-se a Embalagem de Transferência de 1L Colocou-se a Embalagem de Transferência de 1L, incluindo a linha inteira, sobre uma balança e registrado o peso seco.

[00976] 8.10.7 Instalou-se GatheRex. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a linha de remoção de meios vermelha do G-Rex500MCS ao conjunto de transferência de bomba repetidora na bolsa Labtainer de 10 L “Sobrenadante” preparada na etapa 8.9.8. Soldou-se estéril a linha de remoção de célula clara do G-Rex500MCS à Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL preparada na etapa 8.10.5.

[00977] 8.10.8 Instalou-se GatheRex. Colocou-se o frasco G-Rex500MCS sobre o lado esquerdo do GatheRex. Colocou-se a bolsa labtainer de sobrenadante e Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL ao lado direito.

[00978] 8.10.9 Instalou-se GatheRex. Instalada a linha de remoção de meios vermelha do G-Rex500MCS na braçadeira de topo (marcada com uma linha vermelha) e guias de tubulação no GatheRex. Instalada a linha de colheita clara do G-Rex500MCS na braçadeira de fundo (marcada com uma linha azul) e guias de tubulação no GatheRex.

[00979] 8.10.10 Instalou-se GatheRex. Fixou-se a linha de gás do

GatheRex ao filtro estéril do G-Rex500 MCS. NOTA: Antes de remover o sobrenadante do G-Rex500MCS, garantiu-se que todas as braçadeiras nas linhas de remoção de célula estivessem fechadas.

[00980] 8.10.11 Redução de Volume de G-Rex500MCS. Transferiu-se ~4,5L de sobrenadante de cultura do G-Rex500MCS para o Labtainer de 10L por SOP-01777. Inspeccionar visualmente G-Rex500MCS para garantir que o nível do frasco e meios foram reduzidos até a extremidade do tubo mergulhador de aspiração. NOTA: Se o GatheRex para prematuramente, o mesmo pode ser reiniciado apertando o botão com a seta apontando para a direita mais uma vez.

[00981] 8.10.12 Preparou-se frasco para Colheita de TIL. Depois da remoção do sobrenadante, fechadas todas as braçadeiras para a linha vermelha.

[00982] 8.10.13 Início da Colheita de TIL. Registrou-se o tempo de início da Colheita de TIL.

[00983] 8.10.14 Início da Colheita de TIL. Bater vigorosamente no frasco e turbilhonar os meios para a liberação de células. Realizou-se uma inspeção do frasco para garantir que todas as células descolaram. NOTA: Contatar a Gestão de Área se as células não descolarem.

[00984] 8.10.15 Início da Colheita de TIL. Inclinou-se o frasco para garantir que a mangueira estivesse na borda do frasco. Nota: Se o canudo de coleta de célula não estiver na junção da parede e membrana de fundo, bater o frasco enquanto inclinado em um ângulo de 45º é usualmente suficiente para posicionar apropriadamente o canudo.

[00985] 8.10.16 Colheita de TIL. Liberadas todas as braçadeiras levando à Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL.

[00986] 8.10.17 Colheita de TIL. Usando o GatheRex transferiu-se a suspensão de célula dentro da Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL. NOTA: Estar seguro de manter a borda inclinada até que todas as células

e meios sejam colhidos.

[00987] 8.10.18 Colheita de TIL. Inspeccionou-se a membrana quanto às células aderentes.

[00988] 8.10.19 Enxague da membrana do frasco. Enxaguou-se o fundo do G-Rex500MCS. Cobriu-se ~1/4 da membrana de troca de gás com meios de enxágue.

[00989] 8.10.20 Fecharam-se as braçadeiras no G-Rex500MCS. Garantiu-se que todas as braçadeiras estivessem fechadas no G-Rex500MCS.

[00990] 8.10.21 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a Embalagem de Transferência contendo o TIL tão próximo da solda quanto possível de modo que o comprimento da tubulação global permanecesse aproximadamente o mesmo.

[00991] 8.10.22 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente o Labtainer de 10L contendo o sobrenadante (pela Nota de Processo 5.12) e passado para dentro da BSC para a coleta de amostra na etapa 8.10.25.

[00992] 8.10.23 Calculou-se o volume de Suspensão de TIL. Registrou-se o peso da Embalagem de Transferência com suspensão de célula e calculou-se o volume da suspensão.

[00993] 8.10.24 Preparou-se a Embalagem de Transferência para a remoção de amostra. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) um conjunto de transferência de plasma de 4", à Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL da etapa 8.10.21, deixando a extremidade luer fêmea fixada tão próximo da bolsa quanto possível.

[00994] 8.10.25 Removeram-se as amostras de teste do sobrenadante de célula. Na BSC, remover 10,0 mL de sobrenadante do labtainer de 10L usando o orifício luer fêmea e seringa apropriadamente dimensionada. Colocou-se dentro de um tubo cônico de 15 mL e rotulou-se como "BacT" Reter o tubo para amostra de BacT na etapa 8.10.28.

[00995] 8.10.26 Removeram-se as amostras de teste do sobrenadante

de célula. Usando uma seringa separada, removeu-se 10,0 mL de sobrenadante e colocou-se dentro de um tubo cônico de 15 mL. Reteve-se o tubo para amostra de Micoplasma para o uso na etapa 8.10.32. Rotulou-se o tubo como “Diluyente de Micoplasma “

[00996] 8.10.27 Fechou-se a bolsa de sobrenadante. Colocou-se uma tampa vermelha sobre o orifício luer para fechar a bolsa e passada para fora da BSC.

[00997] 8.10.28 Amostragem de teste de Esterilidade & BacT. Na BSC, removeu-se uma amostra de 1,0 mL do cônico de 15 mL rotulou-se BacT preparada na etapa 8.10.25 usando uma seringa apropriadamente dimensionada e inoculou-se a garrafa anaeróbica. Repetiu-se o acima para a garrafa aeróbica. NOTA: esta etapa pode ser realizada fora de sequência.

[00998] 8.10.29 Rotulou-se e armazenou-se amostras. Rotulou-se com rótulo de inventário de plano de amostra e armazenou-se a amostra de BacT na temperatura ambiente, protegida da luz, até submetida ao Login para teste por Plano de Amostra. NOTA: Não cobrir o código de barras na garrafa com os rótulos.

[00999] 8.10.30 Assinado para Amostragem. Garantiu-se que a folha de plano de amostra LIMS fosse completada para remoção da amostra.

[001000] 8.10.31 Removeu-se a Amostra de Contagem de Células. Na BSC, usando seringas de 3 mL separadas para cada amostra, removeu-se 4 x 1,0 mL de Amostra de Contagem de Células da Embalagem de Transferência de “Suspensão de TIL” usando a conexão luer. Colocou-se as amostras em criofrascos preparados na etapa 8.9.29.

[001001] 8.10.32 Removeu-se as Amostras de Micoplasma. Usando uma seringa de 3 mL, removeu-se 1,0 mL da Embalagem de Transferência de Suspensão de TIL e colocou-se dentro de cônico de 15 mL rotulou-se “Diluyente de Micoplasma “ preparado na etapa 8.10.26.

[001002] 8.10.33 Rotulou-se e armazenou-se a amostra. Rotulou-se com

rótulo de inventário de plano de amostra e armazenou-se a amostra de Micoplasma de 2 a 8°C até submetido ao Login para testar pelo Plano de Amostra.

[001003] 8.10.34 Assinado para Amostragem. Garantiu-se que a folha de plano de amostra LIMS fosse completada para a remoção da amostra.

[001004] 8.10.35 Preparou-se a Embalagem de Transferência para Semeadura. Na BSC, fixou-se a extremidade da tubulação de diâmetro grande de um Conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora para o adaptador Luer na Embalagem de Transferência contendo o TIL. Fechou-se a linha próximo da Embalagem de Transferência usando uma pinça hemostática. Colocou-se uma tampa vermelha sobre a extremidade do conjunto de transferência.

[001005] 8.10.36 Colocou-se TIL na incubadora. Removeu-se a suspensão de célula da BSC e colocou-se na incubadora até necessário. Registrou-se o tempo.

[001006] 8.10.37 Realizou-se as Contagens de célula. Realizou-se as contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. Exibiu-se a Contagem de Células Diluídas inicialmente adicionando-se 0,5 mL de suspensão de célula dentro de 4,5 mL de meios AIM-V preparados na etapa 8.9.29. Isto deu uma diluição 1:10.

[001007] 8.10.38 Registraram-se os volumes de amostra da Contagem de Célula

[001008] 8.10.39 Determinou-se o Fator de Multiplicação.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume Total de Amostra da Contagem de Célula	8.10.38A + 8.10.38B	C. µL
Fator de Multiplicação	$C \div 8.10.38A$	D.

[001009] 8.10.40 Selecionou-se protocolos e inseriram-se fatores de multiplicação. Garantiu-se que o protocolo “Ensaio de Contagem de Célula Viável” fosse selecionado, todos os fatores de multiplicação e amostra e volumes de diluente foram inseridos.

[001010] 8.10.41 Registrou-se Nome de Arquivo, Viabilidade e Contagens de célula a partir do Nucleoview.

[001011] 8.10.42 Determinou-se a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.10.41A + 8.10.41B) \div 2$	E. %
Concentração de Célula Viável	$(8.10.41C + 8.10.41D) \div 2$	F. células/mL

[001012] 8.10.43 Limites Superior e Inferior Determinados para Contagens.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.10.42F \times 0,9$	G. células/mL
Limite superior	$8.10.42F \times 1,1$	H. células/mL

[001013] 8.10.44 Ambas as contagens estavam dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.10.41C \text{ e } D \geq 8.10.43G$	
Limite superior	$8.10.41 C \text{ e } D \leq 8.10.43H$	

[001014] 8.10.45 Se Aplicável: Realizou-se contagens de célula. Realizou-se contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. NOTA: A diluição pôde ser ajustada consequentemente com base na concentração esperada de células.

[001015] 8.10.46 Se Aplicável: Registrou-se os volumes de amostra da Contagem de Célula. NOTA: Se nenhuma diluição foi necessária, inserir “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0

[001016] 8.10.47 Se Aplicável: Determinou-se o Fator de Multiplicação.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume Total da Amostra da Contagem de Célula	$8.10.46A + 8.10.46B$	C. mL
Multiplicação Factor	$C \div 8.10.46A$	D.

[001017] 8.10.48 Se Aplicável: Selecionar protocolos e inserir fatores de multiplicação. Garantir que o protocolo “Ensaio de Contagem de Célula Viável” tenha sido selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos.

[001018] NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra

[μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0

[001019] 8.10.49 Se Aplicável: Registrou-se as Contagens de célula a partir do Nucleoview

[001020] 8.10.50 Se Aplicável: Determinou-se a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.10.49A + 8.10.49B) \div 2$	E. %
Concentração de Célula Viável	$(8.10.49C + 8.10.49D) \div 2$	F. células/mL

[001021] 8.10.51 Se Aplicável: Limites Superior e Inferior Determinados para Contagens.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.10.50F \times 0,9$	G. células/mL
Limite superior	$8.10.50F \times 1,1$	H. células/mL

[001022] 8.10.52 Se Aplicável: As contagens estavam dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.10.49 C e D \geq 8.10.51G$	
Limite superior	$8.10.49 C e D \leq 8.10.51H$	

[001023] NOTA: Se cada resultado for “Não” continuar para a etapa 8.10.53 para determinar uma média de todas as contagens de célula coletada.

[001024] 8.10.53 Se Aplicável: Determinou-se uma Média da Concentração de Células Viáveis a partir de todas as quatro contagens realizadas.

[001025] 8.10.54 Volume Ajustado de Suspensão de TIL. Calculou-se o Volume Ajustado de Suspensão de TIL depois da remoção da Amostra de Contagem de Células. Volume de Célula de TIL Total da etapa 8.10.23C menos 5,0 mL removidos para teste.

[001026] 8.10.55 Células TIL Viáveis Totais Calculadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Concentração Média de Célula Viável*	8.10.42 F* -ou- 8.10.50 F* -ou- 8.10.53E*	A. células/mL
Volume Total	8.10.54 C	B. mL
Células viáveis totais	A x B	C. células

[001027] 8.10.56 Calculou-se frascos para a subcultura. Calculou-se o número total de frascos para semear. NOTA: Arredondou-se o número de frascos G-Rex500MCS a fim de ver o número inteiro aproximado.

Contagem Total de Célula Viável da etapa 8.10.55C A	Células Alvo Requeridas por Frasco B	Número de Frascos G-Rex500MCS para Semear $C = A \div B$
células	$1,0 \times 10^9$ células/frasco	frascos

[001028] NOTA: O número máximo de frascos G-Rex500MCS para semear foi cinco. Se o número calculado de frascos para semear excedeu cinco, apenas cinco foram semeados USANDO O VOLUME INTEIRO DE SUSPENSÃO de CÉLULA DISPONÍVEL

[001029] 8.10.57 Calcular o número de frascos para subcultura

Critérios	Sim/Não
Número de Frascos G-Rex500MCS para Semear Etapa 8.10.56C ≤ 5 Se sim, semear o número de frascos calculados na etapa 8.10.58.	
Número de Frascos G-Rex500MCS para Semear na Etapa 8.10.56C > 5 Se sim, semear 5 frascos com TODAS as células disponíveis.	

[001030] 8.10.58 Revisão de QA dos Cálculos da Contagem de Célula realizados nas etapas 8.10.38 – 8.10.57.

[001031] 8.10.59 Determinou-se o número necessário de bolsas de meios adicionais. Calculou-se o número de bolsas de meios requeridos além da bolsa preparada na etapa 8.9.28.

Número de Frascos G-Rex500MCS para Semear (Etapa 8.10.56C) A	Número Requerido de Bolsas de Meios $B = A \div 2^*$	Número of Bolsas Preparadas na Etapa 8.9.22 C	Número de Bolsas Adicionais para Preparar $D = B - C$
		1	

*Arredondou-se o número de bolsas de meios requeridas até o número inteiro seguinte.

[001032] 8.10.60 Se Aplicável: Preparou-se meios adicionais. Preparou-se uma bolsa de 10L de “Meios CM4 Dia 16” para cada um dos dois frasco G-Rex-500M necessários calculados na etapa 8.10.59D. Prosseguido para a etapa 8.10.62 e semeado o(s) primeiro(s) frasco(s) GREX-500M enquanto meios adicionais foram preparados e aquecidos.

[001033] 8.10.61 Se Aplicável: Preparou-se bolsas de meios adicionais.

Preparou-se e aqueceu-se o número calculado de bolsas de meios adicionais determinado na etapa 8.10.59D, repetindo da Etapa 8.9.10 até Etapa 8.9.28.

[001034] 8.10.62 Encheu-se G-Rex500MCS. Aberto um G-Rex500MCS sobre a bancada e inspecionado quanto a trincas no vaso ou dobras na tubulação. Garantiu-se que todas as conexões e fechamentos luer estavam firmes. Fez-se uma marca na linha de 4500 mL no lado de fora do frasco com um marcador. Fechadas todas as braçadeiras no G-Rex500MCS exceto a linha do filtro grande.

[001035] 8.10.63 Cheio G-Rex500MCS. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a linha de meios vermelha de um G-Rex500MCS para o ajuste da transferência de fluido nas bolsas de meios preparadas na etapa 8.9.28.

[001036] 8.10.64 Preparou-se para bombear meios. Pendurou-se “CM4 Dia 16 Meios” em uma haste IV. Alimentou-se a tubulação da bomba através da Bomba Baxa.

[001037] 8.10.65 Bombear meios para dentro do G-Rex500MCS. Ajustar a Bomba Baxa no “Alto” e “9” e bombear 4500 mL de meios para dentro do frasco. Bombeou-se 4,5L de “Meios CM4 Dia 16” dentro do G-Rex500MCS, enchendo até a linha marcada no frasco na etapa 8.10.62. Uma vez que os 4,5L de meios foram transferidos, parou-se a bomba.

[001038] 8.10.66 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a linha de meios vermelha de G-Rex500MCS, próximo da solda criada na etapa 8.10.63, removendo a bolsa de meios.

[001039] 8.10.67 Enchimento Repetido. Repetir as etapas 8.10.62-8.10.66 para cada frasco calculado na etapa 8.10.56C conforme os meios são aquecidos e preparados para o uso.

[001040] NOTA: Frascos múltiplos podem ser cheios ao mesmo tempo usando enchimento por gravidade ou bombas múltiplas. NOTA: Encheu-se apenas dois frascos por bolsa de meios.

[001041] 8.10.68 Registrou-se e rotulou-se o(s) frasco(s) cheio(s).

Rotulou-se cada frasco alfabeticamente conforme o mesmo foi cheio e com QA provido no rótulo de processo “Dia 16”.

[001042] 8.10.69 Rotulou-se a Amostra. Fixou-se uma amostra “Dia 16” rotulada abaixo.

[001043] 8.10.70 Se aplicável: Incubou-se o frasco. Manteve-se o frasco na incubadora enquanto à espera para semear com TIL.

[001044] 8.10.71 Verificou-se o Número de Frascos Cheios. Registrou-se o número total de frascos cheio.

[001045] 8.10.72 Calculou-se o volume da suspensão de célula a adicionar. Calculou-se o volume alvo da suspensão de TIL a adicionar aos novos frascos G-Rex500MCS.

Volume Total da suspensão de TIL da etapa 8.10.54C A	Número de frasco(s) cheios da etapa 8.10.71	Volume Alvo de Suspensão de Célula para transferência para cada frasco C= A÷B
mL		mL

[001046] 8.10.56C excede cinco apenas cinco serão semeados, USANDO O VOLUME TOTAL DE SUSPENSÃO DE CÉLULA.

[001047] 8.10.73 Preparou-se Frascos para Semeadura. Removeu-se G-Rex500MCS da etapa 8.10.70 da incubadora.

[001048] 8.10.74 Preparou-se para bombear. Fechadas todas as braçadeiras no G-Rex500MCS exceto a linha de filtração grande. Alimentou-se a tubulação da bomba através da Bomba Baxa.

[001049] 8.10.75 Removeu-se TIL da incubadora. Removeu-se a Embalagem de Transferência da “Suspensão de TIL” da incubadora e registrado tempo final de incubação na etapa 8.10.36.

[001050] 8.10.76 Preparou-se a suspensão de célula para semeadura. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a Embalagem de Transferência da “Suspensão de TIL” da etapa 8.10.75 à linha de entrada da bomba.

[001051] 8.10.77 Balança tarada. Colocou-se a bolsa da Suspensão de TIL sobre uma balança. Preparada a linha da bolsa da Suspensão de TIL para a solda usando a Bomba Baxa ajustada para “Baixo” e “2”. Tarou-se a

balança.

[001052] 8.10.78 Semeou-se o frasco com Suspensão de TIL. Ajustou-se a Bomba Baxa para “Médio” e “5”. Bombeou-se o volume de Suspensão de TIL calculado na etapa 8.10.72C dentro do frasco. Registrou-se o volume de Suspensão de TIL adicionado a cada frasco.

[001053] 8.10.79 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a Embalagem de Transferência da “Suspensão de TIL”, deixando tubulação suficiente para soldar no frasco seguinte. Usou-se o esvaziador de linha para limpar a Suspensão de TIL residual na linha do frasco G-Rex dentro do vaso.

[001054] 8.10.80 Encheram-se os frascos remanescentes. Entre cada frasco semeado, garantiu-se misturar a Embalagem de Transferência da “Suspensão de TIL” e repetiu-se as etapas 8.10.76-8.10.79 para semear todos os frascos remanescentes. Encheram-se os frascos na ordem alfabética.

[001055] 8.10.81 Monitorou-se a Incubadora. NOTA: Se os frascos devam ser divididos entre duas incubadoras, garantir monitorar ambas. Parâmetros da incubadora: Mostrador LED de Temperatura: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, Porcentagem de CO₂: $5,0 \pm 1,5\% \text{CO}_2$.

[001056] 8.10.82 Frascos Incubados. Registrou-se o tempo no qual cada frasco é colocado na incubadora.

[001057] 8.10.83 Calculou-se a janela de incubação. Cálculos realizados abaixo para determinar a faixa de tempo para remover G-Rex500MCS da incubadora no Dia 22.

Frasco	8.10.83A Tempo de incubação (Etapa 8.10.82) (DDMMYY HHMM)	8.10.83B Limite inferior: Tempo de incubação + 132 horas (DDMMYY HHMM)	8.10.83C Limite superior: Tempo de incubação + 156 horas (DDMMYY HHMM)

[001058] 8.10.84 Monitoramento Ambiental. Depois de processar, verificou-se BSC e o monitoramento de pessoal foi realizado.

[001059] 8.10.85 Submissão de amostra. Garantiu-se que todas as

Amostras do Dia 16 fossem submetidas ao Login.

[001060] 8.10.86 Revisou-se a Seção 8.10.

[001061] 8.11 Dia 22 Preparação de Tampão de Lavagem

[001062] 8.11.1 Sanitização de sala checada, depuração de linha e materiais.

[001063] 8.11.2 Conclusão garantida da lista de checagem de pré-processamento.

[001064] 8.11.3 Monitoramento Ambiental. Antes do processamento, garantiu-se que o monitoramento ambiental pré-processo fosse realizado.

[001065] 8.11.4 Preparou-se a Bolsa Labtainer de 10 L Na BSC, fixar um conjunto de transferência de plasma de 4” a uma Bolsa Labtainer de 10 L por intermédio de conexão luer.

[001066] 8.11.5 Preparou-se a Bolsa Labtainer de 10 L Rotulou-se como “Sobrenadante”, número de lote e data inicial.

[001067] 8.11.6 Preparou-se a Bolsa Labtainer de 10 L. Fechou-se todas as braçadeiras antes de transferir para fora da BSC. NOTA: Preparou-se uma Bolsa Labtainer de 10 L para cada um dos dois frascos G-Rex500MCS a serem colhidos. NOTA: A(s) bolsa(s) de sobrenadante foram usadas na Seção 8.12, que seriam conduzidas concorrentemente com a Seção 8.11.

[001068] 8.11.7 Soldou-se o conjunto de transferência de fluido. Fora da BSC, fechou-se todas as braçadeiras no 4S-4M60. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) conjunto de transferência de fluido repetidor a uma das extremidades de luer macho de 4S-4M60.

[001069] 8.11.8 Passou-se os materiais para dentro da BSC. Passou-se Plasmalyte-A e Albumina Humana a 25% para dentro da BSC. Passou-se o 4S-4M60 e a montagem do conjunto de transferência de fluido repetidor para dentro da BSC.

Descrição de Componente	Quantidade Necessária
Plasmalyte-A	3000,0 mL
Albumina Humana a 25%	120,0 mL

4S-4M60 com Conjunto de Transferência de Fluido Repetidor	[001070] 1 Aparelho Etapa 8.11.7

[001071] 8.11.9 Bombeou-se Plasmalyte dentro da bolsa de 3000 mL. Perfurou-se três bolsas de Plasmalyte-A para o conjunto Conector 4S-4M60. NOTA: Limpar a cobertura do orifício com um cotonete com álcool (W3009488) antes de remover. NOTA: Manter pressão constante enquanto girou-se a ponta em uma direção. Garantir que não perfure o lado do orifício.

[001072] 8.11.10 Bombeou-se Plasmalyte para dentro da bolsa de 3000 mL. Conectou-se uma bolsa de coleta de 3000 mL Origen por intermédio de conexão luer à extremidade de diâmetro maior do conjunto de transferência de bomba repetidora.

[001073] 8.11.11 Bombeou-se Plasmalyte para dentro de bolsa da 3000 mL. Fechou-se as braçadeiras sobre as linhas não utilizadas da Bolsa de 3000 mL Origen.

[001074] 8.11.12 Bombeou-se Plasmalyte para dentro da bolsa de 3000 mL. Montou-se a Bomba Baxa próxima à BSC. Alimentou-se a tubulação do conjunto de transferência através da Bomba Baxa situada fora da BSC. Ajustou-se a bomba para “Alto” e “9”.

[001075] 8.11.13 Bombeou-se Plasmalyte para dentro da bolsa de 3000 mL. Abertas todas as braçadeiras da Plasmalyte-A para a Bolsa Origen de 3000 mL.

[001076] 8.11.14 Bombeou-se Plasmalyte para dentro da bolsa de 3000 mL. Bombeou-se todo do Plasmalyte-A para dentro da Bolsa Origen de 3000 mL. Uma vez que todo o Plasmalyte-A foi transferido, parou-se a bomba.

[001077] 8.11.15 Bombeou-se Plasmalyte para dentro da bolsa de 3000 mL. Se necessário, removeu-se ar da Bolsa Origen de 3000 mL pela reversão da bomba e manipulando-se a posição da bolsa.

[001078] 8.11.16 Bombeou-se Plasmalyte para dentro da bolsa de 3000 mL. Fechadas todas as braçadeiras. Removeu-se a bolsa de 3000 mL do conjunto de transferência de fluido da bomba repetidora por intermédio de

conexão luer e colocou-se uma tampa vermelha (W3012845) na linha para a bolsa.

