



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

(21) BR 112020011215-1 A2



(22) Data do Depósito: 07/12/2018

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

(54) Título: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS

(51) Int. Cl.: C07K 14/725; C12N 5/0783; A61K 35/17.

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2018 US 62/754,564; 03/10/2018 US 62/740,903; 03/12/2018 US 62/774,855; 08/01/2018 US 62/614,965; 08/12/2017 US 62/596,774; (...).

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

(72) Inventor(es): MIRNA MUJACIC; AYU RAHARDJO; PASCAL BEAUCHESNE; KIEN KHUU-DUONG; IVIE AIFUWA; CALVIN CHAN.

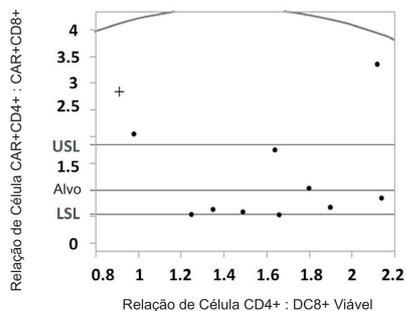
(86) Pedido PCT: PCT US2018064628 de 07/12/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/113557 de 13/06/2019

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

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos para geneticamente modificar células T, tais como células T CD4+ e/ou células T CD8+, para uso em terapia celular. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos incluem uma ou mais etapas para agrupamento de células CD4+ e CD8+, tal como em uma relação de 1:1, e em seguida incubação das células sob condições de estimulação, introdução de um polinucleotídeo recombinante nas células por meio de transdução ou transfecção, e/ou cultivo das células sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos são um meio eficiente, confiável para produzir células T geneticamente modificadas com um alto grau de sucesso.

FIG. 1A



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS"**.

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido Provisional Norte-americano 62/596.774, depositado em 8 de dezembro de 2017, intitulado "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS," Pedido Provisional Norte-americano No. 62/716.971, depositado em 9 de agosto de 2018, intitulado "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS," Pedido Provisional Norte-americano No. 62/721.604, depositado em 22 de agosto de 2018, intitulado "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS"; o Pedido provisional Norte-americano No. 62/740.903, depositado em 3 de outubro de 2018, intitulado "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS"; Pedido Provisional Norte-americano No. 62.754.564, depositado em 1 de novembro de 2018, intitulado "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS"; Pedido Provisional Norte-americano No. 62/774.165, depositado em 30 de novembro de 2018, intitulado "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS"; e Pedido Provisional Norte-americano No. 62.774.855, depositado em 3 de dezembro de 2018, intitulado "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS" o teor dos quais é aqui incorporado por referência em sua íntegra para todos os propósitos.

Incorporação por Referência de Listagem de Sequência

[002] O presente pedido está sendo depositado juntamente com uma Listagem de Sequência em formato eletrônico. A Listagem de

Sequências é fornecidas como um arquivo intitulado 735042014340SeqList.txt, criado em 07 de dezembro de 2018 que é de 68 *kilobytes* de tamanho. A informação no formato eletrônico da Listagem de Sequências é incorporada por referência em sua íntegra.

Campo

[003] A presente invenção fornece métodos para geneticamente modificar células T, tais como células T CD4+ e/ou células T CD8+, para uso em terapia celular. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos incluem uma ou mais etapas para agrupamento de células T CD4+ e/ou células T CD8+, enriquecidas, tal como em uma relação de 1:1, e em seguida incubação das células sob condições de estimulação, introdução de um polipeptídeo recombinante às células por meio de transdução ou transfecção, e/ou cultivo das células sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos são um meio eficiente, confiável para produzir células T geneticamente modificadas com um alto grau de sucesso.

Antecedente

[004] Vários métodos de terapia celular estão disponíveis para o tratamento de doenças e condições. Entre os métodos de terapia celular estão métodos envolvendo células imunes, tais como células T, geneticamente modificadas com um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno quimérico. Métodos melhorados para fabricação e/ou modificação de tais terapias celulares são necessários, incluindo fornecer um processo mais eficiente e/ou um produto de composição celular melhorado.

Sumário

[005] Em algumas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo: (a) combinar uma composição de células T CD4+ e uma composição de células T CD8+ em uma relação entre 2:1 e 1:2

de células T CD4+ para CD8+, desse modo gerando uma composição de entrada; (b) incubar a composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada; em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias; e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL.

[006] Em algumas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que: a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e as condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias.

[007] Em algumas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreende introduzir um receptor recombinante em células de uma composição de célula T, a referida composição de célula T compreendendo uma concentração de pelo menos ou pelo menos cerca de 1×10^6 células viáveis por mL, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% das células da com-

posição celular T são células T CD4+ ou células T CD8+.

[008] Em certas concretizações, a incubação é realizada em meio livre de soro. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células que são células T CD4+ ou células T CD8+. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende entre 100×10^6 e 500×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende a, ou cerca de 300×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais. Em certas concretizações, o total de células T CD4+ e CD8+ são células viáveis. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende uma concentração entre 1×10^6 células/mL e 5×10^6 células/mL. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende uma concentração de, ou de cerca de 3×10^6 células/mL. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende uma relação entre 1,5:1 e 1:1,5 células CD4+ para CD8+. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende uma relação entre 1,2:1 e 0,8:1 células CD4+ para CD8+.

[009] Em certas concretizações, a composição de entrada compreende uma relação de, ou de cerca de 1:1 células CD4+ para CD8+. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD45RA e CCR7.

[0010] Em certas concretizações, a relação de células CD4+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 é de, ou é de, ou de cerca de 1.1:1.

[0011] Em certas concretizações, a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7.

[0012] Em certas concretizações, a relação das células CD4+ que

são de superfície positiva para CD27 e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD27 e CCR7 é de, ou é de, ou de cerca de 1.69:1.

[0013] Em certas concretizações, a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CCR7 e superfície negativa para CD62L, opcionalmente em uma relação entre 2,0:1 a 1,5:1.

[0014] Algumas concretizações também compreendem: introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Algumas concretizações também compreendem introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Em algumas concretizações, a introdução é realizada em meio livre de soro.

[0015] Em concretizações particulares, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo: (a) combinar uma composição de células T CD4+ e uma composição de células T CD8+ em uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, desse modo gerando uma composição de entrada; (b) incubar a composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada; em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intra-

celular de uma ou mais moléculas coestimulatórias; e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL.

[0016] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as células CD4+ e CD8+ na composição de entrada são enriquecidas ou selecionadas de uma amostra primária de um indivíduo, opcionalmente em que as células CD4+ e CD8+ na composição de entrada são separadamente enriquecidas ou selecionadas de uma amostra primária de um indivíduo. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de células T CD4+ compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células T CD4+. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de células T CD8+ compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% células T CD8+.

[0017] Em algumas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que: a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e as condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias.

[0018] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a incubação é realizada em meio livre de soro. Em concreti-

zações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células que são células T CD4+ ou células T CD8+. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende entre 100×10^6 e 500×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende a, ou cerca de 300×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais.