[001079] 8.11.17 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Abriu-se mini ponto de ventilação. Sem comprometer a esterilidade do ponto, garantiu-se que a tampa azul estivesse firmemente presa.

[001080] 8.11.18 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Perfurou-se o septo de uma garrafa a 25% de Albumina Humana com o miniponto de ventilação. NOTA: Garantiu-se não comprometer a esterilidade do ponto.

[001081] 8.11.19 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Repetiu-se a Etapa 8.11.17 – Etapa 8.11.18 duas vezes para um total de três (3) garrafas de Albumina Humana a 25% perfuradas.

[001082] 8.11.20 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Removeu-se a tampa azul de um mini ponto de ventilação e fixou-se uma seringa de 60 mL à garrafa de Albumina Sérica Humana a 25%.

[001083] 8.11.21 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Puxou-se 60 mL de Albumina Sérica Humana a 25%. NOTA: Pode ser necessário usar mais do que uma garrafa de Albumina Sérica Humana a 25%. Se necessário, desconectar a seringa do mini ponto de ventilação e conectá-la ao mini ponto de ventilação seguinte em uma garrafa de Albumina Sérica Humana a 25%. Não remover o mini ponto de ventilação da garrafa de Albumina Sérica Humana a 25%.

[001084] 8.11.22 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Uma vez que 60 mL tenha sido obtido, remover a seringa do mini ponto de ventilação.

[001085] 8.11.23 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Fixar a seringa ao orifício de injeção sem agulha na Bolsa Origen de 3000 mL cheia com Plasmalyte-A na etapa 8.11.16. Dispensou-se toda da Albumina Humana a 25%. NOTA: Limpou-se o orifício de injeção

desnecessário com uma almofada de álcool antes de cada uso.

[001086] 8.11.24 Adicionou-se Albumina Humana a 25% à bolsa de 3000 mL. Repetida a Etapa 8.11.20 - Etapa 8.11.23 para se obter um volume final de 120,0 mL de Albumina Humana a 25%.

[001087] 8.11.25 Misturou-se a Bolsa. Misturou-se suavemente a bolsa depois que toda da Albumina Humana a 25% foi adicionada.

[001088] 8.11.26 Rotulou-se a Bolsa. Rotulou-se como “Tampão de Lavagem LOVO” e número de lote e designou-se uma validade de 24 horas.

[001089] 8.11.27 Preparou-se Diluente IL-2. Usando uma seringa de 10 mL, removeu-se 5,0 mL de Tampão de Lavagem LOVO usando o orifício de injeção sem agulha na bolsa de Tampão de Lavagem LOVO. Dispensou-se o Tampão de Lavagem LOVO dentro de um Tubo cônico de 50 mL e rotulou-se como “Diluente de IL-2” e o número de lote. NOTA: Limpou-se o orifício de injeção desnecessário com uma almofada de álcool antes de cada uso.

[001090] 8.11.28 Aliquotou-se Tampão de Lavagem LOVO na Bolsa de em Branco CRF. Usando uma seringa de 100 mL, extraiu-se 70,0 mL de Tampão de Lavagem LOVO do orifício de injeção sem agulha. NOTA: Limpou-se o orifício de injeção desnecessário com uma almofada de álcool antes de cada uso.

[001091] 8.11.29 Aliquotou-se Tampão de Lavagem LOVO para a Bolsa de em Branco de CRF. Colocou-se uma tampa vermelha na seringa e rotulou-se como “crio bolsa de branco” e número de lote. NOTA: Mantida a seringa na temp ambiente até necessário na etapa 8.14,3

[001092] 8.11.30 Completou-se a Prep. de tampão de Lavagem. Fechadas todas as braçadeiras na bolsa de Tampão de Lavagem LOVO.

[001093] 8.11.31 Descongelou-se IL-2. Descongelou-se um 1,1 mL de IL-2 (6×10^6 IU/ mL)), até que todo o gelo tivesse fundido. Registrou-se o Número de lote e Validade de IL-2. NOTA: Garantiu-se que o rótulo IL-2 estivesse fixado.

[001094] 8.11.32 Preparação de IL-2. Adicionou-se 50 µL de estoque de IL-2 (6×10^6 IU/ mL) ao Tubo cônico de 50 mL rotulou-se “Diluyente IL-2.”

[001095] 8.11.33 Preparação de IL-2. Rerrotulou-se o cônico como “IL-2 6×10^4 ”, a data, número de lote e validade de 24 horas. Tampou-se e armazenou-se de 2 a 8°C.

[001096] 8.11.34 Prep. da Criopreservação. Colocou-se 5 crio-cassetes de 2 a 8°C para pré-condicioná-los para a criopreservação de produto final.

[001097] 8.11.35 Preparou-se as Diluições de Contagem de Célula. Na BSC, adicionou-se 4,5 mL de Meios AIM-V que foram rotulados com número de lote e “Para as Diluições de Contagem de Célula” a 4 tubos cônicos de 15 mL separados. Rotulou-se os tubos com o número de lote do registro de batelada e número do tubo (1-4). Deixado de lado para o uso na etapa 8.12.34

[001098] 8.11.36 Preparou-se as Contagens de Célula. Rotulou-se 4 criofrascos com número do frasco (1-4). Manteve-se os frascos sob a BSC para serem usados na etapa 8.12.33.

[001099] 8.11.37 Revisada a Seção 8.11

[001100] 8.12 Dia 22 Colheita de TIL

[001101] 8.12.1 Monitorar a Incubadora. Monitorou-se a incubadora. Parâmetros da incubadora Mostrador LED de Temperatura: $37 \pm 2,0^\circ\text{C}$, Porcentagem de CO₂: $5\% \pm 1,5\%$. NOTA: A seção 8.12 pôde ser conduzida concorrentemente com a Seção 8.11.

[001102] 8.12.2 Removeu-se os Frascos G-Rex500MCS da incubadora. Realizou-se a checagem abaixo para garantir que os parâmetros de incubação fossem atingidos antes da remoção de G-Rex500MCS da incubadora.

Frasco	Prateleira	Limite inferior da etapa 8.10.83 B (DDMMYY HHMM)	Limite superior da etapa 8.10.83 C (DDMMYY HHMM)	Tempo de Remoção da Incubadora (DDMMYY HHMM)	É 8.10.83 B < Tempo de Remoção da Incubadora < Etapa 8.10.83 C Sim/Não*

[001103] NOTA: Esta etapa foi realizada conforme cada frasco foi

removido da incubadora.

[001104] 8.12.3 Preparou-se a bolsa de coleta de TIL Rotulou-se uma bolsa de coleta de 3000 mL como “Suspensão de TIL”, número de lote e data inicial.

[001105] 8.12.4 Selou-se conexões extras. Selou-se termicamente duas conexões leur na bolsa de coleta próxima da extremidade de cada conexão pela Nota de Processo 5.12.

[001106] 8.12.5 Instalou-se GatheRex. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a linha de remoção de meios vermelha do G-Rex500MCS à bolsa Labtainer de 10 L preparada na etapa 8.11.5. NOTA: Nota de Processo Referenciada 5.16 para o uso de dispositivos GatheRex múltiplos.

[001107] 8.12.6 Instalou-se GatheRex. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a linha de remoção de célula clara do G-Rex500MCS à Suspensão da bolsa de coleta de TIL preparada na etapa 8.12.3. NOTA: Nota de Processo Referenciada 5.16 para o uso de dispositivos GatheRex múltiplos.

[001108] 8.12.7 Instalou-se GatheRex. Colocou-se o frasco G-Rex500MCS sobre o lado esquerdo do GatheRex. Colocou-se a bolsa Labtainer de sobrenadante e agrupou-se a suspensão da bolsa de coleta de TIL para o lado direito.

[001109] 8.12.8 Instalou-se GatheRex. Instalou-se a linha de remoção de meios vermelha do G-Rex500MCS na braçadeira de topo (marcado com uma linha vermelha) e guias de tubulação no GatheRex. Instalada a linha de colheita clara do G-Rex500MCS na braçadeira de fundo (marcado com uma linha azul) e guias de tubulação no GatheRex.

[001110] 8.12.9 Instalou-se GatheRex. Fixou-se a linha de gás do GatheRex ao filtro estéril do G-Rex500MCS. NOTA: Antes de remover o sobrenadante do G-Rex500MCS, garantiu-se que todas as braçadeiras nas linhas de remoção de célula foram fechadas.

[001111] 8.12.10 Redução de Volume. Transferiu-se ~4,5L de

sobrenadante do G-Rex500MCS para a bolsa de sobrenadante. Visualmente inspecionou-se G-Rex500MCS para garantir que o frasco estivesse nivelado e os meios foram reduzidos até o final do tubo de do tubo mergulhador de aspiração. Repetir a etapa se necessário. NOTA: Se o GatheRex parou prematuramente, o mesmo pode ser reiniciado pressionando-se o botão com a seta apontando para a direita mais uma vez.

[001112] 8.12.11 Preparou-se o frasco para a Colheita de TIL. Depois da remoção do sobrenadante, fechadas todas as braçadeiras para a linha vermelha.

[001113] 8.12.12 Iniciou-se a coleta de TIL. Registrou-se o tempo de início da Colheita de TIL.

[001114] 8.12.13 Iniciou-se a coleta de TIL. Bater vigorosamente no frasco e turbilhonar os meios para a liberação das células. Realizou-se uma inspeção do frasco para garantir que todas as células descolassem. Colocou-se a bolsa de coleta de 3000 mL de “Suspensão de TIL” sobre lenços secos sobre uma superfície plana. NOTA: Contactou-se a gestão de Área se as células não descolaram.

[001115] 8.12.14 Iniciou-se a coleta de TIL. Inclinou-se o frasco para garantir que a mangueira estivesse na borda do frasco. NOTA: Se a mangueira de coleta de célula não estava na junção da parede e membrana de fundo, raspar o frasco enquanto inclinado em um ângulo de 45° é usualmente suficiente para posicionar apropriadamente a mangueira.

[001116] 8.12.15 Colheita de TIL. Liberou-se todas as braçadeiras levando à suspensão da bolsa de coleta de TIL.

[001117] 8.12.16 Colheita de TIL. Usando o GatheRex, transferiu-se a Suspensão de TIL para dentro da bolsa de coleta de 3000 mL. NOTA: Manteve-se a borda inclinada até que todas as células e meios fossem coletados.

[001118] 8.12.17 Colheita de TIL. Inspecionou-se a membrana quanto

às células aderentes.

[001119] 8.12.18 Enxaguou-se a membrana do frasco. Enxaguou-se o fundo do G-Rex500MCS. Cobriu-se ~1/4 da membrana de troca de gás com meios de enxágue.

[001120] 8.12.19 Braçadeiras fechadas no G- Rex500MCS. Garantir que todas as braçadeiras estejam fechadas.

[001121] 8.12.20 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a bolsa de coleta contendo o TIL tão próximo da solda quanto possível de modo que o comprimento de tubulação global permanecesse aproximadamente o mesmo.

[001122] 8.12.21 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a bolsa de sobrenadante.

[001123] 8.12.22 Completou-se a colheita de frascos G-Rex 500 MCS remanescentes. Repetiu-se as etapas 8.12.2 e 8.12.5 a 8.12.21, agrupando todos os TIL dentro da mesma bolsa de coleta.

[001124] NOTA: FOI NECESSÁRIO SUBSTITUIR A BOLSA DE SOBRENADANTE DE 10L DEPOIS DE CADA 2º FRASCO. NOTA: Nota de Processo Referenciada 5.16 para o uso de dispositivos GatheRex múltiplos.

[001125] 8.12.23 Preparou-se a bolsa de fonte LOVO. Obteve-se uma nova bolsa de coleta de 3000 mL. Rotulou-se como “Bolsa Fonte LOVO”, número de lote e Data Inicial.

[001126] 8.12.24 Preparou-se a bolsa fonte LOVO. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a tubulação na “Bolsa de Fonte LOVO”, removendo os luers fêmeas, deixando linha suficiente para soldar.

[001127] 8.12.25 Bolsa Fonte LOVO Pesada. Colocou-se uma caixa plástica apropriadamente dimensionada sobre a balança e tarou-se. Colocar a Bolsa Fonte LOVO, incluindo orifícios e linhas, na caixa e registrou-se o peso seco

[001128] 8.12.26 Transferiu-se a suspensão de célula para dentro da

bolsa fonte LOVO. Fechou-se todas as braçadeiras de um filtro de sangue por gravidade de 170 µm.

[001129] 8.12.27 Transferiu-se a suspensão de célula para dentro da bolsa fonte LOVO. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) a extremidade terminal longa do filtro de sangue por gravidade à bolsa fonte LOVO.

[001130] 8.12.28 Transferiu-se a suspensão de célula para dentro da bolsa fonte LOVO. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) uma das duas linhas de fonte do filtro à bolsa de coleta de “Suspensão de TIL agrupada”.

[001131] 8.12.29 Transferiu-se a suspensão de célula para dentro da bolsa fonte LOVO. Uma vez que a soldagem foi completa, selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a linha não usada do filtro para removê-la.

[001132] 8.12.30 Transferiu-se a suspensão de célula para dentro da bolsa fonte LOVO. Abriu-se todas as braçadeiras necessárias e elevou-se a Suspensão de TIL pendurando a bolsa de coleta em uma haste de IV para iniciar a transferência de fluxo por gravidade de TIL através do filtro de sangue e dentro da bolsa fonte LOVO. Rotacionou-se ou amassou-se suavemente a bolsa da Suspensão de TIL durante a drenagem de modo a manter o TIL em suspensão uniforme.

[001133] Nota: Não permitir que a bolsa fonte LOVO seja pendurada a partir do aparelho de filtração. Colocou-se a bolsa fonte LOVO sobre lenços secos sobre uma superfície plana.

[001134] 8.12.31 Fechou-se todas as braçadeiras. Uma vez que todos os TIL foram transferidos para a bolsa fonte LOVO, fechou-se todas as braçadeiras.

[001135] 8.12.32 Selou-se termicamente. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) tão próximo da solda quanto possível para remover o

filtro de sangue por gravidade.

[001136] 8.12.33 Removeu-se as Amostras de Contagens de Célula. Na BSC, usando seringas de 3 mL separadas para cada amostra, removeu-se 4 x 1,0 mL de Amostra de Contagem de Células da bolsa fonte LOVO usando orifício de injeção desnecessário. Colocou-se amostras nos criofrascos preparados na etapa 8.11.36. NOTA: Limpou-se o orifício de injeção de agulha com uma almofada de álcool e misturou-se a bolsa fonte LOVO entre cada amostra.

[001137] 8.12.34 Realizou-se as Contagens de Célula. Realizou-se as contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5.14. Diluiu-se a amostra de contagem de células inicialmente adicionando-se 0,5 mL de suspensão de célula em 4,5 mL de meios AIM-V preparados na etapa 8.11.35. Isto deu uma diluição 1:10.

[001138] 8.12.35 Registrou-se os volumes de amostra da Contagem de Célula.

[001139] 8.12.36 Determinou-se o Fator de Multiplicação

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume de amostra da contagem de célula total	8.12.35A + 8.12.35B	C. µL
Fator de Multiplicação	$C \div 8.12.35A$	D.

[001140] 8.12.37 Protocolos selecionados e fatores de multiplicação inseridos. Garantiu-se que o protocolo de “Ensaio de Contagem de Célula Viável” fosse selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [µL]” = 200, “Diluição [µL]” = 0

[001141] 8.12.38 Registrou-se as contagens de célula a partir do Nucleoview

[001142] 8.12.39 Determinou-se a Viabilidade Média, Concentração de Células Viáveis e concentração de Célula Nucleada Total das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.12.38A + 8.12.38B) \div 2$	G.
Concentração de Célula Viável	$(8.12.38C + 8.12.38D) \div 2$	H. células/mL
Concentração Total de Célula Nucleada	$(8.12.38E + 8.12.38F) \div 2$	I. células/mL

[001143] 8.12.40 Limites Superior e Inferior Determinados para contagens

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.12.39H \times 0,9$	J. células/mL
Limite superior	$8.12.39I \times 1,1$	K. células/mL

[001144] 8.12.41 Foram ambas as contagens dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.12.38 C e D \geq 8.12.40J$	
Limite superior	$8.12.38 C e D \leq 8.12.40K$	

[001145] NOTA: Se cada resultado foi “Não” realizou-se segundo conjunto de contagens nas etapas 8.12.42 a 8.12.49.

[001146] 8.12.42 Se Aplicável: Realizou-se as contagens de célula. Realizou-se as contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 e Nota de Processo 5,14. NOTA: A diluição pode ser ajustada consequentemente com base fora da concentração esperada de células.

[001147] 8.12.43 Se Aplicável: Registrou-se os volumes de amostra da Contagem de Célula

[001148] 8.12.44 Se Aplicável: Determinou-se o Fator de Multiplicação

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume Total da amostra de Contagem de Célula	$8.12.43A + 8.12.43B$	C. µL
Fator de Multiplicação	$C \div 8.12.43A$	D.

[001149] 8.12.45 Se Aplicável: Protocolos selecionados e inserir fatores de multiplicação. Garantir que o protocolo de “Ensaio de Contagem de Célula Viável” foi selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos.

[001150] NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [µL]” = 200, “Diluição [µL]” = 0

[001151] 8.12.46 Se Aplicável: Registrado Contagens de célula a partir

de Nucleoview

[001152] 8.12.47 Se Aplicável: Determinar a Viabilidade Média, Concentração de Célula Viável e concentração de Célula Nucleada Total das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.12.46A + 8.12.46B) \div 2$	G.
Concentração de Célula Viável	$(8.12.46C + 8.12.46D) \div 2$	H. células/mL
Concentração de Célula Nucleada Total	$(8.12.46E + 8.12.46F) \div 2$	I. células/mL

[001153] 8.12.48 Se Aplicável: Limites Superior e Inferior Determinados para contagens

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.12.47 H \times 0,9$	J. células/mL
Limite superior	$8.12.47 H \times 1,1$	K. células/mL

[001154] 8.12.49 Se Aplicável: As contagens estavam dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.12.46 C e D \geq 8.12.48J$	
Limite superior	$8.12.46 C e D \leq 8.12.48K$	

[001155] NOTA: Se cada resultado foi “Não” continue para a etapa 8.12.50 para determinar uma média

[001156] 8.12.50 Se Aplicável: Determinou-se uma Concentração de Células Viáveis média e Concentração de Célula Nucleada Total média a partir de todas as quatro contagens realizadas.

[001157] 8.12.51 Revisão QA de Contagens de Célula. O pessoal QA revisou cálculos realizados nas etapas 8.12.38 – 8.12.50.

[001158] 8.12.52 Pesou-se a Bolsa Fonte LOVO. Colocou-se caixa plástica apropriadamente dimensionada sobre a balança e tarou-se. Colocou-se a bolsa fonte LOVO toda na caixa e registrou-se o peso. Calculou-se o volume de suspensão de célula.

[001159] 8.12.53 Calcular Células TIL Viáveis Totais.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Concentração Média de Célula Viável*	8.12.39 H* -ou- 8.12.47 H* -ou- 8.12.50 E*	A. células/mL
Volume Total	8.12.52 C	B. mL
Células viáveis totais	A x B	C. células
É $C \geq 1,5 \times 10^9$?	Sim/Não**	

*Referência de etapa circulada usada para determinar a Concentração de Células Viáveis.

**Se “Sim,” prosseguiu-se. Se “Não,” contatada a Gestão de Área.

[001160] 8.12.54 Calcular Células Totais Nucleadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Concentração Média de Célula etapa Nucleada Total*	8.12.39 I* -ou- 8.12.47 I* -ou- 8.12.50 J*	A. células/mL
Volume Total	8.5.52 C	B. mL
Células Nucleadas Totais	A x B	C. células

*Referência de etapa circulada usada para determinar a Concentração de Célula Nucleada Total.

[001161] 8.12.55 Preparou-se Diluente de Micoplasma. Na BSC, removeu-se 10,0 mL de uma bolsa de sobrenadante por intermédio de orifício de amostragem luer e colocou-se em um cônico de 15 mL. Rotulou-se o cônico de 15 mL “Diluente de Micoplasma “ e mantido na BSC para o uso na etapa 8.14.69.

[001162] 8.12.56 Revisar a Seção 8.12

[001163] 8.13 LOVO

[001164] 8.13.1 Girou-se no LOVO usando o botão na traseira esquerda do instrumento. NOTA: As Etapas 8.13.1-8.13.13 podem ser realizadas concorrentemente com as Seções 8.11-8.12.

[001165] 8.13.2 Checou-se as balanças de pesagem e sensor de pressão.

[001166] 8.13.3 Assegurou-se que não havia nada pendurado em nenhuma das balanças de pesagem e revisada a leitura para cada balança. Registrou-se valores na etapa 8.13.5. Nota: Se qualquer uma das balanças leu fora de uma faixa de 0 +/- 2 g, realizou-se a calibração da balança de pesagem.

[001167] 8.13.4 Se todas as balanças estavam na tolerância sem nenhuma suspensão de peso, prosseguiu-se para pendurar um peso de 1 kg em

cada balança (#1 a 4) e revisou-se a leitura. Registrou-se os valores na etapa 8.13.5.

[001168] 8.13.5 Balança Checada. Registrou-se os valores mostrados para cada balança. Se os valores estavam na faixa, continuar o processamento. Se os valores não foram na faixa, realizar a calibração.

[001169] 8.13.6 Revisou-se a leitura do sensor de pressão na Tela de Perfil de Operação do Instrumento e registrou-se. A faixa aceitável para a leitura da pressão foi 0 +/- 10 mmHg. Se o valor mostrado estiver fora desta faixa, armazenou-se um novo ajuste da pressão atmosférica, pelas instruções da máquina.

[001170] 8.13.7 Repetiu-se as etapas. Se uma nova calibração da balança de pesagem foi realizada ou um novo ajuste de pressão atmosférica foi armazenado, repetiu-se as Etapas 8.13.3 a 8.13.6.

[001171] 8.13.8 Iniciou-se o protocolo de “Colheita G-Rex de TIL” da lista respectiva.

[001172] 8.13.9 A Tela solução 1 foi exibida: Leu-se tipo de tampão PlasmaLyte

[001173] 8.13.10-8.13.16 Seguiu-se as exibições de mensagem da tela de toque LOVO.

[001174] 8.13.17 Determinou-se o volume alvo de produto final.

[001175] NOTA: Usando o valor das células nucleadas totais (TNC) da etapa 8.12.54 C e o mapa esquemático abaixo, determinou-se o volume alvo de produto final. Registrou-se o Volume de Produto Final (mL)

Faixa de Célula	Volume de Produto Final (Retentado) para o Alvo (mL)
$0 < \text{Total de Células (Viáveis + Mortas)} \leq 7,1 \times 10^{10}$	165
$7,1 \times 10^{10} < \text{Total de Células (Viáveis + Mortas)} \leq 1,1 \times 10^{11}$	215
$1,1 \times 10^{11} < \text{Total de Células (Viáveis + Mortas)} \leq 1,5 \times 10^{11}$	265

[001176] Nota: Se TVC da etapa 8.12.53 C foi $>1,5 \times 10^{11}$ contactou-se a

Gestão de Área.

[001177] 8.13.18 – 8.13.22 Seguiu-se as exibições de mensagem da tela de toque LOVO.

[001178] 8.13.23 Carregou-se o kit descartável. Antes da carga do kit descartável, limpar o orifício do sensor de pressão com um pano com álcool seguido por um pano livre de fiapos. Carregou-se o kit descartável. Seguiu-se as diretrizes da tela na carga do kit descartável.

[001179] 8.13.24 Removeu-se a bolsa de filtrado. Quando o kit descartável LOVO padrão foi carregado, tocou-se o botão Seguinte. Foi exibida a tela Informação e Localização de Recipiente. Removeu-se a bolsa de filtrado da balança

[001180] 8.13.25 Garantiu-se que o Recipiente de filtrado fosse Novo e Fora da Balança

[001181] 8.13.26 Inseriu-se a capacidade de filtrado. Soldou-se estéril uma Bolsa Auxiliar LOVO na linha luer macho da Bolsa de filtrado existente. Garantiu-se que todas as braçadeiras estivessem abertas e o caminho de fluido estivesse desimpedido. Tocou-se o campo de entrada da Capacidade do Recipiente de Filtrado. Um teclado numérico é exibido. Inserir o total da nova capacidade de filtrado (5.000 mL). Tocar o botão para aceitar a entrada. NOTA: O Volume de Filtrado Estimado não deve exceder 5000 mL.

[001182] 8.13.27 Colocou-se o Recipiente de Filtrado sobre a bancada. NOTA: Se a tubulação foi removida da braçadeira F durante a soldagem, colocou-se a tubulação de volta dentro da braçadeira. Colocou-se o novo Recipiente de Filtrado sobre a bancada. Não pendurar a Bolsa de filtrado sobre a balança de pesagem #3. A balança de pesagem #3 estará vazia durante o procedimento.