[0019] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o total de células T CD4+ e CD8+ são células viáveis. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende uma concentração entre 1×10^6 células/mL e 5×10^6 células/mL. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende uma concentração de, ou de cerca de 3×10^6 células/mL. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende uma relação entre 1,5:1 e 1:1,5 células CD4+ para CD8+. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende uma relação entre 1,2:1 e 0,8:1 células CD4+ para CD8+.

[0020] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende uma relação de, ou de cerca de 1:1 células CD4+ para CD8+. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD45RA e CCR7. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação de células CD4+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 é de, ou é de, ou de cerca de 1.1:1. Em certas con-

cretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação das células CD4+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD27 e CCR7 é de, ou é de, ou de cerca de 1.69:1. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CCR7 e superfície negativa para CD62L, opcionalmente em uma relação entre 2,0:1 a 1,5:1.

[0021] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, os métodos também compreendem: introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[0022] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos: o contato é por transfecção com um vetor, em que o vetor é um transposon, opcionalmente um transposon *Sleeping Beauty* (SB) ou um transposon *Piggybac*; ou o contato é por transdução com um vetor viral.

[0023] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos também compreendem: introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução é realizada em meio livre de soro.

[0024] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução da composição estimulada compreende menos que 300×10^6 células. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende entre 50×10^6 células e 200×10^6 células. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende a, ou cerca de 100×10^6 células. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração menor que 3×10^6 células/mL. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração entre $0,5 \times 10^6$ células/mL e 2×10^6 células/mL. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração de, ou de cerca de 1×10^6 células/mL.

[0025] Concretizações particulares, de qualquer um dos métodos fornecidos, compreendem ajustar a composição da composição estimulada após incubação sob condições de estimulação antes de introduzir o receptor recombinante nas células da composição estimulada. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as células da composição estimulada são células viáveis. Em certas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreende introduzir um receptor recombinante em células de uma composição de célula T, a referida composição de célula T compreendendo uma concentração de pelo menos ou pelo menos cerca de 1×10^6 células viáveis por mL, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% das células da composição celular T são células T CD4+ ou células T CD8+.

[0026] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a concentração da composição de célula T é menor que 5×10^6 células viáveis por mL. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de célula T compreende pelo menos ou pelo menos cerca de ou cerca de 100×10^6 células viáveis. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de célula T compreende menos que 300×10^6 células viáveis. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução compreende contatar as células T por transdução de um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[0027] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução é realizada em meio livre de soro. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, uma ou mais células da composição celular T são ativadas e/ou compreendem expressão de superfície do receptor LDL.

[0028] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% das células da composição celular: (i) expressam um marcador de superfície selecionado do grupo que consiste em HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L e 4-1BB; (ii) compreendem expressão intracelular de uma citocina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IFN-gama, TNF-alfa; (iii) estão na fase G1 ou posterior do ciclo celular; e/ou (iv) são capazes de se proliferarem.

[0029] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, antes da introdução, as células da composição foram geradas por um processo compreendendo incubar uma composição de entrada compreendendo células T CD4+ e CD8+ sob condições de estimulação, em que as referidas condições de estimulação compre-

endem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a incubação foi realizada em meio livre de soro.

[0030] Em concretizações particulares, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo: (a) incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que: a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+ e compreende pelo menos 100×10^6 células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e as condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias; e (b) introduzir um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[0031] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a incubação e/ou a introdução é realizada em meio livre de soro. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as células T CD4+ e CD8+ são células viáveis. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as células da composição estimulada são células viáveis.

[0032] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos

fornecidos, a introdução é iniciada dentro de 2 dias após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 2 dias após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução é iniciada dentro de 36 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 36 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução é iniciada dentro de 30 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 30 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[0033] Algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos também compreendem o cultivo da composição modificada sob condições que promovam proliferação e/ou expansão das células modificadas, desse modo produzindo uma composição de saída compreendendo as células T modificadas. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o cultivo é realizado em meio livre de soro.

[0034] Em concretizações particulares, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo: (a) incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada; em que a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo

de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias; (b) introduzir um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante; e (c) cultivar a composição modificada sob condições para promover a proliferação e/ou expansão das células modificadas, desse modo produzindo uma composição de saída compreendendo as células T modificadas.

[0035] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a incubação, introdução, e/ou cultivo são realizados em meio livre de soro.

[0036] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende uma relação entre 1,5:1 e 1:1,5 células CD4+ para CD8+, entre 1,2:1 e 0,8:1 células CD4+ para CD8+, opcionalmente a, ou cerca de 1:1 de células T CD4+ para CD8+. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, em que a composição de entrada compreende CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD45RA e CCR7. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação de células CD4+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 é de, ou é de, ou de cerca de 1.1:1. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação das células CD4+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD27 e CCR7 é de, ou é de, ou de cerca de 1.69:1. Em algumas concretiza-

ções de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CCR7 e superfície negativa para CD62L.

[0037] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução da composição estimulada compreende menos que 300×10^6 células. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende entre 50×10^6 células e 200×10^6 células, opcionalmente a, ou cerca de 100×10^6 células. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração menor que 3×10^6 células/mL. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração entre $0,5 \times 10^6$ células/mL e 2×10^6 células/mL, opcionalmente a, ou cerca de 1×10^6 células/mL. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, compreende ajustar uma composição da composição estimulada após incubação sob condições de estimulação antes de introduzir o receptor recombinante nas células da composição estimulada.

[0038] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a incubação é realizada na presença de uma ou mais citocinas, por exemplo, em um meio livre de soro. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas com-

preendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[0039] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% das células da composição estimulada: (i) expressam um marcador de superfície selecionado do grupo que consiste em HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L e 4-1BB; (ii) compreendem expressão intracelular de uma citocina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IFN-gama, TNF-alfa; (iii) estão na fase G1 ou posterior do ciclo celular; e/ou (iv) são capazes de se proliferarem.

[0040] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o reagente estimulatório compreende um agente primário que especificamente se liga a um membro de um complexo TCR, opcionalmente que especificamente se liga a CD3. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o reagente estimulatório também compreende a agente secundário que especificamente se liga a uma molécula coestimulatória de célula T, opcionalmente em que a molécula coestimulatória é selecionada de CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, ou ICOS. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, os agentes primários e/ou secundários compreendem um anticorpo, opcionalmente em que o reagente estimulatório compreende incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0041] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente primário e/ou agente secundário estão presentes sobre a superfície de um suporte sólido. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o suporte sólido é ou

compreende uma conta. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta compreende um diâmetro maior que, ou maior do que cerca de 3,5 μm mas não mais do que cerca de 9 μm ou não mais do que cerca de 8 μm ou não mais do que cerca de 7 μm ou não mais do que cerca de 6 μm ou não mais do que cerca de 5 μm . Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta compreende um diâmetro de ou cerca de 4,5 μm . Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta é inerte. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta é ou compreende uma superfície de poliestireno. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta é magnética ou superparamagnética.