[001183] 8.13.28 Seguiu-se as exibições de mensagem da tela de toque LOVO depois das mudanças no recipiente de filtrado.

[001184] 8.13.29 Garantiu-se que o kit foi carregado apropriadamente.

Exibiu-se a sobreposição Checagens a Seco do Kit Descartável. Checou-se que o kit foi carregado apropriadamente e todas as braçadeiras foram abertas. Checou-se todas as tubulações quanto a dobras ou outras obstruções e corrigido se possível. Garantiu-se que o kit foi apropriadamente instalado e checadas todas as braçadeiras de Robert. Pressionado o botão Sim. Todas as braçadeiras mecânicas do LOVO fecharam automaticamente e exibiu-se a tela Checagem da Instalação do Kit Descartável. O LOVO passou por uma série de etapas de pressurização para checar o kit.

[001185] 8.13.30 Resultado da Checagem do Kit. Se a checagem do Kit passou, prosseguiu-se para a etapa seguinte. *Se Não, uma segunda Checagem do Kit seria realizada depois que as checagens tivessem sido completadas. *Se Não, Checada toda a tubulação quanto a dobras ou outras obstruções e corrigir *Se Não, Garantiu-se que o kit foi apropriadamente instalado e checadas todas as braçadeiras de Robert. Se a 2a checagem do kit falhou: Contata a Gestão de Área e preparar para a instalação de novo kit na Seção 10,0. Repetir a etapa 8.13.23-Etapa 8.13.30 necessárias.

[001186] 8.13.31 Fixou-se PlasmaLyte. Exibiu-se a tela Conectar Soluções. O valor de lavagem sempre seria 3000 mL. Inserido este valor na tela.

[001187] Soldou-se estéril a bolsa de 3000 mL de PlasmaLyte à tubulação passando através da Braçadeira 1 pela Nota de Processo 5.11. Pendurou-se a bolsa de PlasmaLyte em uma haste IV colocando-se ambas as alças de canto da bolsa sobre o gancho.

[001188] 8.13.32 Verificou-se que o PlasmaLyte foi fixado. Abriu-se qualquer braçadeira plástica. Verificou-se que a entrada de Volume de solução foi 3000 mL. Tocou-se o botão “Seguinte”. Exibiu-se a sobreposição Preparar Kit Descartável. Verificou-se que o PlasmaLyte foi fixado e quaisquer soldas e braçadeiras plásticas na tubulação levando à bolsa PlasmaLyte foram abertas, depois tocou-se o botão Sim

[001189] 8.13.33 Observou-se que o PlasmaLyte está se movendo. A preparação do Kit Descartável começa e a tela Preparação do Kit Descartável é exibida. Visualmente observou-se que o PlasmaLyte está se movendo através da tubulação conectada à bolsa de PlasmaLyte. Se nenhum fluido se movimentou, pressionou-se o Botão de Pausa na tela e determinou-se se uma braçadeira ou solda estava ainda fechada. Uma vez que o problema tenha sido resolvido, pressionar o botão Prosseguir na tela para prosseguir com a Preparação do Kit Descartável. Quando a preparação do kit descartável acabou com êxito, a tela Conectar Fonte foi exibida.

[001190] 8.13.34-8.13.35 Seguiu-se as exibições de mensagem da tela de toque LOVO.

[001191] 8.13.36 Fixou-se o recipiente Fonte à tubulação. Soldou-se estéril a Bolsa de Fonte LOVO preparada na etapa 8.12.31 à tubulação passando através da Braçadeira S pela Nota de Processo 5.11. Seria necessário remover a tubulação da braçadeira. Nota: Garantir substituir a tubulação fonte dentro da braçadeira S se removida.

[001192] 8.13.37 Pendurou-se o recipiente Fonte. Pendurou-se o recipiente Fonte na haste IV colocando ambas as alças de canto da bolsa no gancho. Não pendurar a Fonte sobre a balança de pesagem #1. Abertas todas as braçadeiras para a bolsa fonte.

[001193] 8.13.38 Verificou-se que o recipiente Fonte foi fixado. Tocou-se o botão Seguinte. Exibiu-se a sobreposição Preparar Fonte. Verificou-se que a Fonte foi fixada ao kit descartável e que quaisquer soldas e braçadeiras plásticas na tubulação levando à Fonte foram abertas. Tocou-se o botão Sim.

[001194] 8.13.39 Confirmou-se que o PlasmaLyte estava se movendo. A preparação da Fonte iniciou-se e exibida a tela Preparação de Fonte. Visualmente observado que PlasmaLyte está se movendo através da tubulação fixada à Fonte bolsa. Se nenhum fluido estiver se movendo, pressionar o Botão Pausa na tela e determinar se uma braçadeira ou solda ainda está

fechada. Uma vez que o problema tenha sido resolvido, pressionar o botão Prosseguir na tela para prosseguir a Preparação da Fonte.

[001195] 8.13.40 Iniciou-se a Tela de Procedimento. Quando a preparação da Fonte acabou com êxito, exibiu-se a tela Iniciar Procedimento. Pressionado Partida, a tela de pausa “Ciclo de Pré-Lavagem 1” aparece imediatamente depois de pressionar a partida.

[001196] 8.13.41 Inverteu-se a Bolsa Em Processo. Removeu-se a Bolsa Em Processo da balança de pesagem #2 (também pode remover a tubulação da guia de tubulação do orifício de topo Em Processo) e inverter a mesma manualmente para permitir que o tampão de lavagem adicionado durante a etapa de preparação do kit descartável para revestir todas as superfícies interiores da bolsa. Rependurar a Bolsa Em Processo sobre a balança de pesagem #2 (o rótulo na bolsa foi voltado para a esquerda). Recolocar a tubulação no orifício de topo na guia de tubulação, se a mesma foi removida.

[001197] 8.13.42 Inverteu-se a Bolsa Fonte. Antes de pressionar o botão Partida, misturou-se a Bolsa Fonte sem removê-la da haste de IV massageando-se os cantos da bolsa e suavemente agitando as células para criar uma suspensão de célula homogênea. Pressionou-se o botão Prosseguir. O LOVO iniciou o fluido de processamento da Bolsa Fonte e exibiu-se a tela Ciclo de Lavagem 1.

[001198] 8.13.43 Pausa de Enxágue da Fonte. Exibiu-se a tela Pausa de Enxágue da Fonte uma vez que o recipiente de fonte foi drenado e o LOVO adicionou tampão de lavagem à Bolsa Fonte. Sem remover a Bolsa Fonte da haste de IV, massageou-se os cantos e misturou-se bem. Pressionado Prosseguir.

[001199] 8.13.44 Pausa na Mistura da Bolsa Em Processo. Para preparar células para uma outra passagem através da fiandeira, a Bolsa Em Processo foi diluída com tampão de lavagem. Depois de adicionar o tampão de lavagem para a Bolsa Em Processo, o LOVO pausa automaticamente e mostra

a Tela de Pausa “Mistura da Bolsa Em Processo”. Sem remover a bolsa da balança de pesagem, misturou-se o produto bem pelo aperto suave da bolsa. Pressionar Prosseguir.

[001200] 8.13.45 Pausa na Massagem dos Cantos Em Processo. Quando a Bolsa Em Processo foi esvaziada, tampão de lavagem foi adicionado pelo orifício de fundo da Bolsa Em Processo para enxaguar a bolsa. Depois de adicionar o fluido de enxágue, o LOVO pausou-se automaticamente e mostrou a Tela de Pausa da “Massagem dos cantos IP”. Quando exibida a Tela de Pausa na “Massagem dos cantos IP”, Não remover a bolsa da balança de pesagem #2. Com a Bolsa Em Processo ainda pendurada na balança de pesagem #2, a massagem dos cantos da bolsa para levar qualquer célula residual em suspensão. Garantiu-se que a bolsa não estava balançando sobre a balança de pesagem e pressionado o botão Prosseguir.

[001201] 8.13.46 Esperar a tela Remover Produtos. No final do procedimento LOVO, foi exibida a Tela Remover Produtos. Quando esta Tela foi exibida, todas as bolsas no kit LOVO puderam ser manipuladas. Nota: não tocar nenhuma bolsa até exibido Remover Produtos.

[001202] 8.13.47 Removeu-se a bolsa de retentado. Colocou-se uma pinça hemostática na tubulação muito próximo ao orifício na Bolsa de retentado para impedir a suspensão de célula de sedimentar dentro da tubulação. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) abaixo do hemostato, garantindo manter linha suficiente para soldar na etapa 8.13.48. Removeu-se a bolsa de retentado.

[001203] 8.13.48 Preparou-se a bolsa de retentado para formulação. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) a extremidade de luer-lock fêmea de um conjunto de transferência de plasma de 4” para a bolsa de retentado. Transferiu-se a bolsa de retentado para o BSC para o uso na etapa 8.14.11.

[001204] 8.13.49 Removeu-se Produtos. Seguiu-se as instruções na Tela Remover Produtos. Fechadas todas as braçadeiras no kit LOVO para impedir

movimento de fluido.

[001205] 8.13.50 Removeu-se Produtos. Tocou-se o botão Seguinte. Todas as braçadeiras mecânicas LOVO abertas e a Tela Remover Kit mostrada.

[001206] 8.13.51 Registrou-se Dados. Seguiu-se as instruções na Tela Remover Kit. Toucou-se o botão “Seguinte”. Todas as braçadeiras mecânicas LOVO fechadas e a Tela Sumário dos Resultados exibida. Registrou-se os dados da tela sumário dos resultados na tabela exatamente como eles são mostrados. Fechou-se todas as bombas e suporte para o filtro. Removeu-se o kit quando solicitado fazê-lo pelo LOVO. *NOTA: Todos os Tempos registrados foram registrados diretamente da Tela do LOVO Sumário dos Resultados no formato HH:MM:SS e formato (HH:MM:SS) quando aplicável.

[001207] 8.13.52-8.13.54 Seleção de Protocolo através da paralização do LOVO. Segue a paralização da tela LOVO.

[001208] 8.13.55 Revisar a Seção 8.13

[001209] 8.14 Formulação Final e Enchimento

[001210] 8.14.1 Cálculo do volume/bolsa alvo. A partir da tabela abaixo, selecionou-se o número de bolsas CS750 a serem cheias, volume de enchimento alvo por bolsa, removeu-se volume para reter por bolsa e volume alvo final por bolsa que correspondeu ao volume de Retentado de LOVO da etapa 8.13.22.

Volume de produto LOVO	Volume de CS10 para adicionar ao produto	Volume Final Previsto de produto formulado	Número de bolsas a serem cheias	Volume de enchimento alvo por bolsa	Volume removido para retenção por bolsa	Volume alvo final por bolsa
165 mL	165 mL	330 mL	3	107 mL	7 mL	100 mL
215 mL	215 mL	430 mL	4	105 mL	5 mL	100 mL
265 mL	265 mL	530 mL	4	130 mL	5 mL	125 mL

[001211] 8.14.2 Preparou-se Branco de CRF. calculou-se o volume de CS-10 e Tampão de Lavagem LOVO para formular a bolsa de branco.

Volume Final Alvo por Bolsa 8.14.1E A	Volume de Tampão de Lavagem de LOVO em Branco B = A / 2	Volume de CS-10 em Branco (mL) C = B
mL	mL	mL

[001212] 8.14.3 Preparou-se Branco de CRF. Fora da BSC, usando a seringa de Tampão de Lavagem LOVO preparada na etapa 8.11.29, adicionou-se volume calculado na etapa 8.14.2 B a uma bolsa CS750 vazia por intermédio de conexão luer. Nota: A formulação da bolsa CS750 em Branco não precisa ser feita assepticamente.

[001213] 8.14.4 Preparou-se Branco de CRF Usando uma seringa apropriadamente dimensionada, adicionou-se o volume de CS-10 calculado na etapa 8.14.2 para a mesma bolsa CS750 preparada na etapa 8.14.3. Colocou-se uma tampa vermelha na bolsa CS750.

[001214] 8.14.5 Preparou-se Branco de CRF. Removeu-se tanto ar da bolsa CS-750 quanto possível. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) a bolsa CS750 tão próximo da bolsa quanto possível, removendo a tubulação.

[001215] 8.14.6 Preparou-se Branco de CRF. Rotulou-se a bolsa CS750 com “Branco de CRF”, número de lote e data inicial. Colocou-se o Branco de CRF em embalagens frias até que o mesmo fosse colocado no CRF.

[001216] 8.14.7 Calculou-se o volume requerido de IL-2. Calculou-se o volume de IL-2 a adicionar ao Produto Final

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume de Retentado Final	Etap 8.13.51	A. mL
Volume de Formulado Final	B = A x 2	B. mL
Concentração de IL-2 Final desejada (IU/ mL)	300 IU/ mL	C. 300 IU/ mL
IU de IL-2 Requerida	D = B x C	D. IU
Do Estoque de Trabalho de IL-2 da Etap 8.11.33	6 x 10 ⁴ IU/ mL	E. 6 x 10 ⁴ IU/ mL
Volume de IL-2 a Adicionar ao Produto Final	F = D ÷ E	F. mL

[001217] 8.14.8 Aparelho Conectado Montado. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) um 4S-4M60 a um Conector de Célula CC2 substituindo uma ponta única do aparelho Conector de Célula (B) com a

extremidade de 4 pontas do tubo de distribuição 4S-4M60 em (G).

[001218] 8.14.9 Aparelho Conector montado. Soldou-se estéril (pela Nota de Processo 5.11) as Criobolsas CS750 para o equipamento preparado na etapa 8.14.8, substituir uma das quatro extremidades luer macho (E) com cada bolsa. Etapa de Referência 8.14.1 para determinar o número de bolsas necessárias.

[001219] 8.14.10 Aparelho Conector montado. Soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) bolsas CS-10 nos pontos do 4S-4M60. Manter CS-10 frio pela colocação das bolsas entre duas embalagens frias condicionadas de 2 a 8°C.

[001220] 8.14.11 Passado materiais para dentro da BSC.

Item	Item # ou Etapa Referência	Quantidade
Conjunto de transferência de plasma de 4"		1
Alíquota de IL-2 ($6,0 \times 10^4$)	8.11.33	1
Seringa de tamanho apropriado para adicionar IL2	8.14.7F	1
Bolsa de retentado LOVO	8.13.48	1
Tampas vermelhas		5

[001221] 8.14.12 Preparou-se TIL com IL-2. Usando uma seringa apropriadamente dimensionada, removeu-se a quantidade de IL-2 determinada na etapa 8.14.7 a partir da alíquota de "IL-2 6×10^4 ".

[001222] 8.14.13 Preparou-se TIL com IL-2. Conectar a seringa à bolsa de retentado preparada na etapa 8.13.48 por intermédio da Conexão luer e injetar IL-2.

[001223] 8.14.14 Preparar TIL com IL-2 Limpar a linha empurrando-se ar a partir da seringa através da linha.

[001224] 8.14.15 Rotulou-se a Bolsa de TIL formulada. Fechada a braçadeira no conjunto de transferência e rotulada a bolsa como "TIL formulado" e passada a bolsa para fora da BSC.

[001225] 8.14.16 Se aplicável: Amostra por Plano de Amostra. Se houve alíquota de "IL-2 6×10^4 " remanescente preparada na etapa 8.11.33, remover uma amostra de ~5 mL reter de acordo com o Plano de Amostra usando uma seringa apropriadamente dimensionada e dispensar dentro de um tubo cônico

de 50 mL.

[001226] 8.14.17 Se aplicável: Amostrado por Plano de Amostra. Rotulou-se com rótulo de inventário de plano de amostra e armazenado de 2 a 8°C até submetido ao Login para testar por Plano de Amostra.

[001227] 8.14.18 Se aplicável: Amostrado por Plano de Amostra. Garantiu-se que a folha de plano de amostra LIMS fosse preenchida para remoção da amostra.

[001228] 8.14.19 Adicionou-se a bolsa de TIL formulada ao aparelho. Uma vez que a IL-2 foi adicionada, soldou-se (pela Nota de Processo 5.11) a bolsa de “TIL formulada” ao ponto remanescente (a) no aparelho preparado na etapa 8.14.10.

[001229] 8.14.20 Adicionou-se CS10. Passado o aparelho montado com TIL formulado fixo, bolsas CS-750 e CS-10 para dentro da BSC. NOTA: A bolsa CS-10 e todas as bolsas CS-750 foram colocadas entre duas embalagens frias pré-condicionadas de 2 a 8°C. Não colocar a bolsa de TIL formulada sobre as embalagens frias.

[001230] 8.14.21 Adicionou-se CS10. Garantiu-se que todas as braçadeiras foram fechadas no aparelho. Girar a válvula reguladora de modo que a seringa fosse fechada.

[001231] 8.14.22 Seringas Trocadas. Puxou-se ~10 mL de ar dentro de uma Seringa de 100 mL e recolocou-se a seringa de 60 mL no aparelho.

[001232] 8.14.23 Adicionou-se CS10. Girou-se válvula reguladora de modo que a linha para as bolsas CS750 fosse fechada. Abrir braçadeiras para as bolsas de CS-10 e puxar o volume calculado na etapa 8.14.1B para dentro da seringa. NOTA: Seringas múltiplas serão usadas para adicionar volume apropriado de CS-10. NOTA: Registrado volume de cada seringa na etapa 8.14.26

[001233] 8.14.24 Adicionou-se CS10. Fechou-se as braçadeiras para CS-10 e abriu-se as braçadeiras para a bolsa de TIL formulada e adicionou-se

o CS-10. Nota: Adicionar os primeiros 10,0 mL de CS10 a aproximadamente 10,0 mL/minuto. Adicionou-se CS-10 remanescente na taxa aproximada de 1,0 mL/s. Nota: seringas múltiplas foram usadas para adicionar volume apropriado de CS-10. Não reutilizar uma seringa uma vez que a mesma foi dispensada.

[001234] 8.14.25 Adicionou-se CS10. Registrou-se o tempo. NOTA: O tempo alvo da primeira adição de CS-10 para o começo de congelamento é 30

[001235] 8.14.26 Adicionou-se CS10. Registrou-se o volume de cada adição de CS10 e adicionou-se o volume total. Igualar o volume do Volume Total calculado da etapa 8.14.1B

[001236] 8.14.27 Adicionou-se CS10. Fechadas todas as braçadeiras para as bolsas CS10.

[001237] 8.14.28 Preparou-se bolsas CS-750. Girou-se a válvula reguladora de modo que a seringa fosse aberta. Braçadeiras abertas para a bolsa de TIL formulado e extraiu-se a suspensão parando exatamente antes a suspensão atingisse a válvula reguladora.

[001238] 8.14.29 Preparou-se bolsas CS-750. Fechou-se as braçadeiras para a bolsa de TIL formulado. Girou-se a válvula reguladora de modo que a mesma foi aberta para as bolsas de produto final CS750 vazias.

[001239] 8.14.30 Preparou-se bolsas CS-750. Usando uma nova seringa, removeu-se tanto ar quanto possível das bolsas de produto final CS750 puxando-se o ar para fora. Enquanto se mantém a pressão no pistão da seringa, fechou-se as bolsas.

[001240] 8.14.31 Preparou-se bolsas CS-750. Puxou-se ~20 mL de ar para dentro de uma Seringa de 100 mL nova e conectou-se ao aparelho.

[001241] NOTA: Cada Bolsa de produto final CS-750 deve estar entre duas embalagens frias para manter a suspensão de TIL formulada fria.

[001242] 8.14.32 Dispensou-se as células. Girou-se a válvula reguladora de modo que a linha para as bolsas de produto final fosse fechada. Puxaram-

se o volume calculado na etapa 8.14.1 a partir da bolsa de TIL formulado dentro da seringa. NOTA: seringas múltiplas podem ser usadas para se obter o volume correto.

[001243] 8.14.33 Dispensou-se as células. Girou-se a válvula reguladora de modo que a linha para a bolsa de TIL formulado fosse fechada. Trabalhar com uma bolsa de produto final de cada vez, dispensar as células dentro de uma bolsa de produto final. Registrou-se o volume de células adicionou-se a cada bolsa CS750 na etapa 8.14.35

[001244] 8.14.34 Dispensou-se as células. Depurada a linha com ar a partir da seringa de modo que as células estivessem niveladas com o topo do orifício de perfuração. Fechada a braçadeira na bolsa cheia. Repetida a Etapa 8.14.29- Etapa 8.14.34 para cada bolsa de produto final, misturando suavemente a bolsa de TIL formulada entre cada uma.

[001245] 8.14.35 Dispensou-se as células. Registrou-se o volume de TIL colocado em cada bolsa de produto final abaixo.

[001246] 8.14.36 Removeu-se ar das bolsas de produto final e retido. Uma vez que a última bolsa de produto final foi cheia, fechou-se todas as braçadeiras.

[001247] 8.14.37 Removeu-se ar das bolsas de produto final e retido. Puxou-se 10 mL de ar de dentro de uma Seringa de 100 mL nova e substituiu-se a seringa no aparelho.

[001248] 8.14.38 Removeu-se ar das bolsas de produto final e retido. Manipulando uma única bolsa por vez, puxou-se todo o ar de cada bolsa de produto mais o volume de produto para reter determinado na etapa 8.14.1 D. NOTA: Na remoção do volume de amostra, inverteu-se a seringa e usou-se ar para limpar a linha até o topo do orifício da bolsa de produto. Fechou-se a linha para a bolsa uma vez que o volume retido e o ar foram removidos.

[001249] 8.14.39 Registrou-se o Volume Removido. Registrou-se o volume de retido removido de cada bolsa.

[001250] 8.14.40 Dispensou-se o Retido. Dispensou-se o retido dentro de um Tubo cônico de 50 mL e rotulou-se o tube como “Retido” e número de lote. Repetir a etapa 8.14.37- Etapa 8.14.39 para cada bolsa.

[001251] 8.14.41 Preparou-se o produto final para criopreservação. Com uma pinça hemostática, fechou-se as linhas próximas às bolsas. Removeu-se a seringa e a conexão luer de tampa vermelha no aparelho que a seringa estava. Passou-se o aparelho para fora da BSC.

[001252] 8.14.42 Preparou-se o produto final para criopreservação. Selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) em F, removendo-se a bolsa de retentado vazia e as bolsas CS-10.

[001253] NOTA: Reteve-se a conexão luer para seringa no aparelho. Dispôs-se do retentado e bolsas de CS-10 vazias.

[001254] 8.14.43 Realizou-se a inspeção visual. NOTA: A Etapa 8.14.43 – Etapa 8.14.46 pode ser realizada concorrentemente com a Etapa 8.14.47- Etapa 8.14.68.

[001255] 8.14.44 Rotulou-se a Amostra como Produto Final. Rotulou-se as bolsas de produto final. Fixou-se os rótulos de amostra de produto final abaixo.

[001256] 8.14.45 Preparou-se o produto final para criopreservação. Mantidas as criobolsas na embalagem fria ou de 2 a 8°C até a criopreservação.

[001257] 8.14.46 Preparou-se rótulos externos. Garantiu-se que o QA providenciou os rótulos externos que serão fixados aos rótulos de cassetes igualados com os rótulos de produto final correspondente. Fixou-se os rótulos externos providenciados pelo QA aos cassetes. Fixou-se um rótulo de amostra externa abaixo:

[001258] 8.14.47 Removeu-se a Amostra de Contagem de Célula. Usando uma pipeta apropriadamente dimensionada, removeu-se 2,0 mL de retido removido na etapa 8.14.38 e colocou-se em um tubo cônico de 15 mL

para ser usado para as contagens de célula.

[001259] 8.14.48 Realizou-se as Contagens de Célula. Realizou-se as contagens de célula e cálculos utilizando o NC-200 por SOP-00314 e Nota de Processo 5.14. NOTA: Diluiu-se apenas uma amostra na diluição apropriada para verificar se a diluição é suficiente. Diluiu-se amostras adicionais ao fator de diluição apropriado e prosseguiu-se com as contagens.

[001260] 8.14.49 Registrou-se os volumes de amostra da Contagem de Célula. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0

[001261] 8.14.50 Determinou-se o Fator de Multiplicação

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume de Amostra da Contagem de Célula Total	8.14.49A + 8.14.49B	C. μL
Fator de Multiplicação	$C \div 8.14.49A$	D.

[001262] 8.14.51 Selecionar protocolos e inserir fatores de multiplicação. Garantir que o protocolo de “Ensaio de Contagem de Célula Viável” tenha sido selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos para SOP – 00314

[001263] NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0

[001264] 8.14.52 Registrou-se o Nome de Arquivo, Viabilidade e Contagens de célula a partir de Nucleoview.