[0042] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação de contas para células é menor que 3:1. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação de contas para células é de, ou de cerca de 2:1 a 0,5:1. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação de contas para células é de, ou de cerca de 1:1.

[0043] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante menos que 48 horas. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante entre 12 e 36 horas, inclusive. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante entre 18 e 30 horas, inclusive. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante, ou durante cerca de, 24 horas.

[0044] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos for-

recidos, o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante menos que 48 horas. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o contato, opcionalmente transdução, é realizado entre 12 e 36 horas, inclusive. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante entre 18 e 30 horas, inclusive. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante, ou durante cerca de, 24 horas.

[0045] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o vetor viral é um vetor retroviral. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o vetor viral é um vetor lentiviral ou vetor gamarretroviral. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o contato, opcionalmente transdução, é realizado na ausência de um adjuvante de transdução. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução é realizada na presença de uma ou mais citocinas, por exemplo, em um meio livre de soro. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante.

[0046] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[0047] Em concretizações particulares de qualquer um dos méto-

dos fornecidos, pelo menos uma parte do cultivo é realizada com mistura e/ou perfusão. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, pelo menos uma parte do cultivo é realizada com perfusão em uma taxa de, de cerca de, ou de pelo menos 500 mL/dia, 600 mL/dia, 700 mL/dia, 750 mL/dia, 800 mL/dia, 900 mL/dia, 1.000 mL/dia, 1.200 mL/dia, 1.400 mL/dia, 1.500 mL/dia, 1.600 mL/dia, 1.800 mL/dia, e/ou 2.000 mL/dia. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, pelo menos uma primeira parte do cultivo é realizada com uma taxa de perfusão de, de cerca de, ou de pelo menos 500 mL/dia, 750 mL/dia, ou 1.000 mL/dia, e em que pelo menos uma segunda parte do cultivo é realizada com uma taxa de perfusão de, de cerca de, ou de pelo menos 1.200 mL/dia, 1.400 mL/dia, ou 1.500 mL/dia.

[0048] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a perfusão é iniciada e/ou aumentada quando as células atingem uma densidade específica. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a densidade específica é de, é de cerca de, ou é de pelo menos $0,4 \times 10^6$ células, $0,5 \times 10^6$ células, $0,6 \times 10^6$ células, $0,8 \times 10^6$ células, $1,0 \times 10^6$ células, $1,2 \times 10^6$ células, $1,4 \times 10^6$ células, $1,6 \times 10^6$ células, $1,8 \times 10^6$ células, $2,0 \times 10^6$ células, $2,2 \times 10^6$ células, ou $2,4 \times 10^6$ células. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a perfusão é iniciada e/ou aumentada para uma taxa de, ou de cerca de 750 mL/dia quando as células atingem uma densidade de, ou de cerca de $0,6 \times 10^6$ células/mL. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a perfusão é iniciada e/ou aumentada para uma taxa de, ou de cerca de 1500 mL/dia quando as células atingem uma densidade de, ou de cerca de $2,0 \times 10^6$ células/mL.

[0049] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas,

por exemplo, em um meio livre de soro. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 50 e 400 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 2,000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 50 e 400 IU/mL de IL-15 recombinante. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o cultivo é realizado na presença de entre 50 e 400 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 2,000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 50 e 400 IU/mL de IL-15 recombinante, por exemplo, em um meio livre de soro. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 50 e 400 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[0050] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, em que o cultivo é iniciado dentro de 3 dias após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 3 dias após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, em que o cultivo é iniciado dentro de 60 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 60 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, em que o cultivo é iniciado dentro de 48 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 48 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[0051] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos

fornecidos, em que o cultivo é realizado pelo menos até a composição compreender um número limítrofe de células T. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 2.400×10^6 células. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 5500×10^6 células.

[0052] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o cultivo é continuado durante pelo menos um dia após o número limítrofe de células T ser atingido. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 900×10^6 células. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 1200×10^6 células. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o cultivo termina quando o número de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 2.400×10^6 células. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 3500×10^6 células. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o cultivo termina quando o número de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 5500×10^6 células.

[0053] Certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, compreendem coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo. Algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos compreendem coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo, em que as células da composição de saída são coletadas pelo menos 9 dias após o início da incubação sob condições de estimulação. Certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos compreendem coletar células da composição de saí-

da subsequente ao cultivo, em que as células da composição de saída são coletadas pelo menos 10 dias após o início da incubação sob condições de estimulação.

[0054] Concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos compreendem um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída que é dentro de 8 dias a 25 dias. Certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos compreendem um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída que é dentro de 9 dias a 21 dias. Algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos compreendem um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída que é dentro de 9 dias a 16 dias.

[0055] Concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos também compreendem a formulação de células da composição de saída para crioconservação e/ou administração a um indivíduo, opcionalmente na presença de um excipiente farmacologicamente aceitável. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, as células da composição de saída são formuladas na presença de um crioprotetor. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o crioprotetor compreende DMSO. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as células da composição de saída são formuladas em um recipiente, opcionalmente um frascote ou uma bolsa.

[0056] Certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos compreendem o isolamento de células T CD4+ e/ou CD8+ da amostra biológica antes da incubação. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o isolamento compreende, selecionar células com base na expressão de superfície de CD4 e/ou CD8,

opcionalmente por seleção positiva ou negativa. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o isolamento compreende realizar a seleção com base na imunoafinidade. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a amostra biológica compreende células T primárias obtidas de um indivíduo. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o indivíduo é um indivíduo humano.

[0057] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a amostra biológica é ou compreende uma amostra de sangue total, uma amostra da camada leucocitária, uma amostra de célula mononuclear de sangue periférico (PBMC), uma amostra de célula T não fracionada, uma amostra de linfócito, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aferese, ou um produto de leucaferese. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor recombinante é capaz de ligação a um antígeno alvo que é associado com, específico para, e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória, ou um tumor ou um câncer.

[0058] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o antígeno alvo é um antígeno de tumor. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o antígeno alvo é selecionado dentre 5T4, 8H9, integrinas avb6, B7-H6, antígeno de maturação de célula B (BCMA), CA9, um antígeno de testículos de câncer, anidrase carbônica 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superfície de hepatite B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, antígeno carcinoembriônico (CEA), CE7, uma ciclina, ciclina A2, c-Met, antígeno dual, EGFR, glicoproteína 2 epitelial (EPG-2), glicoproteína 40 epitelial

(EPG-40), EPHa2, efrina B2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR VIII, receptor de estrogênio, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína de ligação a folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, Her2/neu (tirosina cinase receptora erbB2), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve *kappa*, Lewis Y, Molécula de adesão de célula L1 (L1-CAM), Antígeno associado ao melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV murino, mucina 1 (MUC1), ligantes MUC16, NCAM, NKG2D, NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferivelmente expresso de melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, receptores VEGF, VEGF-R2, Tumor 1 de Wilms (WT-1), um antígeno específico de patógeno e um antígeno associado com um marcador universal.

[0059] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0060] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor recombinante é um CAR anti-BCMA. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor de antígeno quimérico compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação ao antígeno. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o domínio de ligação ao antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo

unidas por um ligante flexível. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o fragmento compreende um scFv. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor de antígeno quimérico também compreende um espaçador e/ou uma região de articulação.