[001265] 8.14.53 Determinou-se a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.14.52A + 8.14.52B) \div 2$	E. %
Concentração de Células Viáveis	$(8.14.52C + 8.14.52D) \div 2$	F. células/mL

[001266] 8.14.54 Limites Superior e Inferior Determinados para contagens.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.14.53F \times 0,9$	G. células/mL
Limite superior	$8.14.53F \times 1,1$	H. células/mL

[001267] 8.14.55 Ambas as contagens estavam dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.14.52\ C\ e\ D \geq 8.14.54G$	
Limite superior	$8.14.52\ C\ e\ D \leq 8.14.54H$	

[001268] NOTA: Se cada resultado for “Não” realizar o segundo conjunto de contagens nas etapas 8.14.56 – 8.14.63

[001269] 8.14.56 Se Aplicável: Realizou-se as contagens de célula. Realizou-se as contagens de célula e cálculos utilizando NC-200 para SOP-00314 e Nota de Processo 5.14. NOTA: A diluição pode ser ajustada consequentemente com base fora da concentração esperada de células.

[001270] 8.14.57 Se Aplicável: Registrou-se os volumes de amostra da Contagem de Célula.

[001271] 8.14.58 Se Aplicável: Determinou-se o Fator de Multiplicação

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Volume Total de Amostra da Contagem de Célula	$8.14.57A + 8.14.57B$	C. mL
Fator de Multiplicação	$C \div 8.14.57A$	D.

[001272] 8.14.59 Se Aplicável: Selecionou-se Protocolos e inseriu-se fatores de multiplicação. Garantiu-se que o protocolo de “Ensaio de Contagem de Célula Viável” fosse selecionado, todos os fatores de multiplicação e volumes de amostra e diluente foram inseridos. NOTA: Se nenhuma diluição for necessária, inserir “Amostra [μL]” = 200, “Diluição [μL]” = 0

[001273] 8.14.60 Se Aplicável: Registrou-se as Contagens de Célula a partir de Nucleoview

[001274] 8.14.61 Se Aplicável: Determinou-se a Média da Concentração de Célula Viável e Viabilidade das contagens de célula realizadas.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Viabilidade	$(8.14.60A + 8.14.60B) \div 2$	E. %
Concentração de Células Viáveis	$(8.14.60C + 8.14.60D) \div 2$	F. células/mL

[001275] 8.14.62 Se Aplicável: Limites Superior e Inferior

Determinados para contagens.

Parâmetro	Fórmula	Resultado
Limite inferior	$8.14.61F \times 0,9$	G. células/mL
Limite superior	$8.14.61F \times 1,1$	H. células/mL

[001276] 8.14.63 Se Aplicável: As contagens estavam dentro de limites aceitáveis?

Parâmetro	Fórmula	Resultado (Sim/Não)
Limite inferior	$8.14.60 C e D \geq 8.14.62G$	
Limite superior	$8.14.60 C e D \leq 8.14.62H$	

[001277] NOTA: Se cada resultado for “Não” continuar para a etapa 8.14.64 para determinar uma média.

[001278] 8.14.64 Se Aplicável: Determinou-se uma média da Concentração de Células Viáveis a partir de todas as quatro contagens realizadas.

[001279] 8.14.65 Calculou-se Fluxo. Amostra de Citometria. Realizou-se cálculo para garantir concentração de célula suficiente para a amostragem de citometria de fluxo.

Viáveis Célula Concentração da Etapa 8.14.53 F* Ou Etapa 8.14.61 F* Ou Etapa 8.14.64 E* A	Volume Alvo Requerido para 6×10^7 TVC $B = 6 \times 10^7$ células/A	É $B \leq 1,0$ mL? (Sim/Não**)
células/ mL	mL	

*Referência da etapa de círculo usada para determinar a Concentração de Células Viáveis **NOTA: Se “Não”, contatar a gestão de Área.

[001280] 8.14.66 Calculou-se IFN- γ . Cálculo realizado na Amostra para garantir concentração suficiente de célula para a amostragem de IFN- γ .

Concentração de Células Viáveis da Etapa 8.14.53 F* Ou Etapa 8.14.61 F* Ou Etapa 8.14.64 E* A	Volume Requerido para Mínimo $1,5 \times 10^7$ TVC $B = 1,5 \times 10^7$ células / A	É $B \leq 1,0$ mL? (Sim/Não**)
células/ mL	mL	

*Referência da etapa de círculo usada para determinar a Concentração de Células Viáveis **NOTA: Se “Não”, contatar a Gestão de Área.

[001281] 8.14.67 Resultados relatados. Completou-se os formulários para submissão com amostras.

[001282] 8.14.68 Selou-se termicamente. Uma vez que os volumes de amostra foram determinados, selou-se termicamente (pela Nota de Processo 5.12) as Bolsas de Produto Final tão próximo das bolsas quanto possível para remover do aparelho.

[001283] 8.14.69 Rotulou-se e Colheu-se Amostras por Plano de Amostra.

Amostra	Número de Recipientes	Volume de Amostra para Adicionar a cada um	Tipo de Recipiente	Destinação
*Micoplasma	1	1,0 mL	Cônico de 15 mL	Login
Endotoxina	2	1,0 mL	Criofrasco de 2 mL	Login
Tingimento Gram	1	1,0 mL	Criofrasco de 2 mL	Login
IFN-g	1	1,0 mL	Criofrasco de 2 mL	Login
Citometria de Fluxo	1	1,0 mL	Criofrasco de 2 mL	Login
** Esterilidade Bac-T	2	1,0 mL	Garrafa Bac-T	Login
Reter QC	4	1,0 mL	Criofrasco de 2 mL	CRF
Frascos Satellite	10	0,5 mL	Criofrasco de 2 mL	CRF

*NOTA: Para a amostra de Micoplasma, adicionar volume de suspensão de célula formulada ao cônico de 15 mL rotulado “Diluyente de Micoplasma “ da etapa 8.12.55.

**NOTA: Prosseguir para a etapa 8.14.70 para inoculação de Bac-T.

[001284] 8.14.70 Esterilidade & BacT. Amostragem de Teste. Na BSC, remover uma amostra de 1,0 mL da suspensão de célula colhida retida na etapa 8.14.38 usando uma seringa apropriadamente dimensionada e inocular a garrafa anaeróbica. Repetir o acima para a garrafa aeróbica. NOTA: A armazenagem das garrafas Bac-T foi na temperatura ambiente e protegidas da luz.

[001285] 8.14.71 Amostra rotulada e armazenada. Rotulou-se todas as amostras com rótulo de inventário de plano de amostras e armazenou-se apropriadamente até transferência para Login. NOTA: Prosseguido para Seção 8.15 para criopreservação de produto final e amostras.

[001286] 8.14.72 Assinado para Amostragem. Garantiu-se que a folha de plano de amostra LIMS fosse completada para remoção das amostras.

[001287] 8.14.73 Submissão de amostra. Submeteu-se todas as amostras de teste do Dia 22 ao Login.

[001288] 8.14.74 Monitoramento Ambiental. Depois de processar, verificada BSC e monitoramento de pessoal foram realizados.

[001289] 8.14.75 Revisar a Seção 8.14

[001290] 8.15 Criopreservação de Produto Final

[001291] 8.15.1 Preparou-se o Congelador de Taxa Controlada. Verificou-se que o CRF foi preparado antes do congelamento. Registrado o Equipamento de CRF. A criopreservação é realizada.

[001292] 8.15.2 Preparar as sondas de CRF. Perfurou-se o septo na bolsa de CRF branco. Inseriu-se a sonda de temperatura do frasco de 6 mL.

[001293] 8.15.3 Colocou-se o produto final e amostras no CRF. Colocou-se a bolsa de branco dentro do cassete pré-condicionado e transferiu-se para dentro do centro aproximado da prateleira do CRF. Transferiu-se os cassetes de produto final dentro da prateleira do CRF e os frascos dentro da prateleira de frascos do CRF.

[001294] 8.15.4 Colocou-se produto final e amostras no CRF. Transferiu-se as prateleiras de produto e prateleira de frascos dentro da CRF. Registrou-se o tempo que o produto é transferido dentro da CRF e a temperatura da câmara na etapa 8.15.5. NOTA: Distribuiu-se uniformemente os cassetes e prateleira de frascos no CRF, deixou-se tanto espaço quanto possível entre cada prateleira.

[001295] 8.15.5 Determinou-se o tempo necessário para atingir $4^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e prosseguiu-se com a rodada de CRF. Uma vez que a temperatura da câmara atingiu $4^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, iniciou-se a rodada. Registrou-se o tempo.

Parâmetro	Fórmula	Valor
Tempo que Produto Final é transferido para o CRF	(HHMM)	
Temperatura que Produto Final é transferido para dentro do CRF	do monitor	$^{\circ}\text{C}$
B. Tempo de Início do CRF	(HHMM)	

Tempo decorrido a partir da Formulação até o início do CRF	C = B – Etapa 8.14.25A	min

[001296] 8.15.6 CRF Completado e Armazenado. Interrompeu-se o CRF depois da conclusão da rodada. Remover cassetes e frascos da CRF. Transferiu-se cassetes e frascos para o LN2 fase vapor para armazenagem. Registrou-se o local da armazenagem

SUMÁRIO DO PÓS-PROCESSAMENTO

Pós-Processamento: Produto de Fármaco Final

[001297] (Dia 22) Determinação de Células CD3+ no REP do Dia 22 pela Citometria de fluxo

(Dia 22) Método de Tingimento Gram (GMP)

(Dia 22) Teste de Endotoxina Bacteriana pelo Ensaio de LAL de Coágulo em Gel (GMP)

(Dia 16) Ensaio de Esterilidade BacT (GMP)

(Dia 16) Detecção de DNA de Micoplasma pela TD-PCR (GMP)

Atributos de Aparência Aceitáveis (Etapa 8.14.43)

(Dia 22) Ensaio de Esterilidade BacT (GMP)

(Dia 22) Ensaio de IFN-gama

EXEMPLO 2. Edição Gênica de uma Terapia de TIL Criopreservada Usando TALE Nucleases

[001298] Este exemplo descreve o uso de uma etapa de edição gênica em conjunção com um processo de fabricação de TIL, tal como o processo mostrado na Figura 20.

[001299] A otimização da eletroporação de TIL humano é realizada como segue. Quatro a 6 linhagens de TIL pré-REP derivadas de melanoma serão identificadas que expressam >25% PD1. As linhagens de TIL selecionadas serão descongeladas, repousadas e ativadas, trabalhando 1 linhagem por vez. Cinco milhões de TILs ativados serão eletroporados com cada um dos seguintes RNA de controle ou teste: nenhum controle de

Eletroporação (NE); nenhum controle de RNA; controle de transfecção de mRNA de proteína fluorescente verde (GFP), controle CD52 TALEN KO, PD1 TALEN, LAG-3 TALEN e TIM-3 TALEN. As células viáveis serão contadas e uma alíquota posta de lado para as medições de eficiência de transfecção (expressão de GFP). As células eletroporadas serão expandidas pelo REP. Os TILs Pós-REP serão avaliados quanto à viabilidade de célula e expansão multiplicativa (Contador de Célula) e *knockdown* de gene alvo (fluxo e qPCR). Os resultados alvos são >80% de viabilidade ou dentro de 10 % de NE; >70% de transfecção; expansão multiplicativa de TILs até dentro de 30% de NE; e >50% de nocaute.

[001300] A implementação de nocaute de PD-1 mediada por TALEN para o processo de fabricação de TIL é realizada como segue. Até 6 tumores frescos de diversas histologias que podem incluir melanoma, sarcoma e câncer mamário e pulmonar serão usados. Preps na escala de pesquisa serão realizadas de acordo com os processos mostrados nas Figuras 20 e 21. As condições de eletroporação de experimentos anteriores serão aplicadas nos pontos de tempo pré-determinados de cada um dos processos. Os TILs pós-REP serão avaliados quanto à: viabilidade de célula e expansão multiplicativa (Contador de Células); Fenótipos de célula (citometria de fluxo); repertório TCR V β (fluxo); funções efectoras de célula T (produção de IFN- γ na re-estimulação); e *knockdown* de gene alvo (fluxo e qPCR). Os resultados alvos são: >80% de viabilidade ou dentro de 10 % de NE; >70% de transfecção; expansão multiplicativa dentro de 30% de NE; linhagens/subconjuntos de célula T mantidos comparados aos TILs produzidos pelo Processo 2A; potência de TIL adequada; e >50% de nocaute de PD-1. A seguir deste trabalho, uma preparação de nível completo de TILs *knockdown* em PD-1 será realizada e completamente distinguida.

[001301] A validação do silenciamento de dois genes alvos adicionais além do PD-1 também será testada.

EXEMPLO 3. Inativação Mediada por TALEN de PD-1 em TILs

[001302] Este exemplo descreve a inativação mediada por TALEN de PD-1 em conjunção com um processo de fabricação de TIL aqui descrito, tal como um processo mostrado na Figura 20 ou Figura 21. O processo de fabricação de TIL pode incluir a adição precoce de OKT-3 e/ou um agonista de 4-1BB ao meio de cultura de célula por exemplo, como ilustrado na Modalidade 2 da Figura 21. O agonista de OKT-3 e/ou 4-1BB pode opcionalmente ser adicionado começando no Dia 0 ou Dia 1 da primeira expansão ou da segunda expansão.

[001303] A construção e eletroporação de TALEN podem ser realizadas de acordo com métodos descritos by Menger, *et al.*, *Cancer Res.*, 15 de abril de 2016; 76(8): 2087-93, Gautron, *et al.*, *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* 2017, 9: 312-321 ou Patente U.S. No. 9.458.439, as divulgações de cada uma das quais são aqui incorporadas por referência. Alvejando TALEN o gene de PD-1 será produzido, por exemplo, usando um método de montagem de fase sólida descrito por Daboussi *et al.*, *Nat Commun* 2014; 5:3831, que é aqui incorporada por referência ou pode ser obtido comercialmente da Trilink Biotechnologies ou outros provedores como descritos em Gautron, *et al.*, *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* 2017, 9: 312-321. O procedimento descrito em Gautron, *et al.*, *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* 2017, 9: 312-321 e aqui descrito em outro lugar, para a ativação de TILs, pode ser utilizado, em que TILs são ativados usando grânulos de CD3/CD28 ativadores de célula T humana Dynabeads (comercialmente disponível da Invitrogen) na razão de 1:1 de complexos de grânulo de CD3⁺: anticorpo CD3/CD28 de ativador de célula ou célula T humana tal como ativador de CD3/CD28 Immunocult (comercialmente disponível da StemCell Technologies). Um total de 5×10⁶ TILs/180 µL de meio de citoporação T BTX pode ser misturado com cerca de 10 a 20 µg do mRNA de TALEN transcrito *in vitro* (mMESSAGE mMACHINE T7 kit;

Ambion), antes da eletroporação usando um sistema Agile Pulso BTX (Harvard Apparatus). As células eletroporadas podem ser expandidas pelos métodos de pré-REP e REP aqui descritos em outro lugar. Os TILs pós-REP serão avaliados quanto a viabilidade de célula e expansão multiplicativa (Contador de Células) e *knockdown* de PD-1 (fluxo e qPCR). Os resultados alvos são >80% de viabilidade ou dentro de 10 % de um controle de “não eletroporação” (NE); >70% de transfecção; expansão multiplicativa de TILs até dentro de 30% de NE; e >50% de nocaute de PD-1. Os métodos de eletroporação conhecidos na técnica, tais como aqueles descritos nas Patentes U.S. Nos. 6.010.613 e 6.078.490, as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência, podem ser usados.

[001304] A otimização da eletroporação pulsada pode ser realizada usando métodos aqui descritos ou como seguem. Um primeiro conjunto de experimentos foi realizado nos TILs de modo a determinar uma faixa de voltagem na qual as células seriam transfectadas. Cinco programas diferentes foram testados:

Programa	Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
	Pulsos	V	Duração (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	Duração (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	Duração (ms)	Intervalo (ms)
1	1	600	0,1	0,2	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2
2	1	900	0,1	0,2	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2
4	1	1200	0,1	10	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
5	1	900	0,1	20	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2

[001305] TILs podem ser eletroporados em cubeta com intervalo de 0,4 cm (da ordem de cerca de 10^6 células/mL) com cerca de 20 µg de plasmídeos codificando GFP e plasmídeos de controle pUC usando os diferentes programas de eletroporação. Cerca de 24 horas após a eletroporação, a expressão de GFP foi analisada em células eletroporadas pela citometria de fluxo para determinar a eficiência de transfecção. A voltagem mínima requerida para a eletroporação de plasmídeo em TILs foi previamente relatada na Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 2014/184744 e Publicação do Pedido de Patente U.S No. US 2013/0315884 A1, as

divulgações das quais são aqui incorporadas por referência e programas 3 e 4 cada um permitiu um processo de incorporação de TALEN eficiente para TILs.

[001306] A construção de TALEN mostrada na Figura 23 alveja o exon 2 do gene *Pdcd1*, como mostrado e pode ser usada para a inativação de PD1.

[001307] Os exemplos apresentados acima são providos para oferecer àqueles de habilidade comum na técnica uma divulgação e descrição completas de como fabricar e usar as modalidades das composições, sistemas e métodos da invenção e não são intencionados a limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. Modificações dos modos descritos acima para realizar a invenção que são óbvias para as pessoas versadas na técnica são intencionadas estar dentro do escopo das seguintes reivindicações. Todas as patentes e publicações mencionadas no relatório descritivo são indicativas dos níveis de habilidade daqueles versados na técnica à qual a invenção pertence.

[001308] Todos os cabeçalhos e designações de seção são usadas apenas para os propósitos de clareza e referência e não devem ser considerados limitantes de nenhum modo. Por exemplo, aqueles versados na técnica avaliarão a utilidade de combinar vários aspectos de cabeçalhos e seções diferentes como apropriado de acordo com o espírito e escopo da invenção aqui descrita.

[001309] Todas as referências aqui citadas são por meio deste aqui incorporadas por referência nas suas totalidades e para todos os propósitos até o mesmo grau como se cada publicação ou patente ou pedido de patente individuais fossem especificamente e individualmente indicados como sendo incorporados por referência na sua totalidade para todos os propósitos.

[001310] Muitas modificações e variações deste pedido podem ser feitas sem divergir do seu espírito e escopo, como estará evidente para aqueles versados na técnica. As modalidades específicas e exemplos aqui descritos

são oferecidos apenas por via de exemplo e o pedido deve ser limitado apenas pelos termos das reivindicações anexas, junto com o escopo completo de equivalentes para os quais as reivindicações são intituladas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado, em que os fragmentos de tumor são de um tumor ressecado de um paciente;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da

etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem abrir o sistema;

(f) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema; e

(g) em qualquer tempo durante o método, editar gene de pelo menos uma porção dos TILs.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida na etapa (f) usando um processo de criopreservação.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processo de criopreservação é realizado usando uma razão 1:1 da população de TIL colhida para o meio de criopreservação.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células apresentando antígeno são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são adicionadas à cultura de célula em qualquer um dos dias 9 a 14 na etapa (d).

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células apresentando antígeno são células apresentando antígeno artificiais.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a colheita na etapa (e) é realizada usando um sistema de processamento de célula com base em membrana.

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

fato de que a colheita na etapa (e) é realizada usando um sistema de processamento de célula LOVO.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 a cerca de 50 fragmentos, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm^3 .

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm^3 a cerca de 1500 mm^3 .

12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1350 mm^3 .

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula é provido em um recipiente selecionado do grupo consistindo em um recipiente G e uma Xuri cellbag.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula na etapa (d) compreende adicionalmente IL-15 e/ou IL-21.

16. Método de acordo com a qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a concentração de IL-2 é de cerca de 10.000 IU/mL a cerca de 5.000 IU/mL.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a concentração de IL-15 é de cerca de 500 IU/mL a cerca de 100 IU/mL.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de IL-21 é de cerca de 20 IU/mL a cerca de

0,5 IU/mL.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bolsa de infusão na etapa (f) é uma bolsa de infusão contendo um HypoThermosol.

20. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o meio de criopreservação compreende sulfóxido de dimetila (DMSO).

21. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o meio de criopreservação compreende 7% a 10% de DMSO.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro período na etapa (c) e o segundo período na etapa (e) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 10 dias, 11 dias ou 12 dias.

23. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o primeiro período na etapa (c) e o segundo período na etapa (e) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 11 dias.

24. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 22 dias.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 20 dias a cerca de 22 dias.

26. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 15 dias a cerca de 20 dias.

27. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 20 dias.

28. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 15 dias.

29. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas em 22 dias ou menos.

30. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas em 20 dias ou menos.

31. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas em 15 dias ou menos.

32. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) são realizadas em 10 dias ou menos.

33. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as etapas de (a) a (f) e a criopreservação são realizadas em 22 dias ou menos.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs colhida na etapa (e) compreende TILs suficientes para uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficiente para uma dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que as etapas (b) a (e) são realizadas em um único recipiente, em que realizar as etapas (b) a (e) em um único recipiente resulta em um aumento no rendimento de TIL por tumor ressecado quando comparado com a realização das etapas (b) a (e) em mais do que um recipiente.

37. Método de acordo com a reivindicação 1 a 36, caracterizado pelo fato de que as células apresentando antígeno são adicionadas aos TILs durante o segundo período na etapa (d) sem abrir o

sistema.

38. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa (d) provê for eficácia aumentada, produção de interferon-gama aumentada, uma dosagem terapeuticamente eficaz aumentada, IP-10 médio aumentado e/ou MCP-1 médio aumentado quando administrados a um indivíduo.

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa (d) provê pelo menos uma produção de interferon-gama de cinco vezes ou mais quando administrada a um indivíduo.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa (d) é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efetoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efetoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas do grupo consistindo em expressar CD27+, expressar CD28+, telômeros mais longos, expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da segunda população de células.

41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, caracterizado pelo fato de que as células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da terceira população de TILs exibem expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efetoras e/ou células T de memória central obtidas a partir da segunda população de células.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 41, caracterizado pelo fato de que o risco de contaminação microbiana é reduzido quando comparado com um sistema aberto.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, caracterizado pelo fato de que os TILs da etapa (g) são infundidos dentro de um paciente.

44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 43, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 fragmentos.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 foram inseridos dentro do meio de cultura de célula.

47. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 fossem inseridos dentro do meio de cultura de célula.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada antes da

etapa (c), antes da etapa (d) ou antes da etapa (e).

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o OKT-3 fosse inserido dentro do meio de cultura de célula.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 começando no dia de início da primeira expansão e a edição de gene é realizada depois que os TILs foram expostos ao OKT-3.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, caracterizado pelo fato de que a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

57. Método de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

58. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, caracterizado pelo fato de que a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionado(s) do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

61. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método CRISPR.

62. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o método CRISPR é um método CRISPR/Cas9.

63. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método TALE.

64. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método do dedo de zinco.

65. Método para tratar um indivíduo com câncer, o método caracterizado pelo fato de que compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um indivíduo pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem abrir o sistema; e

(f) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir o sistema;

(g) opcionalmente criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida da etapa (f) usando um processo de criopreservação;

(h) administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz da terceira população de TILs da bolsa de infusão na etapa (g) ao paciente; e

(i) em qualquer tempo durante as etapas (a) a (f) do método, editar gene da pelo menos uma porção dos TILs.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs colhida na etapa (e) compreende TILs suficientes para administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs na etapa (h).

67. Método de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficiente para administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz na etapa (h) é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

68. Método de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que as células apresentando antígeno (APCs) são PBMCs.

69. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são adicionadas à cultura de célula em qualquer um dos dias 9 a 14 na etapa (d).

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 69, caracterizado pelo fato de que antes de administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz de células de TIL na etapa (h), um regime de

linfodepleção não mieloablativa foi administrado ao paciente.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o regime de linfodepleção não mieloablativa compreende as etapas de administração de ciclofosfamida em uma dose de 60 mg/m²/dia durante dois dias seguido pela administração de fludarabina em uma dose de 25 mg/m²/dia durante cinco dias.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 71, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de tratar o paciente com um regime de alta dose de IL-2 começando no dia depois da administração das células de TIL ao paciente na etapa (h).

73. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que o regime de alta dose de IL-2 compreende 600.000 ou 720.000 IU/kg administrados como uma infusão de bolo intravenoso de 15 minutos a cada oito horas até a tolerância.

74. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 73, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa (d) é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efectoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efectoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas do grupo consistindo em expressar CD27+, expressar CD28+, telômeros mais longos, expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

75. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 74, caracterizado pelo fato de que as células T efectoras e/ou células T de memória central na população terapêutica de TILs exibem expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de

células.

76. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 75, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, câncer ovariano, câncer cervical, câncer pulmonar de célula não pequena (NSCLC), câncer pulmonar, câncer de bexiga, câncer mamário, câncer causado pelo vírus do papiloma humano, câncer da cabeça e pescoço (incluindo carcinoma de célula escamosa da cabeça e pescoço (HNSCC)), câncer renal e carcinoma de célula renal.

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 76, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, HNSCC, cânceres cervicais e NSCLC.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 77, caracterizado pelo fato de que o câncer é melanoma.

79. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 78, caracterizado pelo fato de que o câncer é HNSCC.

80. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 79, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer cervical.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 80, caracterizado pelo fato de que o câncer é NSCLC.

82. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 81, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

83. Método de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 foram inseridos dentro do meio de cultura de célula.

84. Método de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 fossem inseridos dentro do meio de cultura de

célula.

85. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 84, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

86. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 84, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada nas TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

87. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 84, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

88. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 84, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada antes da etapa (c), antes da etapa (d) ou antes da etapa (e).

89. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 88, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que OKT-3 seja inserido dentro do meio de cultura de célula.

90. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 88, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

91. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 88, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 começando no dia de início da primeira expansão e a edição de gene é realizada depois que os TILs foram expostos ao OKT-3.

92. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

65 a 91, caracterizado pelo fato de que a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

93. Método de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

94. Método de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 91, caracterizado pelo fato de que a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionado do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

96. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 95, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem

imune.

97. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 95, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

98. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 95, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método CRISPR.

99. Método de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que o método CRISPR é um método CRISPR/Cas9.

100. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 95, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método TALE.

101. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 95, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método do dedo de zinco.

102. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) adicionar fragmentos de tumor processados a partir de um tumor ressecado de um paciente dentro de um sistema fechado para se obter uma primeira população de TILs;

(b) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em

número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (a) para a etapa (b) ocorre sem abrir o sistema;

(c) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (c), em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) transferir a população de TIL colhida da etapa (d) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (d) para (e) ocorre sem abrir o sistema; e

(f) em qualquer tempo durante o método, editar gene de pelo menos uma porção dos TILs.

103. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que a população terapêutica de TILs colhida na etapa (d) compreende TILs suficientes para uma dosagem terapeuticamente eficaz dos TILs.

104. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que o número de TILs suficiente para uma dosagem terapeuticamente eficaz é de cerca de $2,3 \times 10^{10}$ a cerca de $13,7 \times 10^{10}$.

105. Método de acordo com a reivindicação 104, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida usando um processo

de criopreservação.

106. Método de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que o processo de criopreservação é realizado usando uma razão 1:1 de população de TIL colhida para o meio de criopreservação.

107. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que as células apresentando antígeno são células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

108. Método de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são irradiadas e alogênicas.

109. Método de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que as PBMCs são adicionadas à cultura de célula em qualquer um dos dias 9 a 14 na etapa (c).

110. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que as células apresentando antígeno são células apresentando antígeno artificiais.

111. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que a colheita na etapa (d) é realizada usando um sistema de processamento de célula LOVO.

112. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 a cerca de 50 fragmentos, em que cada fragmento tem um volume de cerca de 27 mm³.

113. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 30 a cerca de 60 fragmentos com um volume total de cerca de 1300 mm³ a cerca de 1500 mm³.

114. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com um volume total de cerca de 1350 mm³.

115. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado

pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 50 fragmentos com uma massa total de cerca de 1 grama a cerca de 1,5 grama.

116. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que os fragmentos múltiplos compreendem cerca de 4 fragmentos.

117. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o segundo meio de cultura de célula é provido em um recipiente selecionado do grupo consistindo em um recipiente G e uma Xuri cellbag.

118. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que a bolsa de infusão na etapa (e) é uma bolsa de infusão contendo um HypoThermosol.

119. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 10 dias, 11 dias ou 12 dias.

120. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o primeiro período na etapa (b) e o segundo período na etapa (c) são cada um individualmente realizados dentro de um período de 11 dias.

121. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) a (e) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 22 dias.

122. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) a (e) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 20 dias.

123. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que etapas (a) a (e) são realizadas dentro de um período de cerca de 10 dias a cerca de 15 dias.

124. Método de acordo com a reivindicação 102, caracterizado

pelo fato de que as etapas (a) a (e) são realizadas em 22 dias ou menos.

125. Método de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) a (e) e a criopreservação são realizadas em 22 dias ou menos.

126. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 125, caracterizado pelo fato de que as etapas (b) a (e) são realizadas em um único recipiente, em que realizar as etapas (b) a (e) em um único recipiente resulta em um aumento no rendimento de TIL por tumor ressecado quando comparado com a realização das etapas (b) a (e) em mais do que um recipiente.

127. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 126, caracterizado pelo fato de que as células apresentando antígeno são adicionadas aos TILs durante o segundo período na etapa (c) sem abrir o sistema.

128. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 127, caracterizado pelo fato de que a terceira população de TILs na etapa (d) é uma população terapêutica de TILs que compreende uma subpopulação aumentada de células T efectoras e/ou células T de memória central em relação à segunda população de TILs, em que as células T efectoras e/ou células T de memória central obtida na população terapêutica de TILs exibem uma ou mais características selecionadas do grupo consistindo em expressar CD27+, expressar CD28+, telômeros mais longos, expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

129. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 128, caracterizado pelo fato de que as células T efectoras e/ou células T de memória central obtida na população terapêutica de TILs exibem expressão de CD57 aumentada e expressão de CD56 diminuída em relação às

células T efectoras e/ou células T de memória central obtida a partir da segunda população de células.

130. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 129, caracterizado pelo fato de que o risco de contaminação microbiana é reduzido quando comparado com um sistema aberto.

131. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 130, caracterizado pelo fato de que os TILs da etapa (e) são infundidos dentro de um paciente.

132. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 131 caracterizado pelo fato de que o recipiente fechado compreende um único biorreator.

133. Método de acordo com a reivindicação 132, caracterizado pelo fato de que o recipiente fechado compreende um G-REX-10.

134. Método de acordo com a reivindicação 132, caracterizado pelo fato de que o recipiente fechado compreende um G-REX-100.

135. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 134, caracterizado pelo fato de que na etapa (d) as células apresentando antígeno (APCs) são adicionadas à cultura de célula da segunda população de TILs em uma razão APC:TIL de 25:1 a 100:1.

136. Método de acordo com a reivindicação 135, caracterizado pelo fato de que a cultura celular tem uma razão de $2,5 \times 10^9$ APCs para 100×10^6 TILs.

137. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 134, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) as células apresentando antígeno (APCs) são adicionadas à cultura de célula da segunda população de TILs em uma razão APC:TIL de 25:1 a 100:1.

138. Método de acordo com a reivindicação 137, caracterizado pelo fato de que a cultura celular tem razão de $2,5 \times 10^9$ APCs para 100×10^6 TILs.

139. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 138, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

140. Método de acordo com a reivindicação 139, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada depois que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 foram inseridos dentro do meio de cultura de célula.

141. Método de acordo com a reivindicação 139, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada antes que o agonista de 4-1BB e/ou o agonista de OX40 fossem inseridos dentro do meio de cultura de célula.

142. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 141, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

143. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 141, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

144. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 141, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

145. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 141, caracterizado pelo fato de que a edição de gene é realizada antes da etapa (b), antes da etapa (c) ou antes da etapa (d).

146. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 145, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada antes que o OKT-3 fosse inserido dentro do meio de cultura de célula.

147. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 145, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 durante a primeira expansão e/ou durante a segunda expansão e a edição de gene é realizada depois que o OKT-3 foi inserido dentro do meio de cultura de célula.

148. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 145, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura de célula compreende OKT-3 começando no dia de início da primeira expansão e a edição de gene é realizada depois que os TILs foram expostos ao OKT-3.

149. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 148, caracterizado pelo fato de que a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs.

150. Método de acordo com a reivindicação 149, caracterizado pelo fato de que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

151. Método de acordo com a reivindicação 149, caracterizado pelo fato de que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

152. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 148, caracterizado pelo fato de que a edição de gene faz com que a

expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionados do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

153. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 152, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune.

154. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 152, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

155. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 152, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método CRISPR.

156. Método de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que o método CRISPR é um método CRISPR/Cas9.

157. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 152, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método TALE.

158. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 102 a 152, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método do dedo de zinco.

159. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos para o uso no tratamento de um indivíduo com câncer, caracterizada pelo fato de que a população de TILs expandidos é uma terceira

população de TILs obtenível por um método compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um indivíduo pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 3 a 14 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (b) para a etapa (c) ocorre sem abrir o sistema;

(d) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente OKT-3 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 14 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a terceira população de TILs é uma população terapêutica de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (d), em que a transição da etapa (d) para a etapa (e) ocorre sem abrir o sistema;

(f) transferir a população de TIL colhida da etapa (e) para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (e) para (f) ocorre sem abrir

o sistema;

(g) opcionalmente criopreservar a bolsa de infusão compreendendo a população de TIL colhida da etapa (f) usando um processo de criopreservação; e

(h) em qualquer tempo durante o método, editar gene de pelo menos uma porção dos TILs.

160. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que o método compreende adicionalmente um ou mais dos traços citados como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 158.

161. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que o meio de cultura de célula compreende adicionalmente um agonista de 4-1BB e/ou um agonista de OX40 durante a primeira expansão, a segunda expansão ou ambas.

162. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que a edição de gene é realizada nos TILs de uma ou mais da primeira população, da segunda população e da terceira população.

163. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer de acordo com a reivindicação 159, em que a edição de gene é realizada nos TILs da primeira expansão ou TILs da segunda expansão ou ambos.

164. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que a edição de gene é realizada depois da primeira expansão e antes da segunda expansão.

165. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que a edição de gene é realizada antes da etapa (c), antes da etapa (d) ou antes da etapa (e).

166. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja silenciada ou reduzida em pelo menos uma porção da população de TILs expandidos.

167. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 166, em que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 e GUCY1B3.

168. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 166, em que os ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune é/são selecionado(s) do grupo compreendendo PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β e PKA.

169. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 166, em que a edição de gene faz com que a expressão de um ou mais genes do ponto de checagem imune seja realçada

em pelo menos uma porção da população terapêutica de TILs, o(s) gene(s) do ponto de checagem imune sendo selecionado do grupo compreendendo CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, o domínio intracelular NOTCH 1/2 (ICD) e/ou o ligante de NOTCH mDLL1.

170. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que a edição de gene compreende o uso de uma nuclease programável que medeia a geração de uma ruptura de filamento duplo ou filamento único nos ditos um ou mais genes do ponto de checagem imune.

171. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), caracterizada pelo fato de ser para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definido na reivindicação 159, em que a edição de gene compreende um ou mais métodos selecionados a partir de um método CRISPR, um método TALE, um método do dedo de zinco e uma combinação dos mesmos.

172. Composição de criopreservação, caracterizada pelo fato de que compreende a população de TILs para o uso para tratar um indivíduo com câncer como definida na reivindicação 159, um meio crioprotetor compreendendo DMSO e uma solução de eletrólito.

173. Composição de criopreservação de acordo com a reivindicação 172 caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um ou mais estabilizantes e um ou mais fatores de crescimento de linfócito.

174. Composição de criopreservação de acordo com a reivindicação 173, caracterizada pelo fato de que o um ou mais estabilizantes compreendem Albumina Sérica Humana (HSA) e o um ou mais fatores de crescimento de linfócito compreendem a IL-2.

175. Composição de criopreservação de acordo com a reivindicação 174, caracterizada pelo fato de que o meio crioprotetor

compreendendo DMSO e a solução de eletrólito estão presentes em uma razão de cerca de 1,1:1 a cerca de 1:1,1.

176. Composição de criopreservação de acordo com a reivindicação 174 caracterizada pelo fato de que compreende a população de TILs em uma quantidade de cerca de 1×10^6 a cerca de 9×10^{14} , o meio crioprotetor compreendendo DMSO em uma quantidade de cerca de 30 mL a cerca de 70 mL, a solução de eletrólito em uma quantidade de cerca de 30 mL a cerca de 70 mL, HSA em uma quantidade de cerca de 0,1 g a cerca de 1,0 g e IL-2 em uma quantidade de cerca de 0,001 mg a cerca de 0,005 mg.

177. Método para expandir linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) dentro de uma população terapêutica de TILs, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo OKT-3 e/ou um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) opcionalmente adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda

população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas.

178. Método de acordo com a reivindicação 177, caracterizado

pelo fato de que compreende realizar a primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2, OKT-3 e um anticorpo agonista de 4-1BB, em que o OKT-3 e o anticorpo agonista de 4-1BB estão opcionalmente presentes no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1.

179. Método de acordo com a reivindicação 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB e combinações das mesmas.

180. Método de acordo com a reivindicação 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de PD-1.

181. Método de acordo com a reivindicação 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de LAG-3.

182. Método de acordo com a reivindicação 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a

expressão de TIM-3.

183. Método de acordo com a reivindicação 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de CISH.

184. Método de acordo com a reivindicação 177 ou 178, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de CBLB.

185. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 177 a 184, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR).

186. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 177 a 184, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE).

187. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 177 a 184, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um sistema de dedo de zinco.

188. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 177 a 187, caracterizada pelo fato de que o meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila compreende DMSO, uma solução de eletrólito, opcionalmente HSA e opcionalmente IL-2.

189. Método para tratar um indivíduo com câncer,

caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo OKT-3 e/ou um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) opcionalmente adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície

permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema;

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila; e

(k) administrar uma dosagem terapeuticamente eficaz da população de TIL colhida da bolsa de infusão ao paciente;

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas.

190. Método de acordo com a reivindicação 189, caracterizado pelo fato de que compreende realizar a primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2, OKT-3 e um anticorpo agonista de 4-1BB, em que o OKT-3 e o anticorpo agonista de 4-1BB estão opcionalmente presentes no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1.

191. Método de acordo com a reivindicação 189 ou 190, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente

Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB e combinações das mesmas.

192. Método de acordo com a reivindicação 189 ou 190, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de PD-1.

193. Método de acordo com a reivindicação 189 ou 190, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de LAG-3.

194. Método de acordo com a reivindicação 189 ou 190, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de TIM-3.

195. Método de acordo com a reivindicação 189 ou 190, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de CISH.

196. Método de acordo com a reivindicação 189 ou 190,

caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de CBLB.

197. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 189 a 196, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR).

198. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 189 a 196, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE).

199. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 189 a 196, caracterizado pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um sistema de dedo de zinco.

200. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 189 a 196, caracterizado pelo fato de que o meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila compreende DMSO, uma solução de eletrólito, opcionalmente HSA e opcionalmente IL-2.

201. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos para o uso no tratamento de um indivíduo com câncer, caracterizada pelo fato de que a população de TILs expandidos é uma população de TILs colhida obtenível por um método compreendendo:

(a) obter uma primeira população de TILs a partir de um tumor ressecado de um paciente pelo processamento de uma amostra de tumor obtida do paciente em fragmentos múltiplos de tumor;

(b) adicionar os fragmentos de tumor dentro de um sistema fechado;

(c) realizar uma primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2 e opcionalmente compreendendo OKT-3 e/ou um anticorpo agonista de 4-1BB por cerca de 2 a 5 dias;

(d) opcionalmente adicionar OKT-3, para produzir uma segunda população de TILs, em que a primeira expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma primeira área de superfície permeável a gás, em que a primeira expansão é realizada por cerca de 1 a 3 dias para se obter a segunda população de TILs, em que a segunda população de TILs é pelo menos 50 vezes maior em número do que a primeira população de TILs e em que a transição da etapa (c) para a etapa (d) ocorre sem abrir o sistema;

(e) realizar uma etapa de eletroporação estéril na segunda população de TILs, em que a etapa de eletroporação estéril medeia a transferência de pelo menos um editor de gene;

(f) repousar a segunda população de TILs por cerca de 1 dia;

(g) realizar uma segunda expansão pela suplementação do meio de cultura de célula da segunda população de TILs com IL-2 adicional, opcionalmente anticorpo OKT-3, opcionalmente um anticorpo OX40 e células apresentando antígeno (APCs), para produzir uma terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada por cerca de 7 a 11 dias para se obter a terceira população de TILs, em que a segunda expansão é realizada em um recipiente fechado provendo uma segunda área de superfície permeável a gás e em que a transição da etapa (f) para a etapa (g) ocorre sem abrir o sistema;

(h) colher a população terapêutica de TILs obtida a partir da etapa (g) para prover uma população de TIL colhida, em que a transição da etapa (g) para a etapa (h) ocorre sem abrir o sistema, em que a população de TILs colhida é uma população terapêutica de TILs;

(i) transferir a população de TIL colhida para uma bolsa de

infusão, em que a transferência da etapa (h) para (i) ocorre sem abrir o sistema; e

(j) criopreservar a população de TIL colhida usando um meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila,

em que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) e combinações das mesmas.

202. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com a reivindicação 201 caracterizada pelo fato de que compreende realizar a primeira expansão cultivando-se a primeira população de TILs em um meio de cultura de célula compreendendo IL-2, OKT-3 e um anticorpo agonista de 4-1BB, em que o OKT-3 e o anticorpo agonista de 4-1BB estão opcionalmente presentes no meio de cultura de célula começando no Dia 0 ou Dia 1.

203. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com a reivindicação 201 ou 202, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de uma molécula selecionada do grupo consistindo em PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH e CBLB e combinações das mesmas.

204. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com a reivindicação 201 ou 202, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de

Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de PD-1.

205. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com a reivindicação 201 ou 202, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de LAG-3.

206. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com a reivindicação 201 ou 202, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de TIM-3.

207. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com a reivindicação 201 ou 202, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de CISH.

208. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com a reivindicação 201 ou 202, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR), um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE) ou um sistema de dedo de zinco para inibir a expressão de CBLB.

209. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 201 a 208,

caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Repetição Palindrômica Curta Regularmente Intercalada Agrupada (CRISPR).

210. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 201 a 208, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um Sistema de Efetor Semelhante ao Ativador de Transcrição (TALE).

211. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 201 a 208, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende o fornecimento de um sistema de dedo de zinco.

212. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 201 a 211, caracterizada pelo fato de que o meio de criopreservação com base em sulfóxido de dimetila compreende DMSO, uma solução de eletrólito, opcionalmente HSA e opcionalmente IL-2.

213. População de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) expandidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 201 a 211, caracterizada pelo fato de que a etapa de eletroporação compreende uma etapa de eletroporação pulsada.

214. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizado pelo fato de que a edição de gene compreende um método CRISPR e o método CRISPR inclui o uso de um Cas9 de alta fidelidade.

Processo 2A-Processo De 22 Dias, Coleta/Remessa De 2 a 3 Dias

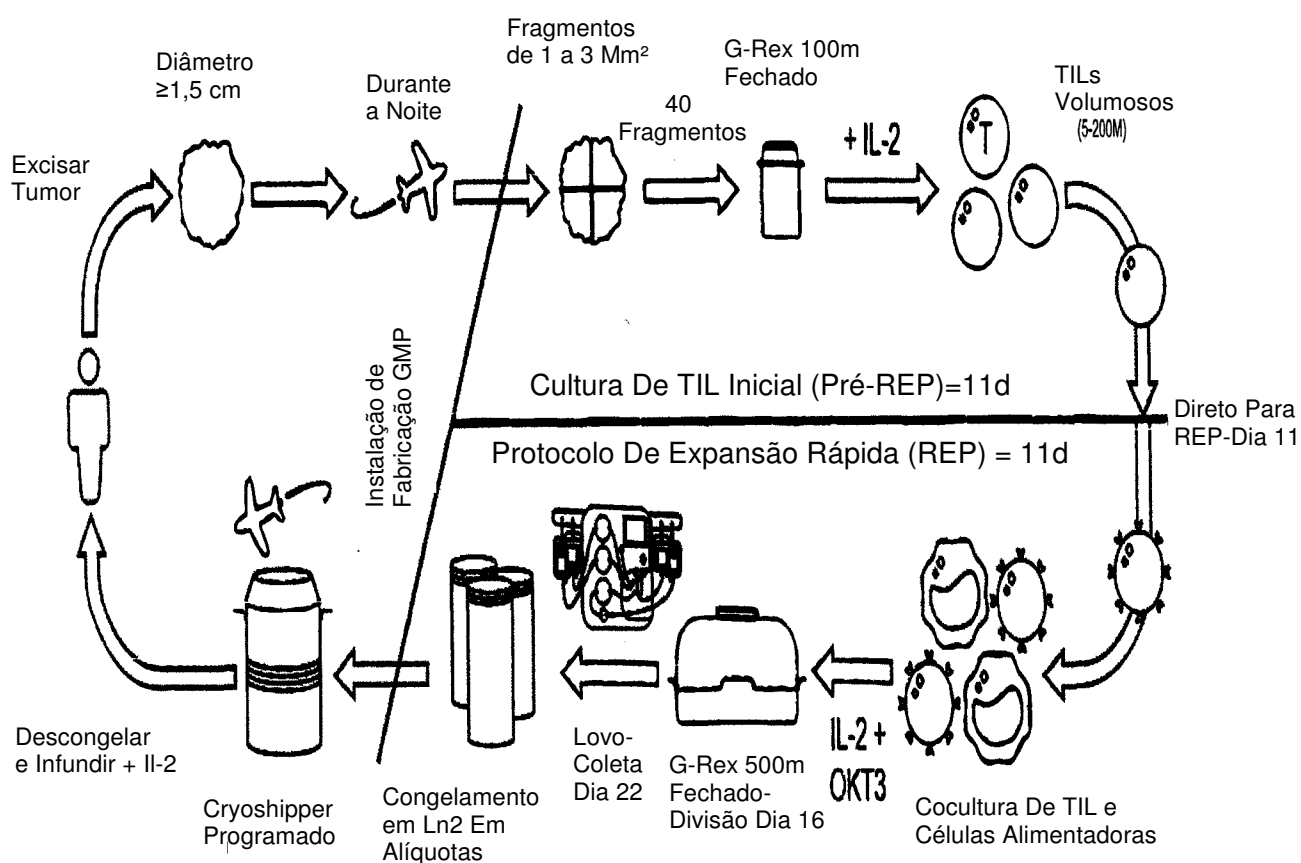


Figura 1

Desenvolvimento De Processo

Etapa	Processo Corrente 1C	Processo Novo 2A	Impacto
1	4 Fragmentos/10 G-Rex 10 a 21 Dias	40 Fragmentos/ 1-G-Rex 100 Cs- (X2?) 11 Dias	Aumenta Amostra/Recipiente De Tumor, Encurta a Cultura, Reduz Etapas, Acessível Para Sistema Fechado
2	Congelar Pré-Rep -> Testar -> Descongelar ~Dia 27 - >40e6til	Direcionado Para Rep - Dia 11 - <200e6	Encurta O Processo, Reduz Etapas, Elimina Testes
3	36 G-Rex 100 - ~Dia 30 >5e6til - Divisão ~Dia 36	4 a 5 G-Rex 500cs- TIL - Divisão Dia 16	Reduz Etapas, Sistema Fechado, REP Mais Curto
4	Dia De Coleta ~43+ - Colhido Pela Centrifugação	Coleta Dia 22 Lovo- Lavadora De Célula Automatizada	Reduz Etapas, Automatizada, Sistema Fechado
5	Produto Fresco - Hypothermosol - Bolsa De Fusão Única	Produto Criopreservado - CS10 Em LN2, Alíquotas Múltiplas	Flexibilidade De Remessa, Programação Do Paciente, Teste De Liberação Mais Fácil, Testes Globais
6	Tempo De Processo De 43+ Dias	Tempo De Processo De 22 Dias	Retorno Para O Paciente, Processamento Em Sala Limpa , COG8