[0061] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor de antígeno quimérico compreende uma região de sinalização intracelular. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente de receptor de célula T (TCR), e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motif de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM). Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ), ou uma porção de sinalização da mesma.

[0062] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor de antígeno quimérico também compreende um domínio de membrana disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização intracelular também compreende uma região de sinalização coestimulatória. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou

uma porção de sinalização da mesma. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma CD28, uma 4-1BB ou uma ICOS ou uma porção de sinalização da mesma.

[0063] Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização coestimulatória está entre o domínio de transmembrana e a região de sinalização intracelular. Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de saída compreendendo o número limítrofe ou número maior de células é produzido entre mais que ou mais que cerca de 85%, mais que ou mais que cerca de 90% ou mais que ou mais que cerca de 95% das iterações do método.

[0064] Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, o meio livre de soro compreende: 0,5 mM a 5 mM de uma forma dipeptídica de L-glutamina em um meio de base; 0,5 mM a 5 mM L-glutamina; e pelo menos uma proteína, em que o meio é livre de soro. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a forma dipeptídica de L-glutamina é L-alanil-L-glutamina.

[0065] Em certas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a concentração da forma dipeptídica de L-glutamina no meio livre de soro é de, ou é de, ou de cerca de 2 mM. Em algumas concretizações de qualquer um dos métodos fornecidos, a concentração de L-glutamina no meio livre de soro é de, ou é de, ou de cerca de 2 mM. Em concretizações particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a referida pelo menos uma proteína compreende uma ou mais de albumina, insulina ou transferrina, opcionalmente uma ou mais de uma albumina, insulina ou transferrina humana ou recombinante.

[0066] Em algumas de qualquer uma das concretizações dos métodos fornecidos aqui, durante pelo menos uma parte do cultivo, as

células são monitoradas quanto à viabilidade celular, concentração, densidade, número, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas de quaisquer tais concretizações, o monitoramento é realizado por um método óptico, opcionalmente microscopias. Em algumas de quaisquer tais concretizações, o monitoramento é realizado por microscopias de campo brilhante, microscopia por fluorescência, microscopias por contraste de interferência diferencial, microscopias de contraste de fase, microscopias por holografia digital (DHM), microscopias por holografia digital diferencial (DDHM), ou uma combinação dos mesmos. Em algumas de quaisquer tais concretizações, o monitoramento é realizado por microscopias por holografia digital diferencial (DDHM). Em algumas de quaisquer tais concretizações, o monitoramento é realizado intermitentemente ou continuamente durante a referida pelo menos uma parte do cultivo, opcionalmente é realizada pelo menos a cada 1 hora, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, ou 26 horas durante o cultivo. Em algumas de quaisquer tais concretizações, o monitoramento é realizado até as células atingirem o número limítrofe de células T, o número limítrofe de células T viáveis, a concentração limítrofe de células T ou a concentração limítrofe de células T viáveis. Em algumas de quaisquer tais concretizações, a monitoramento e cultivo são realizados em um sistema fechado.

[0067] Em algumas de qualquer uma das concretizações dos métodos fornecidos aqui, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são de um fenótipo de memória; em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são de um fenótipo

de memória central; em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+; e/ou em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CCR7+/CD45RA- ou são CCR7+/CD45RO+.

[0068] Em algumas de qualquer uma das concretizações dos métodos fornecidos aqui, iterações do método produzem uma pluralidade das composições de saída, opcionalmente de amostras biológicas humanas em que o método é realizado entre uma pluralidade de diferentes pacientes individuais, em que: a percentagem média de células de um fenótipo de memória na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%; a percentagem média de células de um fenótipo de memória central na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%; a percentagem média de células que são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+ na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de

65%; a percentagem média de células que são CCR7+/CD45RA- or CCR7+/CD45RO+ na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%; a percentagem média de células T CD4+ de memória central nas células T CD4+ modificadas, opcionalmente CAR+CD4+ T células, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%; a percentagem média de células T CD8+ de memória central nas células T CD8+ modificadas, opcionalmente CAR+CD8+ T células, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%; e/ou a percentagem média de células T de memória central, opcionalmente células T de memória central CD4+ e células T de memória central CD8+, nas células T modificadas, opcionalmente CAR+ T células, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%.

[0069] Em algumas de qualquer uma das concretizações dos métodos fornecidos aqui, o método produz composições de saída exibindo uma característica predeterminada, opcionalmente um número limítrofe de células expressando o CAR na composição de saída, em pelo menos cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 99%, cerca de 100%, ou 100% das amostras biológicas hu-

manas em que é realizada entre uma pluralidade de diferentes pacientes individuais. Em algumas de quaisquer tais concretizações, vários diferentes pacientes individuais compreendem indivíduos tendo uma doença ou condição. Em algumas de quaisquer tais concretizações, a doença ou condição é um câncer. Em algumas de quaisquer tais concretizações, o câncer é um câncer hematológico, opcionalmente mieloma múltiplo. Em algumas de quaisquer tais concretizações, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são de um fenótipo de memória; em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são de um fenótipo de memória central; em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, granzima B-, e/ou CD127+; e/ou em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CCR7+/CD45RA- ou são CCR7+/CD45RO+.

[0070] Em certas concretizações, é fornecida aqui uma composição compreendendo células modificadas produzidas por qualquer dos métodos aqui fornecidos. Algumas concretizações de qualquer uma das composições fornecidas compreendem um carreador farmacêuticamente aceitável. Concretizações particulares de qualquer uma das composições fornecidas compreendem um crioprotetor, opcionalmente

DMSO.

[0071] Em certas concretizações, é fornecido aqui um artigo de fabricação, compreendendo qualquer composição fornecida aqui e instruções para a administração da composição de saída a um indivíduo. Em certas concretizações de qualquer dos artigos fornecidos de fabricação, o indivíduo tem uma doença ou condição, opcionalmente em que o receptor recombinante especificamente reconhece ou especificamente se liga a um antígeno associado com, ou expresso ou presente em células da doença ou condição.

Breve Descrição dos Desenhos

[0072] **FIG. 1A** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de células CD4+ viáveis para células CD8+ viáveis (relação de CD4+/CD8+ viável) em uma amostra de aferese em comparação com a relação de células T CAR+CD4+ para células T CAR+C8+ (relação de CAR+ CD4+/CD8+) em uma composição de célula T após ativação, transdução de célula T com uma construção e expansão do receptor de antígeno quimérico (CAR). As linhas curvas representam os limites da elipse normal bivariada em $p = 0,990$. Os pontos de dados representam as relações médias de quatro amostras de cada indivíduo, incluindo indivíduos saudáveis (círculos) e um indivíduo com mieloma (sinal positivo). **FIG. 1B** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T após ativação, transdução de célula T com uma construção e expansão do receptor de antígeno quimérico (CAR). As linhas curvas representam os limites da elipse normal bivariada em $p = 0,990$. Os pontos de dados representam as relações médias de quatro amostras de cada indivíduo, incluindo indivíduos saudáveis (círculos) e um indivíduo com mieloma (sinal positivo).