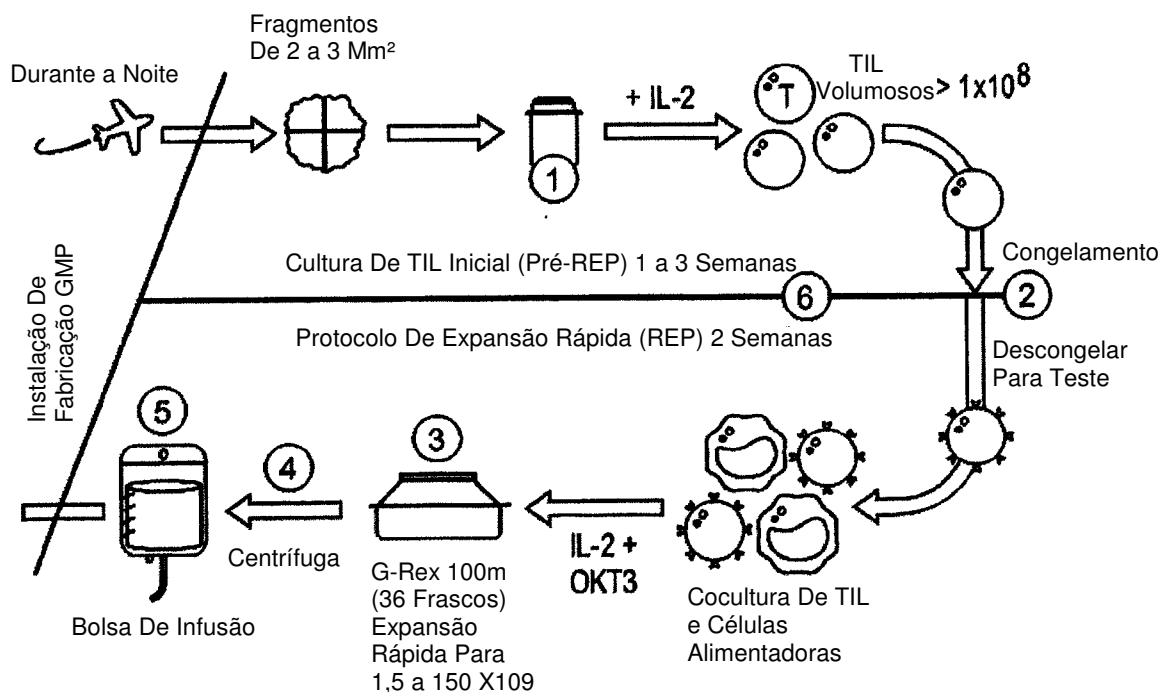


Figura 2

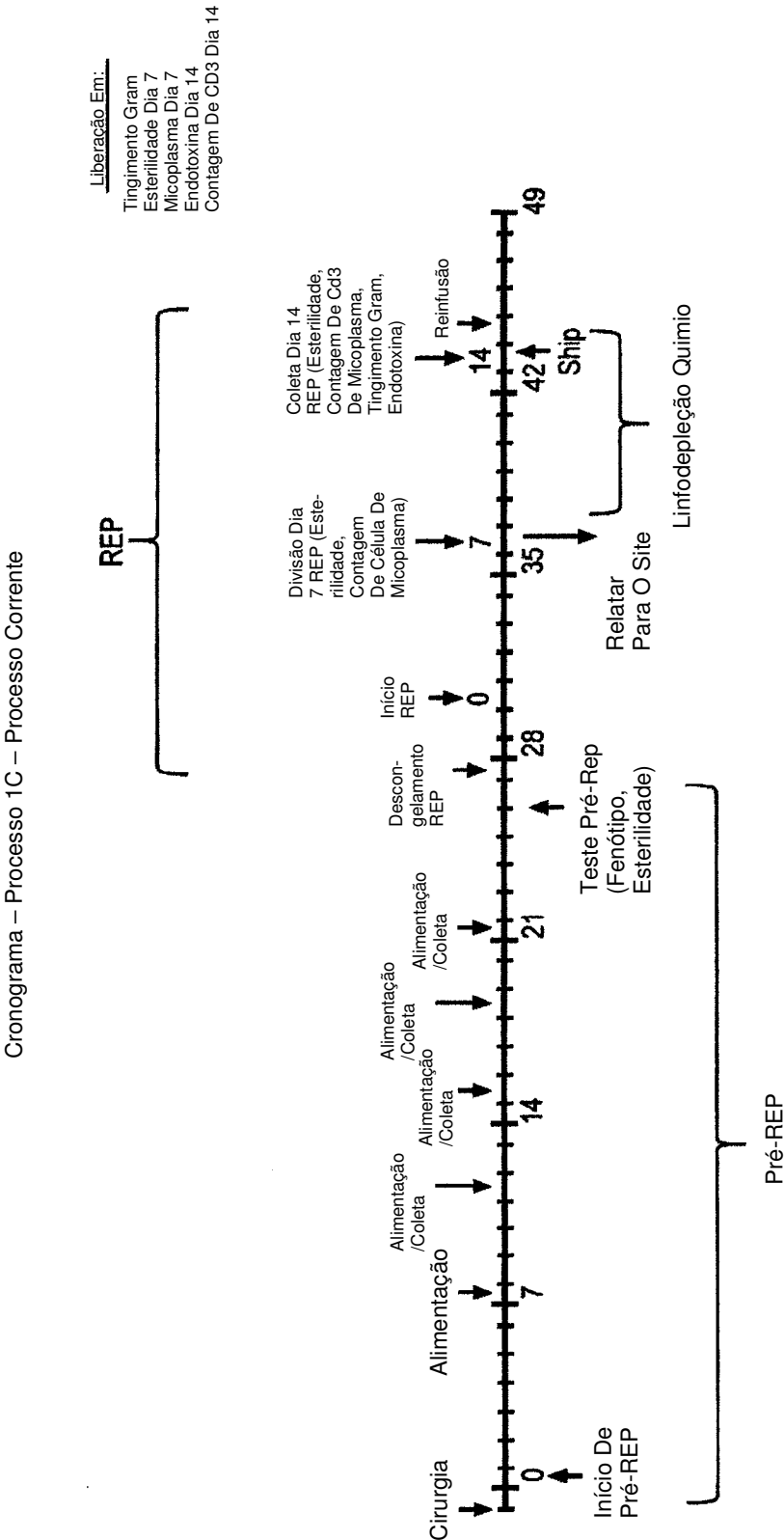


Figura 3

Cronograma De Terapia De TIL – V2A – REP Dia 16 >250e6

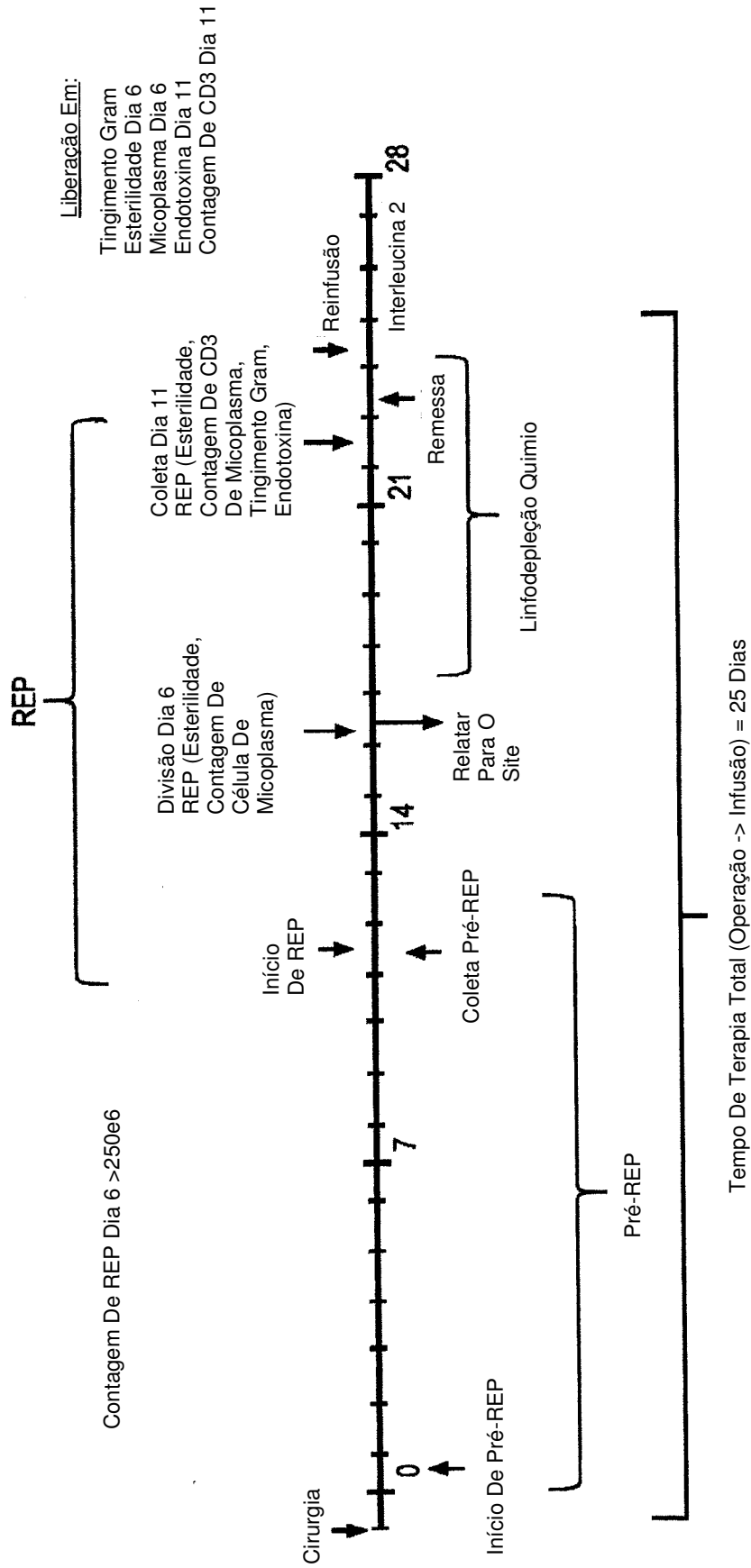


Figura 4

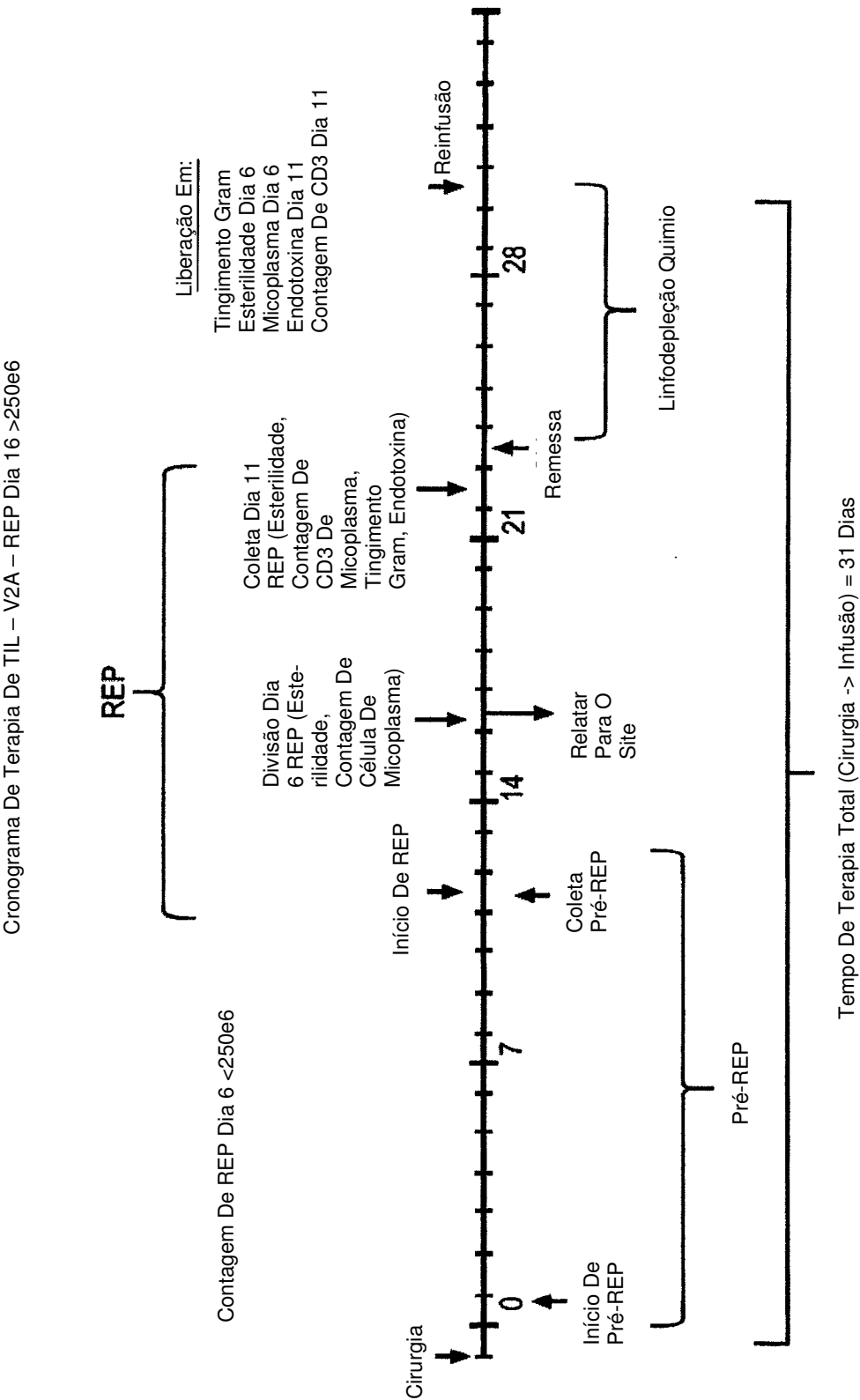


Figura 5

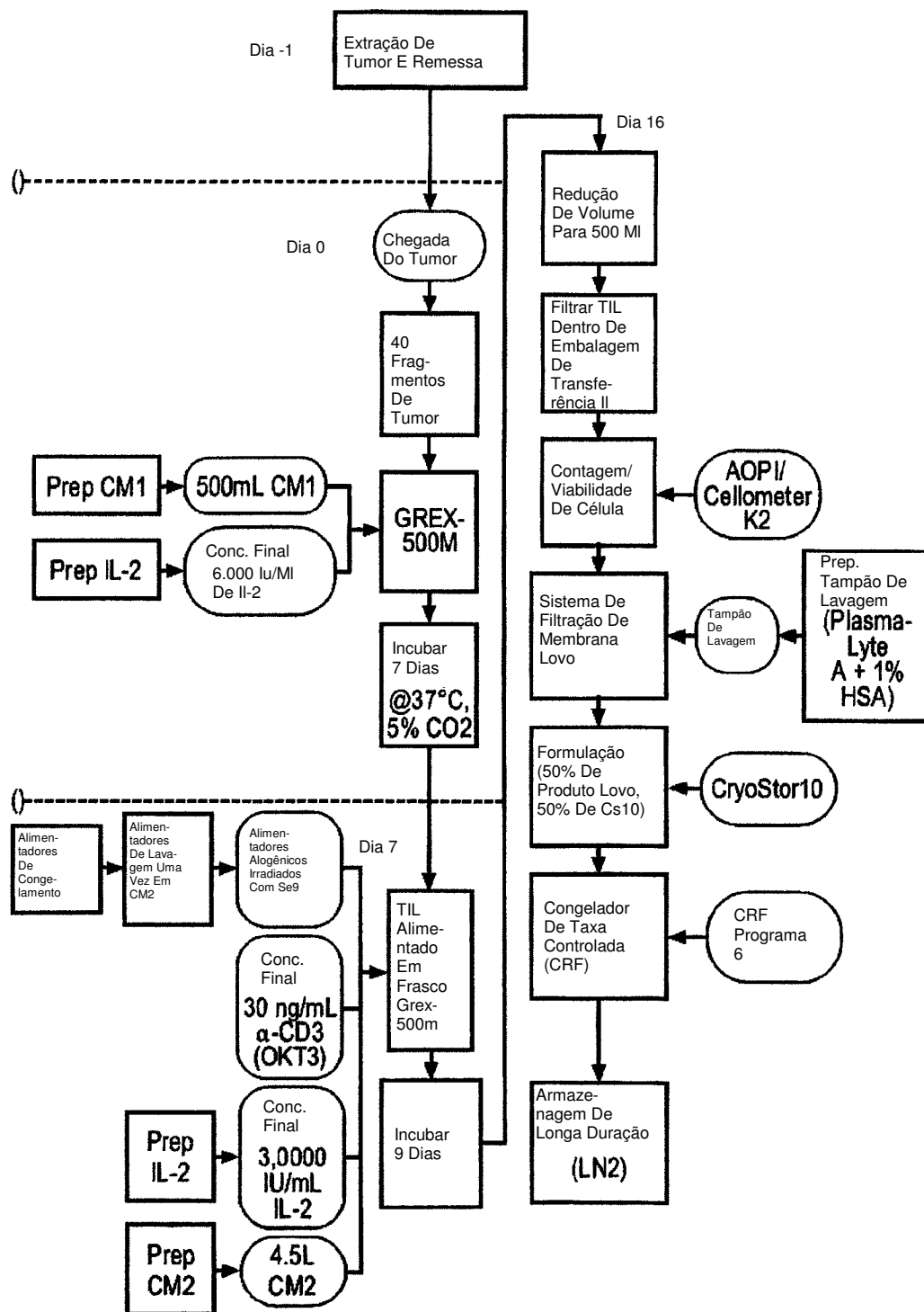


Figura 6

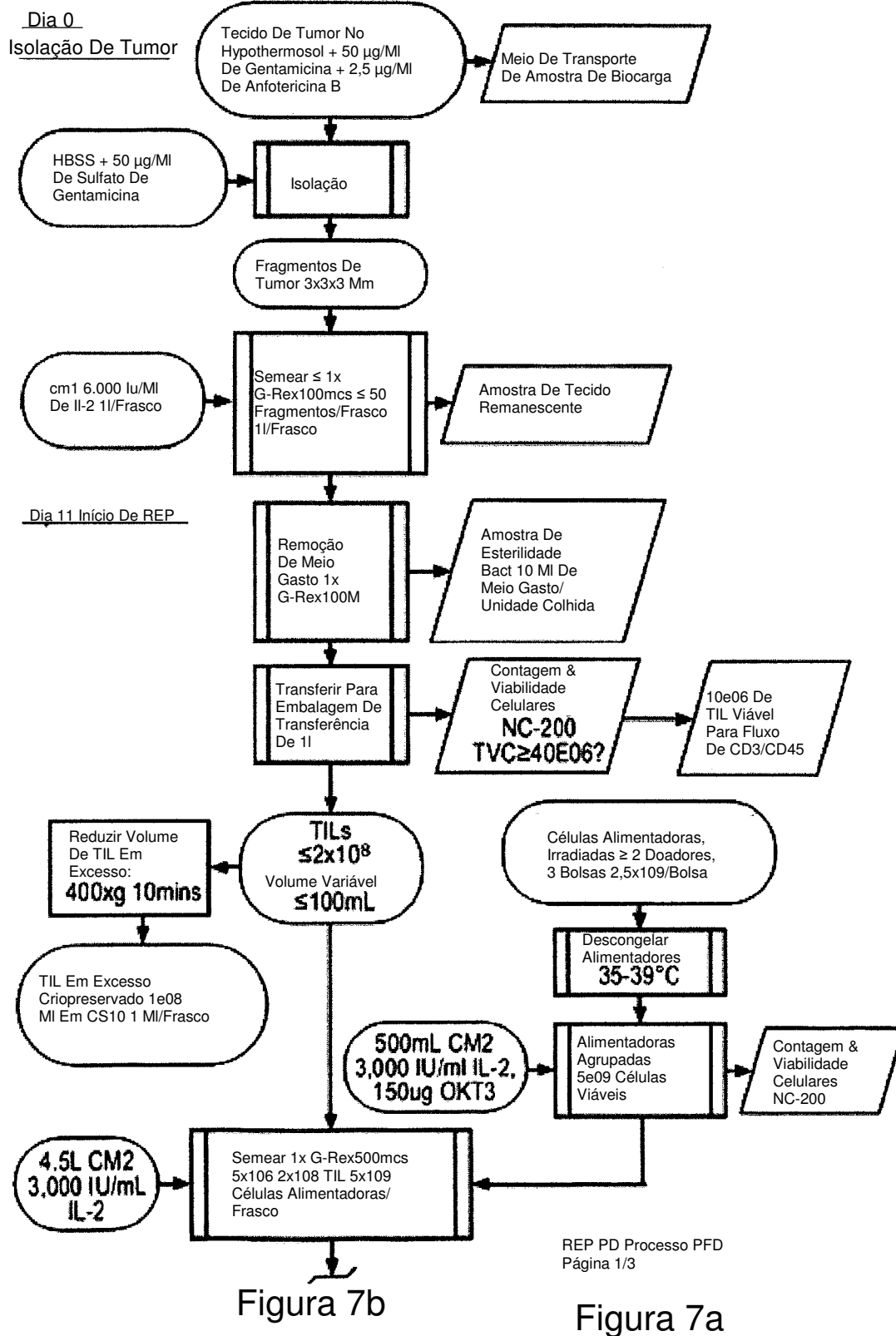


Figura 7b

Figura 7a

Figura 7a

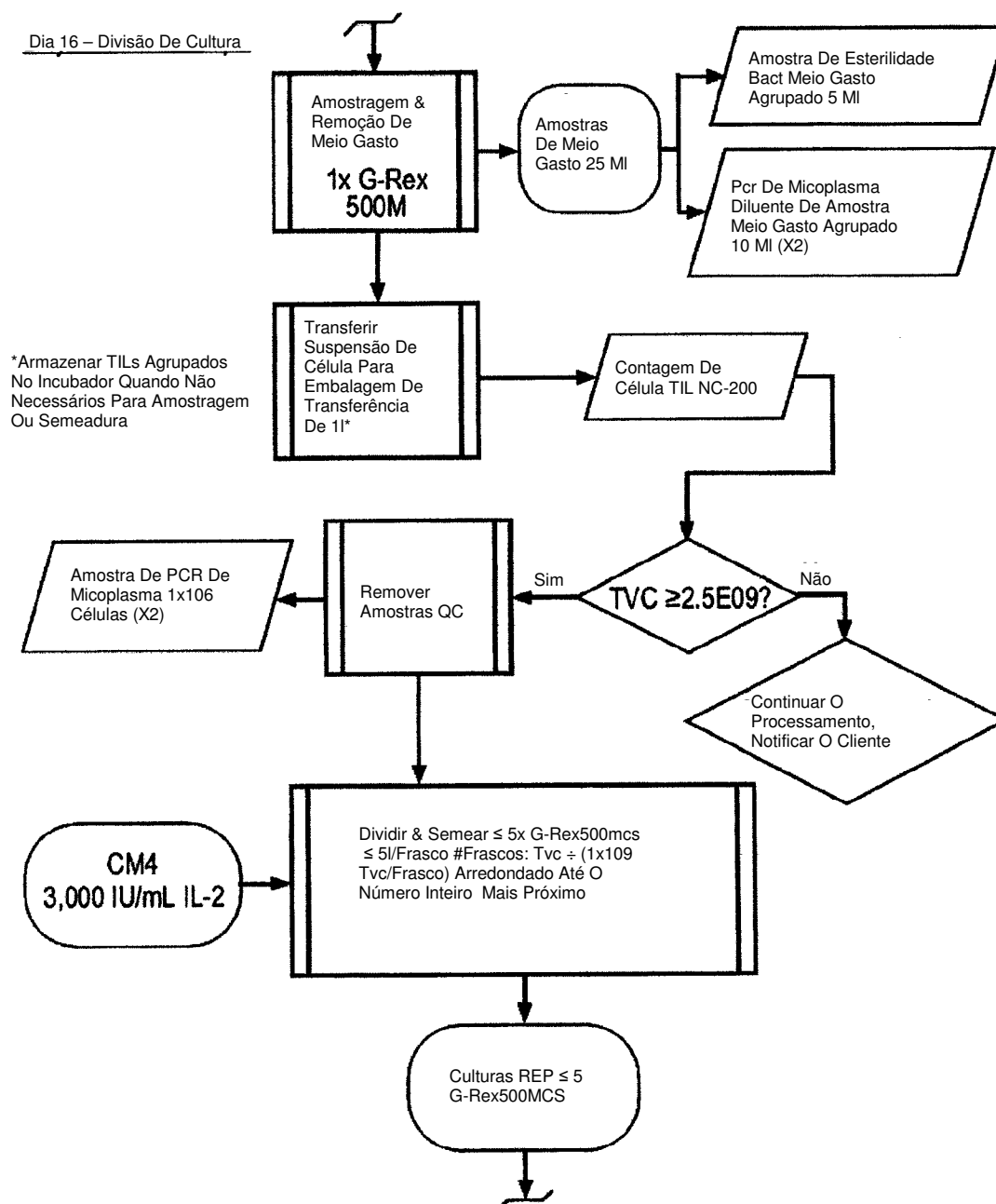


Figura 7c

REP PD Processo PFD
Página 2/3

Figura 7b

Figura 7b

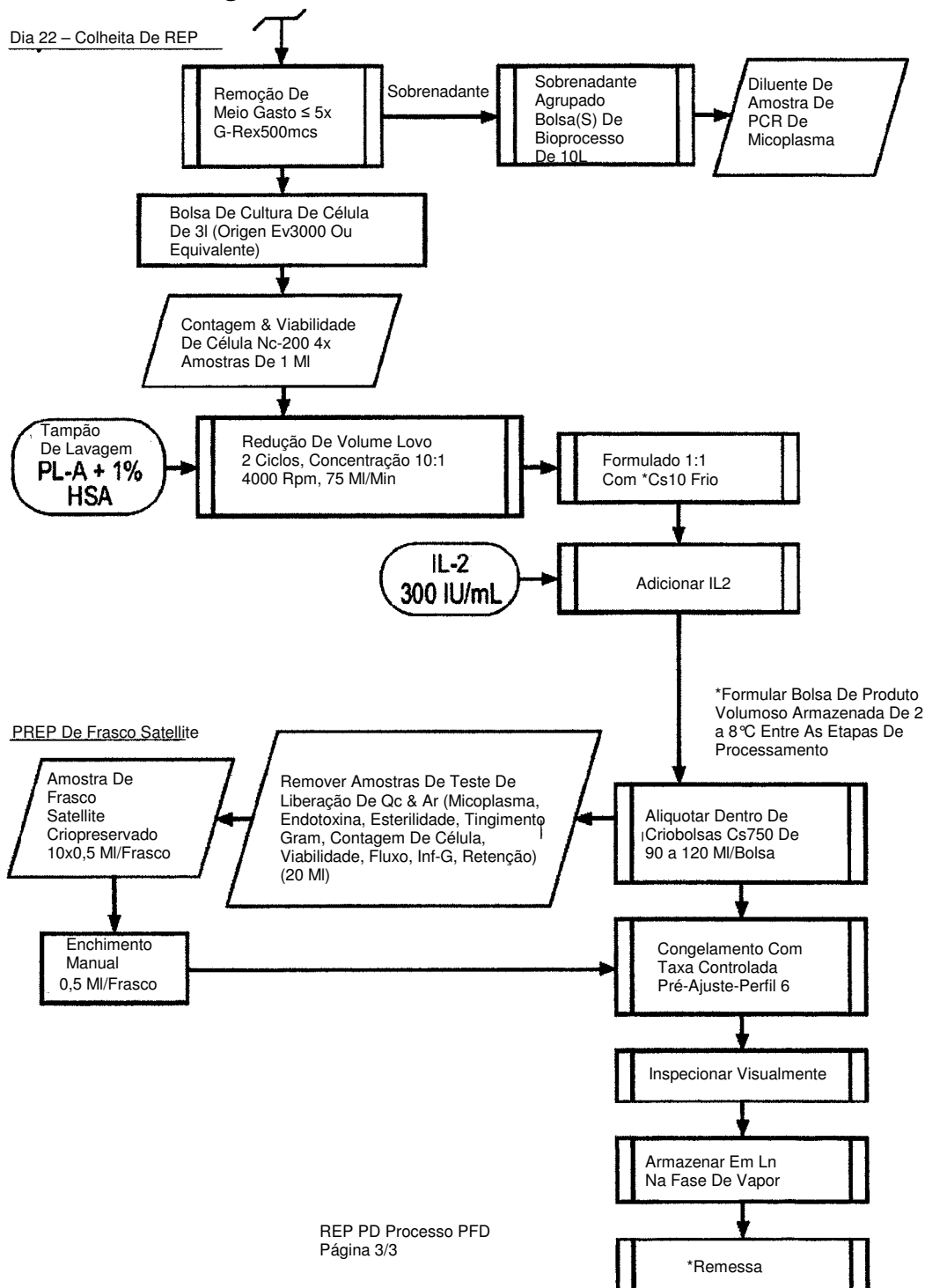


Figura 7c

Figura 8

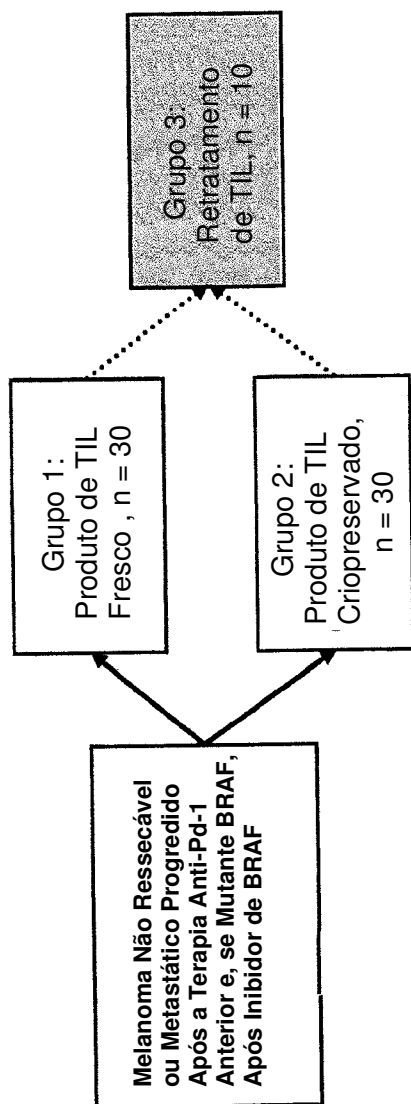


Figura 9

Processo 2A: Cerca De 22 Dias Das Etapas A-E

1. Etapa A

Obter Amostra De Tumor Do Paciente

2. Etapa B

Fragmentação E Primeira Expansão
3 Dias a 14 Dias

3. Etapa C

Transição da Primeira Expansão Para Segunda Expansão
Nenhuma Armazenagem e Sistema Fechado

4. Etapa D

Segunda Expansão
Il2, Okt-3 E Células Alimentadoras Apresentando Antígeno
Sistema Fechado

5. Etapa E

Colher TILs Da Etapa D
Sistema Fechado

6. Etapa F

Formulação Final E/Ou Transferência Para Bolsa De Infusão
(Opcionalmente Criopreservar)

Figura 10

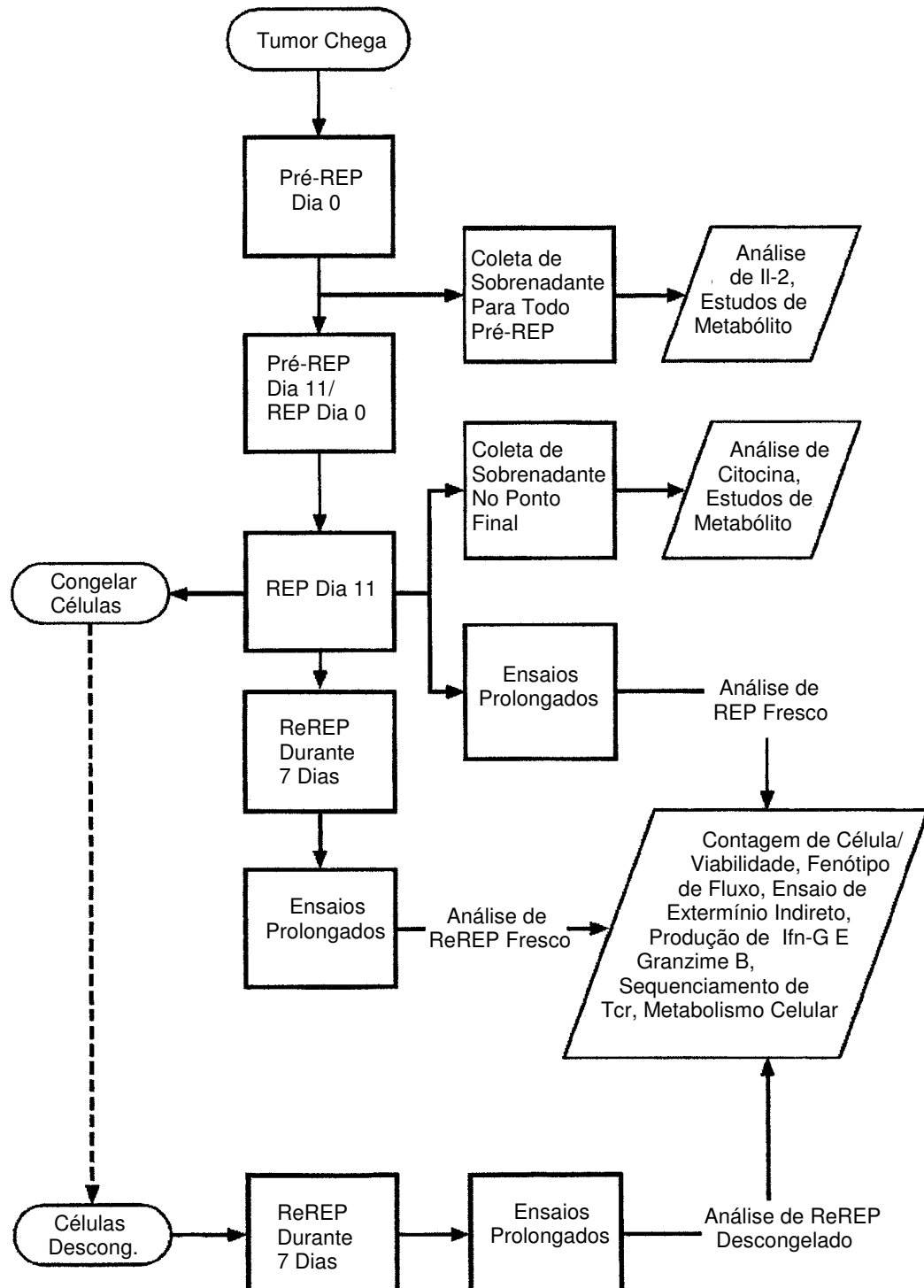


Figura 11

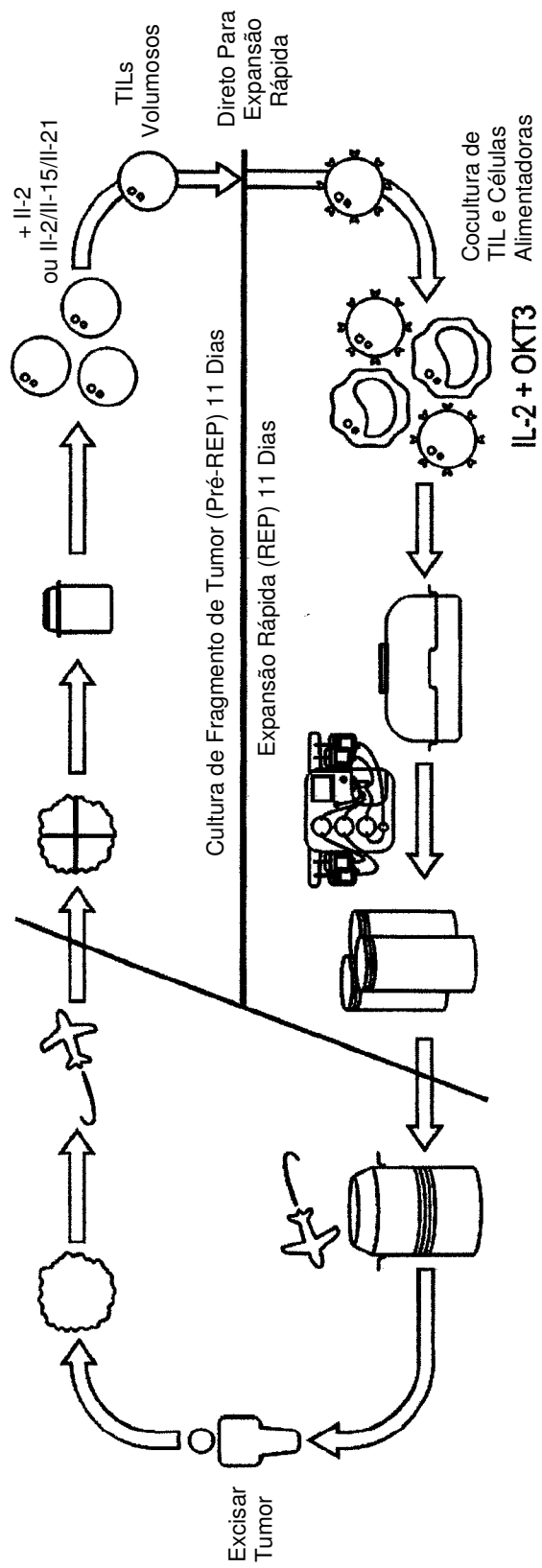


Figura 12

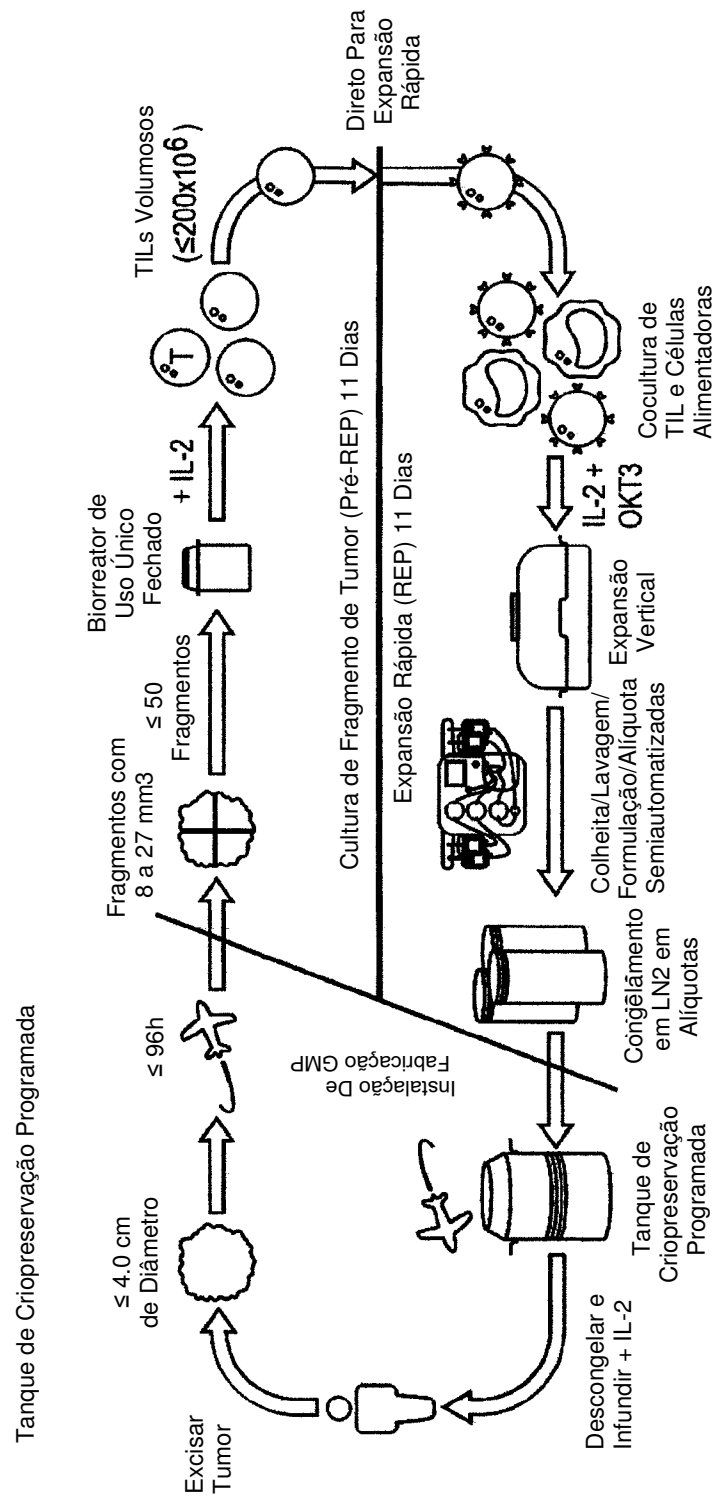


Figura 13

Processo 1C: 43 a 55 Dias Para As Etapas A-E	Processo 2A: Cerca De 22 Dias Das Etapas A-E
1. <u>Etapa A</u> Obter Amostra de Tumor do Paciente	2. <u>Etapa A</u> Obter Amostra de Tumor do Paciente
3. <u>Etapa B</u> Fragmentação e Primeira Expansão 11 Dias a 21 Dias	3. <u>Etapa B</u> Fragmentação e Primeira Expansão 3 Dias a 14 Dias
3. <u>Etapa C</u> Transição da Primeira Expansão Para Segunda Expansão Armazenamento Opcional até Seleção	4. <u>Etapa C</u> ransição da Primeira Expansão Para Segunda Expansão Nenhuma Armazenagem e Sistema Fechado
5. <u>Etapa D</u> Segunda Expansão IL2, OKT-3 E Células Alimentadoras Apresentando Antígeno Opcionalmente Repetido Uma ou Mais Vezes	5. <u>Etapa D</u> Segunda Expansão IL2, OKT-3 E Células Alimentadoras Apresentando Antígeno Sistema Fechado
6. <u>Etapa E</u> Colher TILs da Etapa D	7. <u>Etapa E</u> Colher TILs da Etapa D Sistema Fechado