[0073] **FIGS. 2A-2C** mostram gráficos de análise de ajuste bivariado da relação das diferentes células de fenótipos em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T CAR+ modificada. **FIG. 2A** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de células CD45RA+/CCR7+/CD4+ para CD45RA+/CCR7+/CD8+ em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T CAR+ modificada. **FIG. 2B** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+ em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T CAR+ modificada. **FIG. 2C** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+ em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T CAR+ modificada. As linhas curvas representam os limites da elipse normal bivariada em $p = 0,950$. Os pontos de dados representam as relações médias de múltiplas composições de cada indivíduo, incluindo doadores saudáveis (círculos) e um paciente com mieloma múltiplo (sinais positivos).

[0074] **FIGS. 3A-3C** mostram gráficos de análise de ajuste bivariado da relação das diferentes células de fenótipos em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas de sete pacientes com mieloma múltiplo em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ na composição de célula T CAR+ modificada gerada. **FIG. 3A** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de células CD27+/CCR7+/CD4+ para CD27+/CCR7+/CD8+ em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a

relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T CAR+ modificada. **FIG. 3B** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+ em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T CAR+ modificada. **FIG. 3C** mostra um gráfico de análise de ajuste bivariado da relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+ em uma mistura de partida de células CD4 e CD8 selecionadas em comparação com a relação de CAR+ CD4+/CD8+ em uma composição de célula T CAR+ modificada. As linhas curvas representam os limites da elipse normal bivariada em $p = 0,950$.

[0075] **FIGS. 4A e 4B** representam a contagem de célula viável (VCC; $\times 10^6$ células/mL) e viabilidade celular (%), avaliada usando monitoramento contínuo por DHM diferencial (linha "contínua") ou amostragem manual (pontos "manuais"), no Ciclo 1 experimental (**FIG. 4A**) e Ciclo 2 (**FIG. 4B**). Os painéis de topo representam as medições para cada, os painéis de base representam análise de regressão linear e o R^2 e inclinação(s), para comparar a monitoramento contínuo e amostragem manual.

[0076] **FIG. 5** representa a contagem de célula viável (VCC; $\times 10^6$ células/mL) e viabilidade celular (%), avaliada usando monitoramento por DHM diferencial, em um processo de expansão automatizado em comparação com um processo de expansão manual.

[0077] **FIGS. 6A-6D** representam os perfis fenotípicos de 40 composições de célula T CAR+ modificadas, cada de um paciente de mieloma múltiplo. Perfis de expressão de CD45RA \times CCR7 entre as composições de célula T CAR+ são mostrados para as populações de CD4+ (**FIG. 6A**) e as populações de CD8+ (**FIG. 6B**). Perfis de expressão de CD27 \times CD28 entre as composições de célula T CAR+ são mos-

trados para as populações de CD4+ (**FIG. 6C**) e as populações de CD8+ (**FIG. 6D**). Cada composição de célula T CAR+ é mostrada por um ponto (●), uma cruz (✕), um diamante (◇), ou um triângulo (Δ).

Descrição Detalhada

[0078] São fornecidos aqui métodos para gerar ou produzir composições de células modificadas, tais como células T CD4+ e CD8+ modificadas, que expressam um receptor recombinante. Em concretizações particulares, os métodos são usados em conexão com um processo que inclui incubar células, tal como uma composição de células de entrada, sob condições de estimulação; células geneticamente incubadas, por exemplo, transduzindo ou transfectando um polinucleotídeo codificando um receptor recombinante, e/ou cultivando as células modificadas sob condições que promovem proliferação e/ou expansão celular.

[0079] Em algumas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas que inclui combinar células T CD4+ e células T CD8+ em uma relação entre 2:1 e 1:2 para gerar uma composição de entrada, e incubar a composição de entrada sob condições estimulatórias. Em certas concretizações, o método inclui incubar uma composição de entrada contendo uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para células T CD8+. Em certas concretizações, a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL.

[0080] Em certas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas que inclui introduzir um receptor recombinante em um conjunto fixo ou quantidade de células, por exemplo, pelo menos, ou cerca de 1×10^6 , 10×10^6 , 100×10^6 , ou $1,000 \times 10^6$ células, de uma composição celular. Em algumas concretizações, as células são células estimuladas. Em certas

concretizações, as células são células viáveis. Em concretizações particulares, a introdução compreende transduzir as células T da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Em certas concretizações, a composição celular compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células que são células T CD4+ ou células T CD8+.

[0081] Em algumas concretizações, é fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas que inclui (i) incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada; em que a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; (ii) introduzir um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante; e (iii) cultivar a composição modificada sob condições que promovam proliferação e/ou expansão das células modificadas, desse modo produzindo uma composição de saída compreendendo as células T modificadas.

[0082] Diferentes processos estão disponíveis para a geração de populações de células T geneticamente modificadas, inclusive para a geração de células T modificadas que expressam um receptor de antígeno quimérico. No entanto, em algumas concretizações, alguns destes processos podem requerer um período de tempo longo ou relativamente longo para gerar as células modificadas. Em certas concretizações, alguns destes processos podem variar em sua capacidade de,

bem-sucedidamente, gerar células modificadas adequadas para terapia para diferentes indivíduos. Em certas concretizações, alguns destes processos podem produzir composições de célula T geneticamente modificadas com um grau elevado de variação para parâmetros tais como saúde celular, viabilidade, eficiência de transdução e/ou atividade celular.

[0083] As concretizações fornecidas tratam uma ou mais dessas questões. Em concretizações particulares, os métodos fornecidos geram células T modificadas adequadas para a terapia, por exemplo, terapia celular autóloga, em um pequeno ou relativamente pequeno período de tempo em comparação com alguns dos processos existentes. Além disso, em algumas concretizações, os métodos fornecidos resultam em um mais consistente, e menos variável, processo em termos de período de tempo requerido para produzir células modificadas a partir de amostras coletadas de diferentes indivíduos. Em concretizações particulares, os métodos fornecidos são capazes de, bem-sucedidamente, gerar células T modificadas adequadas para a terapia celular de uma elevada proporção de indivíduos. Em certas concretizações, as composições celulares resultantes contêm porções elevadas ou relativamente elevadas de células saudáveis, por exemplo, células que são viáveis e/ou não expressam um marcador apoptótico, porções elevadas ou relativamente elevadas de células que expressam um receptor recombinante, e/ou células com uma atividade elevada ou relativamente elevada, por exemplo, produção citotóxica, anti-tumor, e/ou de citocina, em resposta ao estímulo de antígeno. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos fornecem um processo para produzir produtos de célula de modificação e em alguns aspectos possuem taxas de sucesso particulares tais como altas taxas de sucesso ou taxas de sucesso maiores que uma taxa limítrofe, tais como aquelas que são capazes de gerar composições de célula terapêutica,

tais como capazes de gerar tais composições tendo certas características requeridas ou desejadas, para um grande número ou percentagem de amostras, tais como para todas ou uma elevada quantidade de amostras, cada qual derivada de um diferente indivíduo ou paciente individual, tal como um indivíduo ou paciente a ser tratado com a composição terapêutica (por exemplo, no contexto de terapia celular autóloga). Em alguns aspectos, os indivíduos ou pacientes possuem uma doença ou condição tal como um câncer tal como um câncer hematológico ou sanguíneo tal como um mieloma múltiplo. Em alguns aspectos, as amostras — das quais, para uma percentagem elevada destas, é possível gerar composições de célula terapêutica — são amostras de paciente incluindo aquelas que são variáveis, por exemplo, em termos de fenótipos celulares ou outros parâmetros das amostras ou células destes.