6. <u>Etapa F</u> Formulação Final E/Ou Transferência Para Bolsa De Infusão	8. <u>Etapa F</u> Formulação Final E/Ou Transferência Para Bolsa De Infusão (Opcionalmente Criopreservar)

Figura 14

Etapa de Processo	Modalidade de Processo 1C	Modalidade de Processo 2A	Vantagens
Pré-REP	4 Fragmentos Por 10 Frasco GREX-10 11 a 21 Dias de Duração	40 Fragmentos Por Um Frasco GREX-100m 11 Dias de Duração	- Fragmentos de Tumor Aumentados Por Frasco - Tempo de Cultura Encurtado - Número Reduzido de Etapas - Acessível Para Sistema Fechado
Transição Pré-REP Para REP	- Os TIL Pré-REP São Congelados Até Fenotipados Para Seleção Depois Descongelados Para Prosseguir Para o REP (~30 Dias) - REP Requer > 40x10⁶ TIL	- TIL Pré-REP Diretamente Movido Para REP No Dia 11 - REP Requer 25 a 200x10⁶ TIL	- Processo de Pré-REP Para REP Encurtado - Número Reduzido de Etapas - Seleção de Fenotipagem Eliminada - Acessível a Sistema Fechado
REP	6 Frascos GREX-100m No REP Dia 0 5x10⁶ TILs e 5x10⁸ Pbmc Alimentadoras Por Frasco No REP Dia 0 - Dividir Para 18 a 36 Frascos No REP Dia 7 14 Dias de Duração	1 Frasco GREX 500m No Dia 11 25 a 200x10⁶ TILs e 5x10⁹ Pbnc Alimentadoras No Dia 11 - Dividir Para ≤ 6 frascos GREX-500m No Dia 16 11 Dias de Duração	- Número Reduzido de Etapas - Duração de REP Mais Curta - Transferência em Sistema Fechado de TIL Entre Frascos - Trocas de Meios em Sistema Fechado
Colheita	TIL Colhido Via Centrifugação	TIL Colhido Via Sistema de Lavagem de Célula ao Automatizado LOVO¹	- Número Reduzido de Etapas - Lavagem de Célula Automatizada - Sistema Fechado - Perda Reduzida de Produto Durante a Lavagem
Formulação Final	- Produto Fresco em Hypothermosol - Bolsa de Infusão Única - Estabilidade de Remessa Limitada	- Produto Criopreservado Em Plasmalyte-A + 1% de HSA e CS10 Armazenado em LN₂ - Alíquotas Múltiplas - Estabilidade de Remessa Mais Longa	- Flexibilidade de Remessa - Programação Do Paciente Flexível - Teste de Liberação Mais Oportuno
Tempo de Processo Estimado Global	43 a 55 Dias	22 Dias	Retorno Mais Rápido Para o Paciente

Figura 15

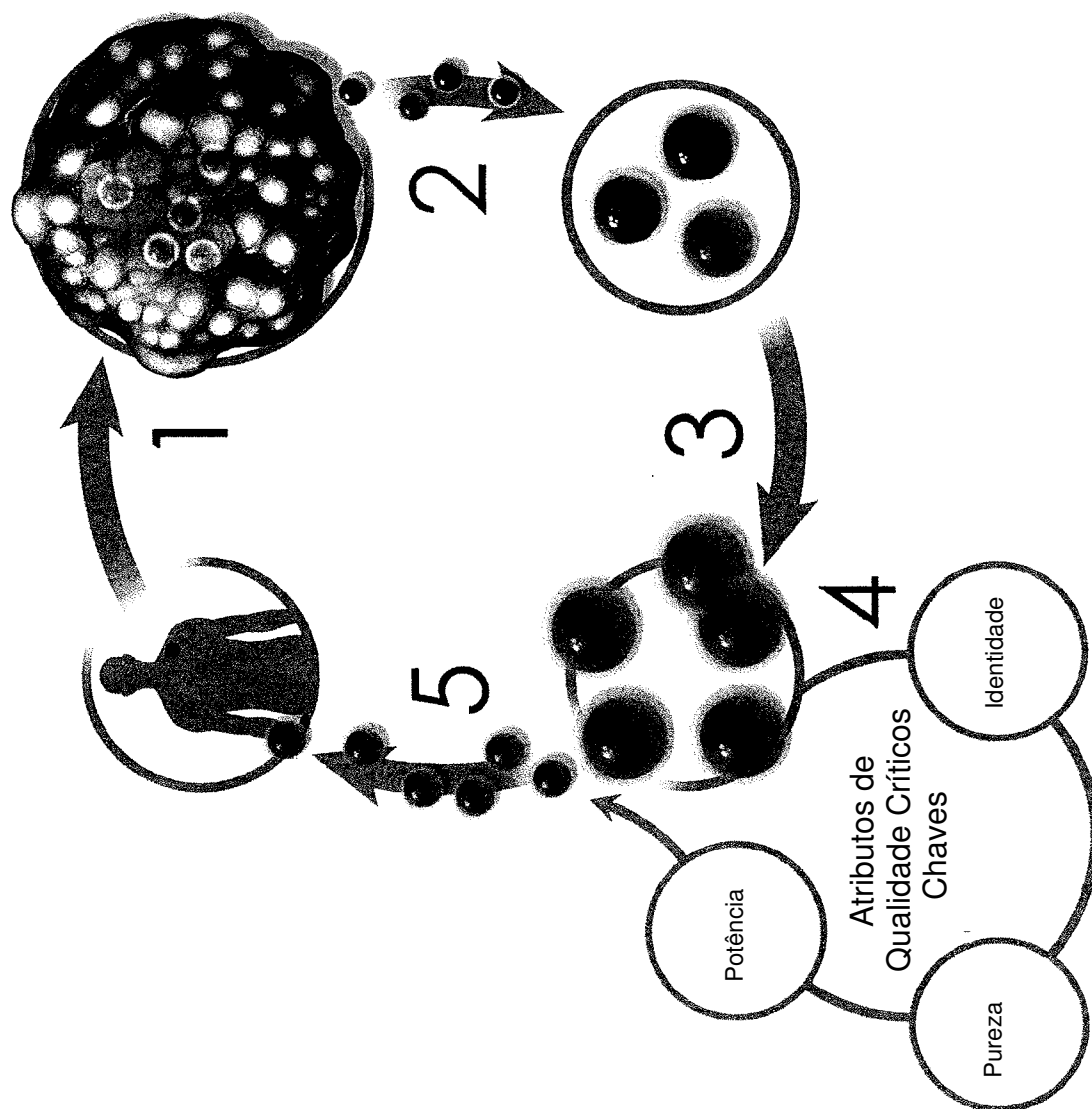


Figura 16

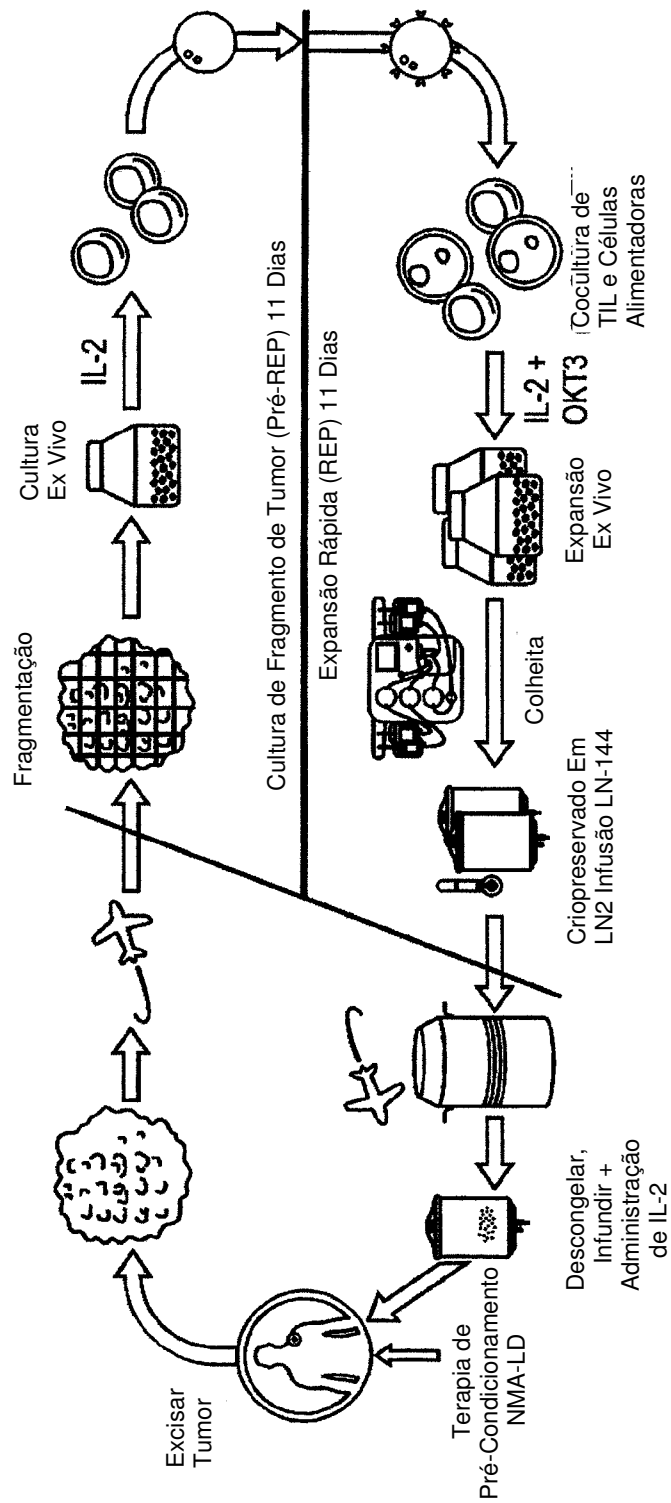
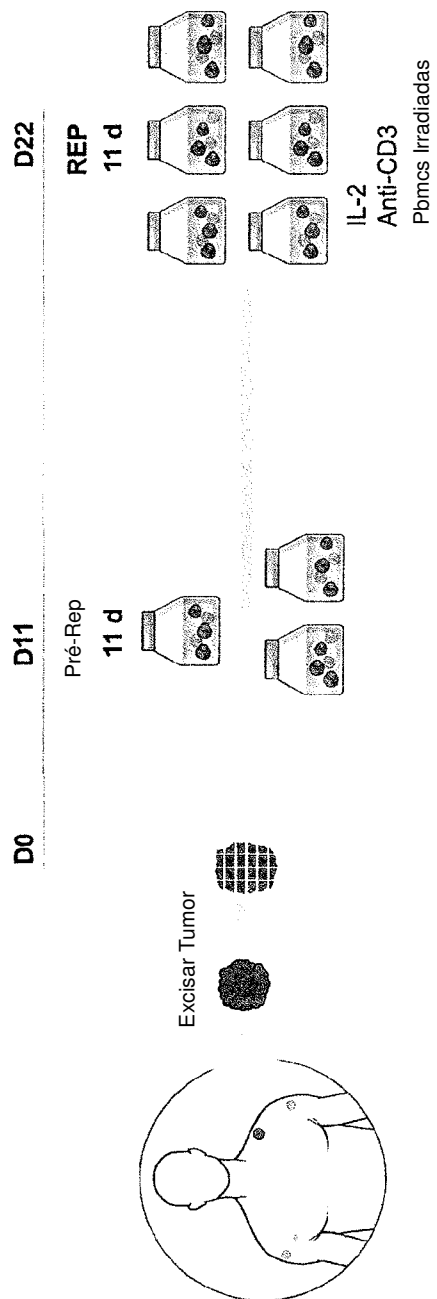