[0084] Em algumas concretizações, os métodos fornecidos geram composições de célula T de modificação que melhoraram ou elevados graus de célula saudável tal como comparado às composições celulares geradas por meio de outros processos. Em algumas concretizações, as composições incluem uma elevada percentagem de células que são negativas de um marcador apoptótico. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos geram composições de célula T compreendendo células polifuncionais com produção de citocina robusta. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos geram composições de célula T que são enriquecidas para um fenótipo de memória, enriquecidas para um fenótipo de memória central, e/ou enriquecidas para células que são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+. Em algumas concretizações, pelo menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, ou 80 % ou mais das células na composição (ou pelo menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, ou 80 % ou mais das células na

composição para, pelo menos, metade ou a maioria das amostras produzidas empregando-se os métodos ou, na média, para as amostras produzidas empregando-se os métodos), das células T na composição, ou das células T modificadas na composição, são células T de um fenótipo de memória central; são CD27+, CD28+; são CCR7+, CD45RA-; e/ou são CCR7+, CD45RO+. Em algumas concretizações, pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, ou 80 ou 85 ou 90 ou 95 % ou mais das células na composição (ou pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, ou 80 ou 85 ou 90 ou 95 % ou mais das células na composição para, pelo menos, metade ou a maioria das amostras produzidas empregando-se os métodos ou, na média, para as amostras produzidas empregando-se os métodos), das células T na composição, ou das células T modificadas na composição, são células T de um fenótipo de memória; são CD45RA-; e/ou são CD45RO+.

[0085] Em concretizações particulares, os métodos fornecidos são empregados em conexão com um processo para eficientemente produzir ou gerar células modificadas que são adequadas para o uso em uma terapia celular. Em certas concretizações, o tempo, condições, e os reagentes empregados para cada etapa do processo melhoram a eficiência de cada etapa subsequente e/ou processo geral. Por exemplo, em algumas concretizações, as células podem ser incubadas, transduzidas, e/ou cultivadas em concentrações celulares que são elevadas o suficiente para alcançar um efeito desejado, por exemplo, o estímulo das células ou eficiência de transdução melhorada, porém em concentrações que são baixas o suficiente para evitar o desenvolvimento diminuído ou sobrevivência reduzida nas etapas de processamento subsequentes. Além disso, em algumas concretizações, as etapas do processo são programadas para começar ou terminar em pontos de tempo específicos para melhorar a eficiência das etapas de processo subsequentes e/ou do processo todo. Por exemplo, em al-

gumas concretizações, as etapas para incubação e modificação (por exemplo, transdução ou transfecção, as células) são concluídas mais cedo no processo do que nos métodos alternativos, os quais, em certas concretizações, melhora a sobrevivência e/ou saúde, e/ou a velocidade de proliferação e expansão das células durante a subsequente etapa de cultivo. Desse modo, em um aspecto, o tempo específico, as condições, e os reagentes de cada etapa influenciam as células além da etapa individual e, em certas concretizações, influenciam a performance do processo inteiro.

[0086] Em algumas concretizações, os métodos são empregados em conexão com um processo que gera ou produz geneticamente células modificadas que são adequadas para terapia celular de uma forma que podem ser mais rápidos e mais eficientes do que os processos alternativos. Em certas concretizações, os métodos fornecidos aqui possuem uma elevada taxa de sucesso para gerar ou produzir composições de células modificadas a partir de uma população mais ampla de indivíduos que podem ser possíveis a partir de processos alternativos. Em certas concretizações, as células modificadas produzidas ou geradas pelos métodos fornecidos podem ter melhor saúde, viabilidade, ativação, e podem ter melhor expressão do receptor recombinante do que as células produzidas por métodos alternativos. Desse modo, em alguns aspectos, a velocidade e a eficiência dos métodos fornecidos para gerar as células modificadas para terapia celular permitem uma coordenação e planejamento mais fáceis dos tratamentos de terapia celular, tal como terapia autóloga, para uma população mais ampla de indivíduos do que pode ser possível por alguns métodos alternativos.

[0087] Todas as publicações, incluindo documentos de patente, artigos científicos e base de dados, referidos neste pedido são incorporados por referência em sua totalidade para todos os propósitos na

mesma medida como se cada publicação individual fosse individualmente incorporada por referência. Se uma definição apresentada aqui for contrária ou de outra forma inconsistente com uma definição apresentada nas patentes, pedidos, pedidos publicados e outras publicações que são incorporadas aqui por referência, a definição apresentada aqui prevalece sobre a definição que é incorporada aqui por referência.

[0088] Os títulos de seção empregados aqui são para propósitos organizacionais apenas e não devem ser interpretados como limitantes do assunto descrito.

I. PROCESSO PARA GERAR CÉLULAS MODIFICADAS

[0089] Fornecidos aqui são os métodos para gerar uma composição de saída de células modificadas, tais como células T CD8+ e células T CD4+ planejadas, que expressam uma proteína recombinante, por exemplo, um receptor recombinante tal como um receptor de célula T (TCR) ou um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em certas concretizações, os métodos fornecidos aqui são empregados em conexão com a fabricação, geração, ou produção de uma terapia celular, e podem ser empregados em conexão com etapas de processamento adicionais, tais como etapas para o isolamento, separação, seleção, ativação ou estimulação, transdução, lavagem, suspensão, diluição, concentração, e/ou formulação das células. Em algumas concretizações, os métodos de gerar ou produzir células modificadas, por exemplo, células T CD4+ e CD8+ modificadas, incluem uma ou mais células de isolamento de um indivíduo, preparação, processamento, incubação sob condições de estimulação e/ou modificação (por exemplo, transdução) das células. Em algumas concretizações, o método inclui etapas de processamento realizadas a fim de que: as células de entrada, por exemplo, células primárias CD4+ e CD8+, sejam primeiro isoladas, tais como selecionadas ou separadas, de uma amostra bio-

lógica; as células de entrada são incubadas sob condições de estimulação, construídas com partículas de vetores, por exemplo, partículas de vetor viral, para introduzir um polinucleotídeo recombinante nas células, por exemplo, por transdução ou transfecção; cultivando as células modificadas, por exemplo, células transduzidas, tal como para expandir as células; e coletadas, colhidas, e/ou carregadas em um recipiente, por exemplo, uma bolsa ou frascote, como todas ou uma porção das células para células formuladas em uma composição de saída. Em algumas concretizações, as células da composição de saída gerada são reintroduzidas no mesmo indivíduo, antes ou após a crioconservação. Em algumas concretizações, as composições de saída das células modificadas são adequadas para o uso em uma terapia, por exemplo, uma terapia celular autóloga.

[0090] Em concretizações particulares, os métodos fornecidos são empregados em conexão com a geração de composições de saída de células expressando um receptor recombinante de uma composição de entrada ou inicial de células. Em certas concretizações, a composição de entrada é produzida, gerada, e/ou produzida pela combinação, mistura, e/ou agrupamento de células incluindo de composição de células contendo células T enriquecidas, células T CD4+ enriquecidas, e/ou células T CD8+ enriquecidas (depois também referidas como composições de células T enriquecidas, composições de células T CD4+ enriquecidas, e composições de células T CD8+ enriquecidas, respectivamente). Em algumas concretizações, a composição de entrada de células é uma composição de células T CD4+ e CD8+ combinadas, misturadas e/ou agrupadas. Em certas concretizações, os métodos fornecidos são empregados em conexão com uma ou mais de: células de ativação e/ou estimulação, por exemplo, células de uma composição de entrada; geneticamente produzindo as células ativadas e/ou estimuladas, por exemplo, para introduzir um polinucleotídeo co-

dificando uma proteína recombinante por transdução ou transfecção; e/ou cultivando as células modificadas, por exemplo, sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão. Em certas concretizações, os métodos podem também ser empregados em conexão com células de isolamento ou seleção a partir da amostra biológica para gerar uma composição de entrada de células T enriquecidas, tal como da amostra biológica colhida, coletada e/ou obtida de um indivíduo. Em concretizações particulares, os métodos fornecidos podem ser empregados em conexão com composições de colheita, coleção, e/ou formulação de células T enriquecidas após as células serem incubadas, ativadas, estimuladas, produzidas, transduzidas, transfectadas e/ou cultivadas.

[0091] Em algumas concretizações, as células de incubação sob condições de estimulação é, ou incluem células de incubação com um reagente estimulatório, por exemplo, um reagente estimulatório descrito aqui tal como na Seção I-B-1. Em concretizações particulares, um grupo ou quantidade fixa de células, tal como uma quantidade de células mais que pelo menos 100×10^6 células sejam incubadas sob condições de estimulação em um grupo ou concentração fixa, tal como uma concentração menor que 5×10^6 células/mL. Em certas concretizações, a incubação é realizada em um ajuste ou quantidade fixa de tempo, tal como um período de tempo de 2 dias ou durante um período de tempo entre 18 horas e 30 horas.

[0092] Em certas concretizações, os métodos fornecidos aqui são realizados em conexão com a fabricação, por exemplo, transdução ou transfecção das células. Em algumas concretizações, um grupo ou quantidade fixa de células, por exemplo, células CD4+ e CD8+ viáveis, são submetidas à modificação. Em algumas concretizações, uma quantidade de células mais que pelo menos 10×10^6 células são incubadas sob condições de estimulação em um grupo ou concentração

fixa, tal como uma concentração menor que 3×10^6 células/mL. Em certas concretizações, a modificação é realizada por um grupo ou quantidade fixa de tempo, tal como um período de tempo abaixo de 2 dias ou por um período de tempo entre 18 horas e 30 horas.

[0093] Em certas concretizações, pelo menos uma porção da etapa de cultivo é realizada com constante mistura e/ou perfusão, por exemplo, com um biorreator em um sistema fechado. Em certas concretizações, a mistura e/ou perfusão incorpora uma substituição firme e/ou gradual de solução ou meios de célula antiga empregados com solução ou meios novos. Em algumas concretizações, o cultivo é iniciado dentro de um período de tempo, por exemplo, dentro de 2, 3, 4, ou 5 dias a partir do início ou iniciação de uma incubação sob condições estimulatórias; dentro de 2, 3, 4, ou 5 dias a partir da mistura, agrupamento, e/ou combinação, por exemplo, células CD4+ e CD8+, para gerar uma composição de entrada; dentro de 3, 4, 5, ou 6 dias a partir de quando as amostras biológicas são coletadas; e/ou dentro de 3, 4, 5, ou 6 dias de isolamento, seleção e/ou enriquecimento de composições de células T enriquecidas, por exemplo, CD4+ e/ou células T CD8+, a partir de uma amostra biológica.

[0094] Em algumas concretizações, uma ou mais etapas do processo são realizadas, pelo menos em parte, em meios livres de soro. Em algumas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura celular bem definido e/ou definido. Em certas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura controlado que foi processado, por exemplo, filtrado para remover inibidores e/ou fatores de crescimento. Em algumas concretizações, o meio livre de soro contém proteínas. Em certas concretizações, o meio livre de soro pode conter albumina de soro, hidrolisados, fatores de crescimento, hormônios, proteínas carreadoras, e/ou fatores de ligamento.

[0095] Em algumas concretizações, os métodos fornecidos são

realizados tal que uma, mais ou todas as etapas na preparação de células para o uso clínico, por exemplo, na terapia celular adotiva, são realizadas sem expor as células às condições não estéreis. Em algumas concretizações de tal processo, as células são isoladas, separadas ou selecionadas, transduzidas, lavadas, opcionalmente ativadas ou estimuladas e formuladas, tudo dentro de um sistema fechado. Em algumas concretizações, uma ou mais das etapas são realizadas além do dispositivo ou sistema fechado. Em algumas tais concretizações, as composições das células enriquecidas são transferidas além do dispositivo ou sistema fechado sob condições estéreis, tal como por transferência estéril a um sistema fechado separado.

[0096] Em concretizações particulares, as composições de células T enriquecidas podem ser coletadas, formuladas por crioproteção, criocongelamento, e/ou armazenadas abaixo de 0°C, abaixo de -20°C, ou abaixo de ou a -70C ou -80°C antes de, durante, ou após qualquer estágio ou etapa do processo para gerar composições de saída de células T enriquecidas expressando receptores recombinantes. Em algumas concretizações, as células podem ser armazenadas durante um período de tempo abaixo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 dias, ou um período de tempo abaixo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas, ou durante um período de tempo de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 semanas, ou durante mais do que 8 semanas. Após a armazenagem, as composições de células T enriquecidas podem ser descongeladas e o processamento pode ser resumido a partir do mesmo ponto no processo. Em algumas concretizações, composições de entrada de células T enriquecidas são criocongeladas e armazenadas antes de outro processamento, por exemplo, incubação sob condições de estimulação. Em concretizações particulares, as composições cultivadas e/ou formuladas de células T enriquecidas são criocongeladas e armazenadas antes de serem administradas ao indivíduo, por exemplo, como

uma terapia celular autóloga.