Figura 17

Etapa de Processo	GEN 1	GEN 2	IMPACTO
Cultura de Fragmento	- ≤ 21 Dias, Biorreatores Múltiplos, Múltiplas Intervenções do Operador	≤ 11 Dias, Biorreator Fechado Único, Nenhuma Intervenção	Encurta a Cultura, Reduz Intervenções
Seleção de TIL	TIL Expandido Em Il-2 Criopreservada, Testado, Seleção com Base no Fenótipo, Descongelamento, Repouso, Cocultura	TIL Volumoso Direto para Cocultura	Reduz Etapas, Elimina Teste, Aumenta a Diversidade Clonal
Colheita/ Lavagem	Redução de Volume e Colheita Manuais. Lavagem e Concentração Manuais	Redução de Volume e Colheita Semiautomatizadas Fechadas. Lavagem e Concentração Automatizadas	Reduz Intervenções do Operador, Reduz o Tempo de Processamento, Mantém Sistema Funcionalmente Fechado
Formulação	Produto Hipotérmico Fresco (2 a 8 °C)	Produto Criopreservado (≤ -150 °C)	Permite Quanto a Testes Globais Através da Flexibilidade Aumentada na Remessa e Programação do Paciente
Tempo de Fabricação	Tempo de Processo de 38 Dias	Tempo de Processo de 22 Dias	Retorno para o Paciente, Processamento em Sala Limpa, Custo Mais Baixo de Mercadorias

Figura 18



Dia 0
Isolação De Tumor

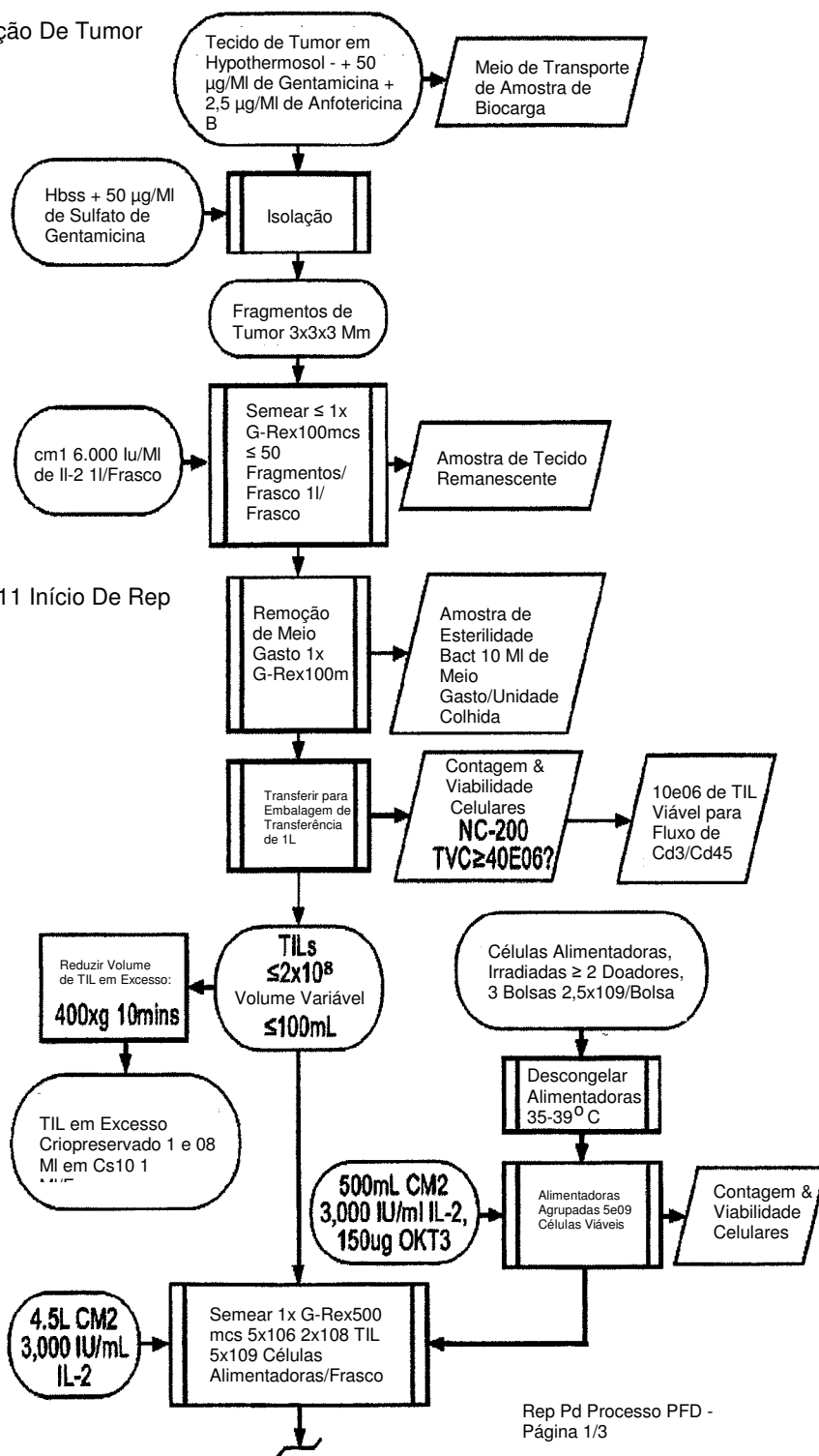
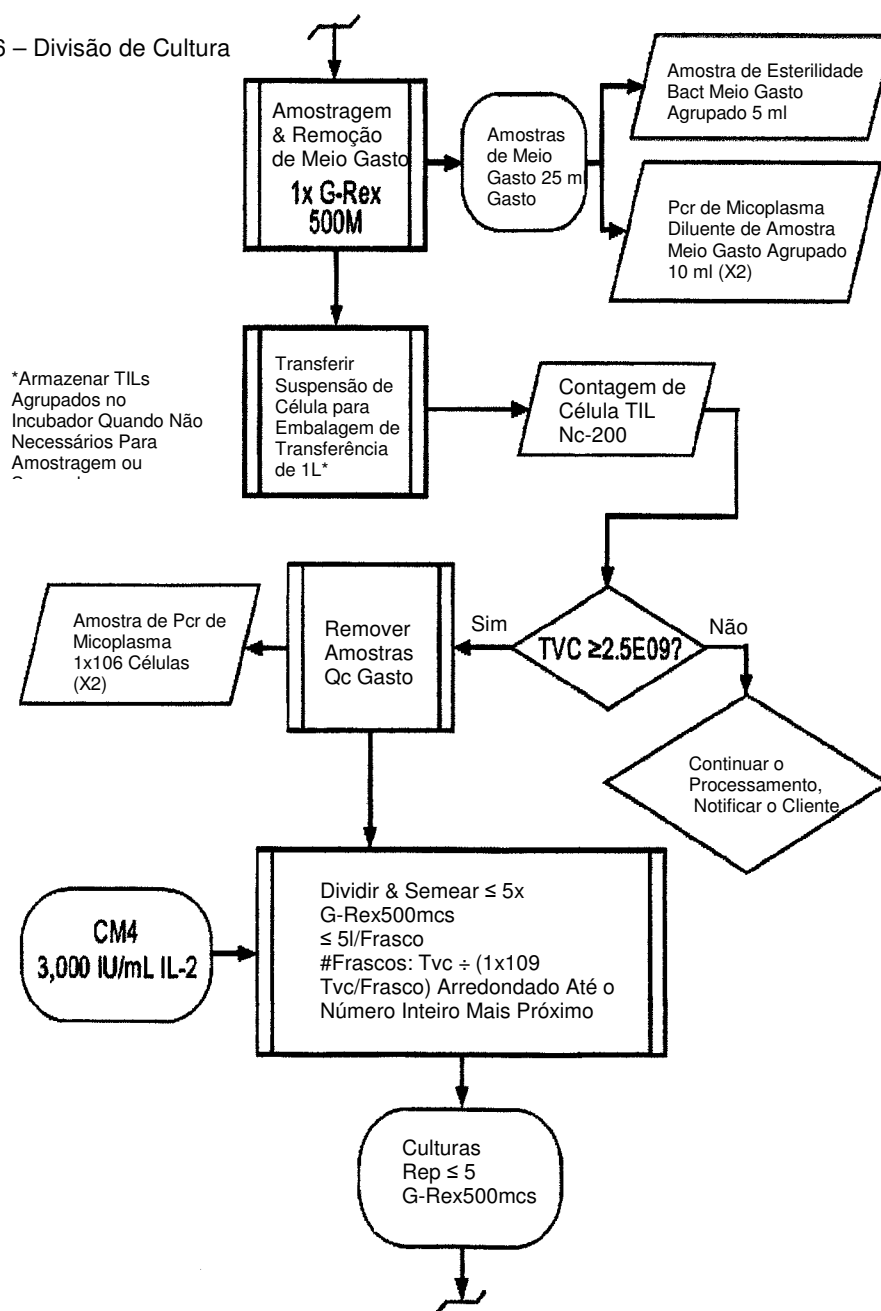


Figura 19a

Figura 19b

Dia 16 – Divisão de Cultura



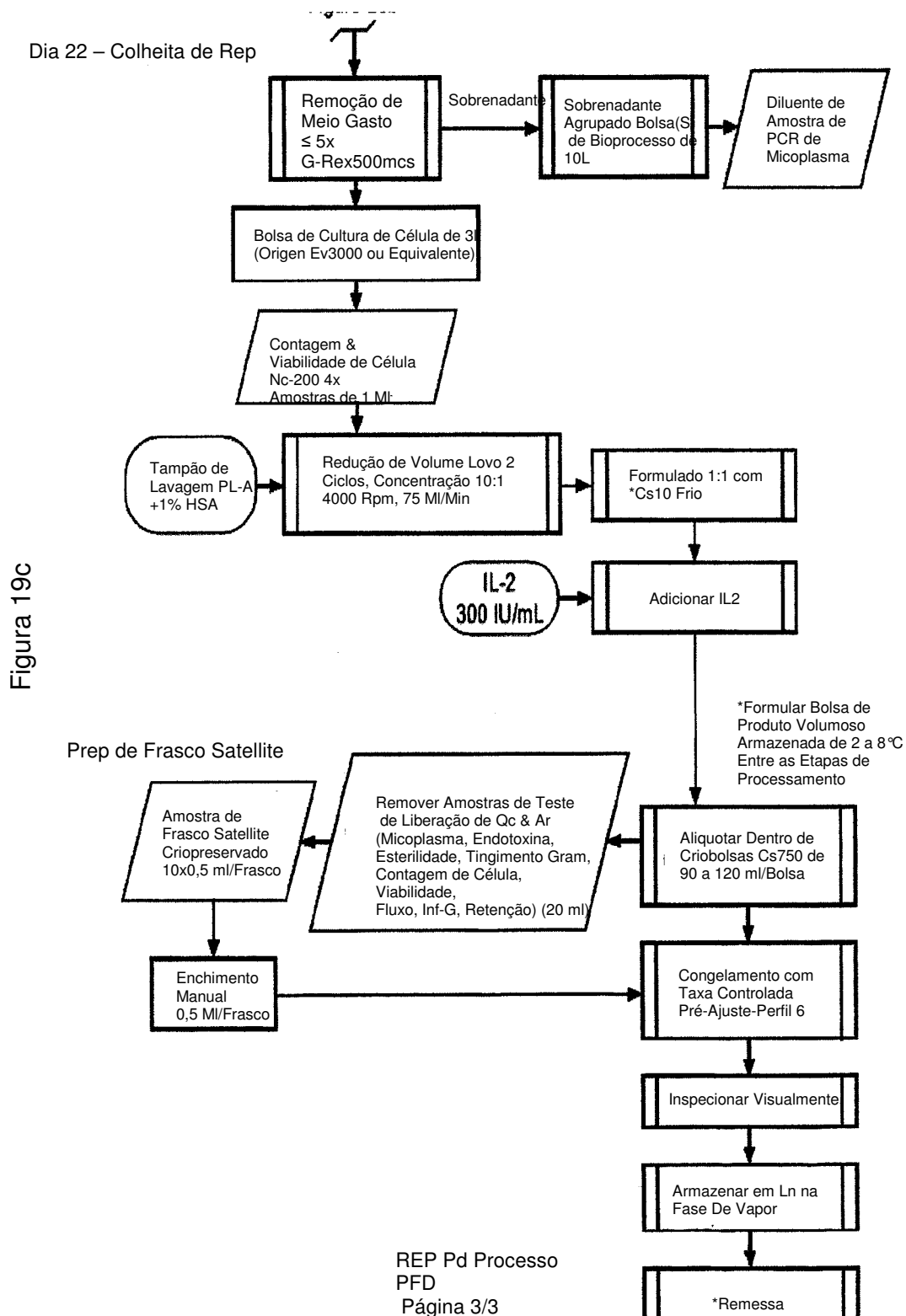


Figura 19c

Figura 20

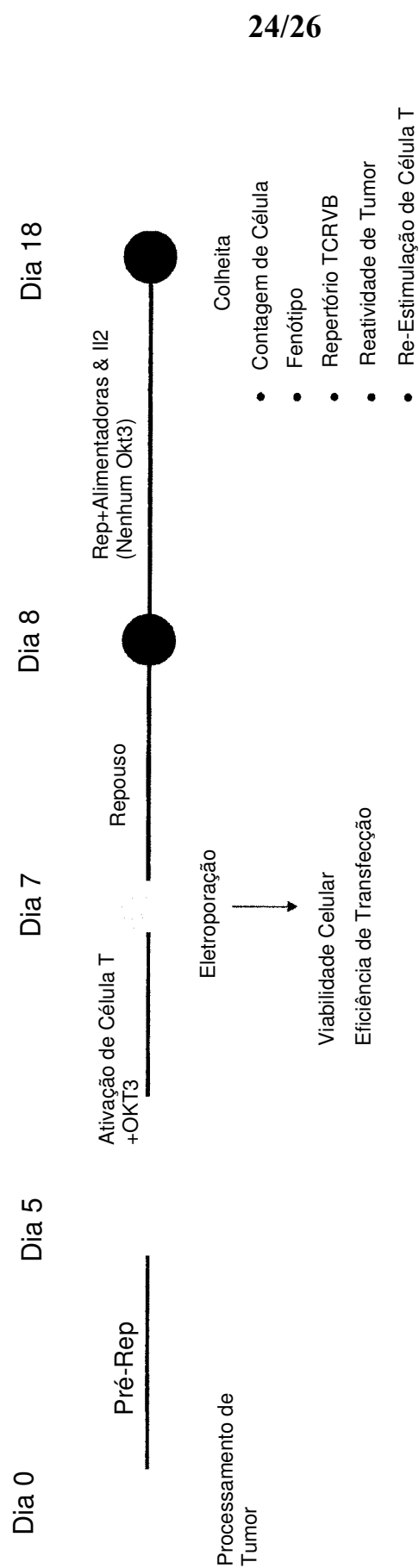
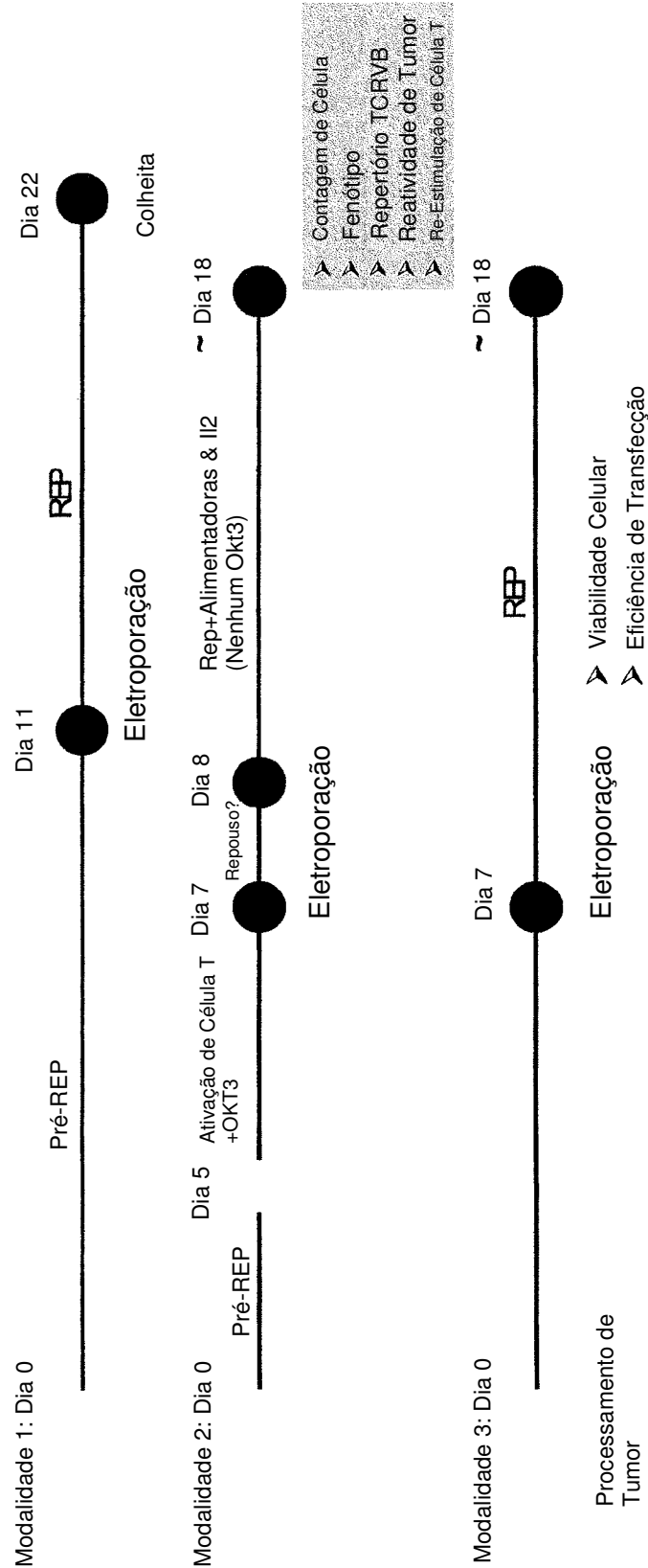


Figura 21



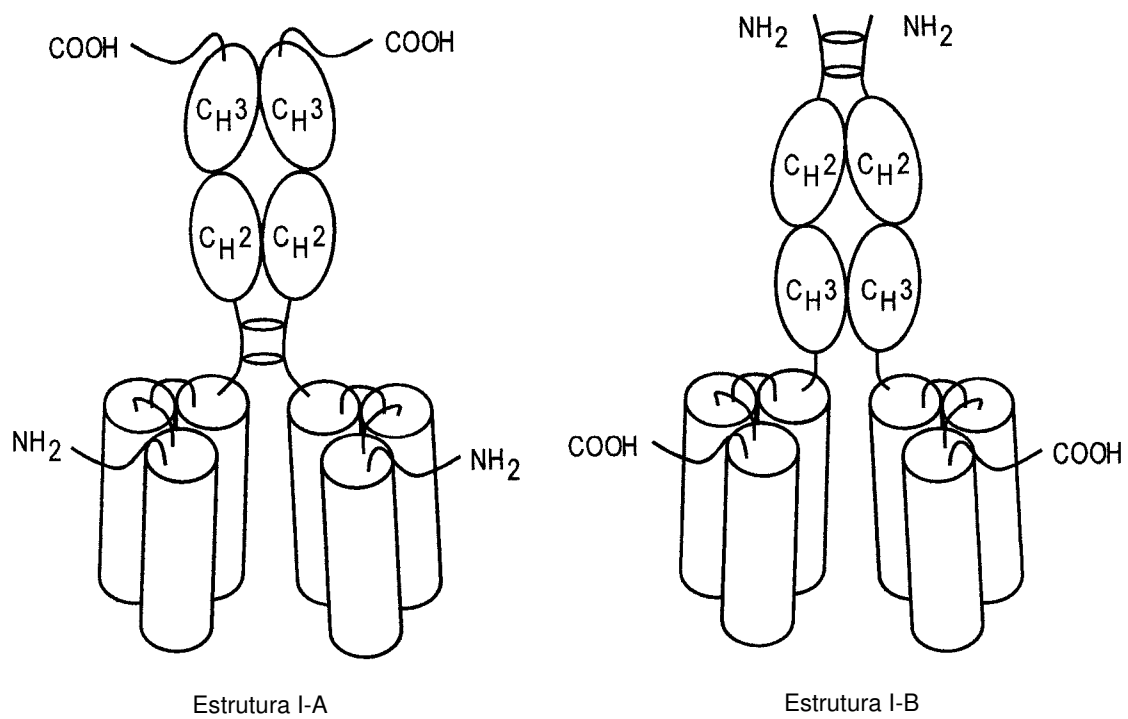


Figura 22

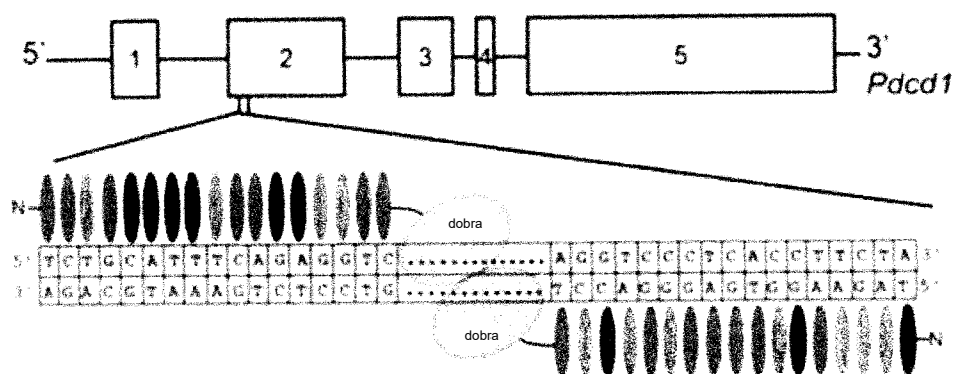


Figura 23

RESUMO

MÉTODOS PARA EXPANDIR LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR E PARA TRATAR UM INDIVÍDUO COM CÂNCER, POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR, E, COMPOSIÇÃO DE CRIOPRESERVAÇÃO

A presente invenção provê métodos melhorados e/ou encurtados para expandir TILs e produzir populações terapêuticas de TILs, incluindo novos métodos para expandir populações de TIL em um sistema fechado que leva à eficácia melhorada, fenótipo melhorado e saúde metabólica aumentada dos TILs em um período de tempo mais curto, enquanto permite contaminação microbiana reduzida assim como custos diminuídos. Os métodos podem compreender a edição de gene de pelo menos uma porção dos TILs para realçar a sua eficácia terapêutica. Tais TILs encontram uso em regimes de tratamento terapêuticos.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: SEQ LIST P142180.txt
- Data de Geração do Código: 22/10/2020
- Hora de Geração do Código: 15:22:15
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5C4DFFF8BE7D995F
 - Campo 2: 3031272EA4CEB76E