[0097] Em certas concretizações, os métodos fornecidos aqui são empregados em conexão com um processo onde as células modificadas são geradas por um processo que inclui as etapas para incubação das células sob condições de estimulação, transdução das células para expressar um receptor recombinante, por exemplo, um CAR, e cultivar as células sob condições que promovam a proliferação ou expansão. Em concretizações particulares, a incubação é realizada entre 18 e 30 horas, tal como durante, ou durante cerca de, 24 horas, e a transdução é subsequentemente realizada entre 18 e 30 horas, tal como durante, ou durante cerca de, 24 horas. Em certas concretizações, as células são cultivadas sob condições que promovam a estimulação e/ou expansão após as células terem sido estimuladas e transduzidas. Em certas concretizações, a incubação é iniciada, tal como contactando-se as células com um reagente estimulatório, e a transdução é iniciada com 48 horas, dentro de 36 horas, ou dentro de 30 horas após a incubação ter sido iniciada. Em algumas concretizações, o cultivo é realizado após a incubação e transdução, e o cultivo é iniciado dentro de 72 horas, dentro de 66 horas, ou dentro de 60 horas após a incubação, ter sido iniciada. Em certas concretizações, o cultivo é realizado até uma quantidade limite, densidade, e/ou expansão de células é alcançada, até pelo menos um dia após a quantidade limite, densidade, e/ou expansão de células é obtida, e/ou até pelo menos 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, ou 12 dias após o início da incubação.

[0098] Em certas concretizações, em qualquer estágio ou etapa no processo, uma porção das células pode ser amostrada ou coletada, por exemplo, as células podem ser tiradas da composição de células T enriquecidas ao mesmo tempo que a composição permanece no sistema fechado, tal como durante o isolamento, incubação, modificação, cultivo, e/ou formulação. Em certas concretizações, tais células podem

ser analisadas pelos criadores, traços ou características incluindo, porém não limitado a, viabilidade, apoptose, ativação, estimulação, crescimento, e/ou exaustão. Em algumas concretizações, as células são amostradas ou coletadas por um processo automatizado ao mesmo tempo que composição de células T enriquecidas permanece no sistema fechado. Em algumas concretizações, a análise das células amostradas ou coletadas é automatizada. Em concretizações particulares, a análise é realizada em um sistema fechado sob condições estéreis.

[0099] Em algumas concretizações, fornecido aqui é um processo em que as células modificadas são geradas compreendendo as etapas de incubar uma composição de célula de entrada sob uma condição de estimulação (por exemplo, para ativar as células T na composição), submetendo a composição celular à modificação (por exemplo, transdução) para expressar um receptor recombinante, por exemplo, um CAR, cultivando as células sob condições que promovam a expansão ou proliferação celular, e/ou colhendo ou coletando as células para gerar uma composição celular compreendendo as células modificadas, por exemplo, células T modificadas para uma terapia celular. Em algumas concretizações, a composição de célula de entrada é incubada sob condições de estimulação que incluem: a relação de um reagente estimulatório (por exemplo, um reagente de conta como descrito na Seção I-B-1) para as células é de, ou cerca de 1:1; a composição de entrada compreende as células T CD4+ e células T CD8+ em uma relação de, ou de cerca de 1:1 (por exemplo, a composição enriquecida por células T CD4+ e a composição enriquecida por células T CD8+ podem ser agrupadas, misturadas e/ou combinadas em uma relação de, ou de cerca de 1:1 para gerar a composição de entrada); a duração total de uma incubação sob as condições de estimulação, por exemplo, com o reagente estimulatório, é entre cerca de 12 horas e

cerca de 36 horas, por exemplo, entre cerca de 18 horas e cerca de 30 horas; as células, por exemplo, as células da composição de entrada, são incubadas sob as condições de estimulação tal como na presença de um reagente estimulatório, em uma densidade entre cerca de 5×10^5 células/mL e cerca de 5×10^7 células/mL, por exemplo, em, ou cerca de 3×10^6 células/mL; e/ou as células, por exemplo, células da composição de entrada, são estimuladas e/ou ativadas em um meio livre de soro (por exemplo, um meio livre de soro compreendendo uma ou mais citocinas recombinantes, tal como IL-2, IL-7, e IL-15). Em algumas concretizações, as células são submetidas à modificação sob condições que incluem: contactar as células com uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína recombinante, por exemplo, um receptor recombinante, sob centrifugação, tal como espinoculação (por exemplo, inoculação centrifugal), por exemplo, a cerca de 1600 x g por cerca de 60 minutos; as células são submetidas à modificação em uma densidade entre cerca de 5×10^5 células/mL e cerca de 5×10^7 células/mL, por exemplo, a, ou cerca de 1×10^6 células/mL; cerca de 100×10^6 células da composição cultivada sob condições de estimulação são submetidas à modificação; a duração total da etapa de modificação, por exemplo, transdução, é entre cerca de 12 horas e cerca de 36 horas, por exemplo, entre cerca de 18 horas e cerca de 30 hours; e/ou as células são submetidas à modificação em um meio livre de soro (por exemplo, um meio livre de soro compreendendo uma ou mais citocinas recombinantes, tal como IL-2, IL-7, e IL-15). Em algumas concretizações, as células são cultivadas sob condições que promovam a expansão ou proliferação celular que inclui: as células são cultivadas sob condições de agitação e/ou perfusão; e/ou as células são cultivadas em um meio livre de soro (por exemplo, um meio livre de soro compreendendo uma ou mais citocinas recombinantes, tal como IL-2, IL-7, e IL-15, opcionalmente com maiores concentrações

das citocinas recombinantes do que o meio livre de soro empregado para a estimulação/ativação e/ou a modificação). Em algumas concretizações, o cultivo termina e as células são colhidas quando as células alcançam uma quantidade limite, concentração, e/ou expansão, por exemplo, uma contagem de célula limite (por exemplo, contagem de célula nucleada total) de pelo menos cerca de 3500×10^6 células ou cerca de 5500×10^6 células. Em algumas concretizações, quando as células não alcançaram um alvo ou limite em um tempo fornecido durante os processos de estimulação/ativação, modificação, cultivo, e/ou colheita, as células podem ser estimuladas/ativadas, submetidas à modificação, e/ou cultivadas até um ponto mais tarde quando o alvo ou limite for alcançado.

[00100] Em algumas concretizações, fornecido aqui é um processo em que as células modificadas são geradas compreendendo as etapas de incubar uma composição de célula de entrada sob condição de estimulação (por exemplo, para ativar as células T na composição), submetendo a composição celular à modificação (por exemplo, transdução) para expressar um receptor recombinante, por exemplo, um CAR, cultivando as células sob condições que promovam a expansão ou proliferação celular, e/ou colhendo ou coletando as células para gerar uma composição celular compreendendo células modificadas, por exemplo, células T modificadas para uma terapia celular. Em algumas concretizações, a composição de célula de entrada é incubada sob condições de estimulação que incluem: a relação de um reagente estimulatório (por exemplo, um reagente de conta como descrito na Seção I-B-1) para as células é de ou de cerca de 1:1; a composição de entrada compreende células T CD4+ e as células T CD8+ em uma relação de, ou de cerca de 1:1 (por exemplo, uma composição enriquecida por células T CD4+ e uma composição enriquecida por células T CD8+ podem ser agrupadas, misturadas e/ou combinadas em uma

relação de, ou de cerca de 1:1 para gerar a composição de entrada); a duração total de uma incubação sob condições de estimulação, por exemplo, com o reagente estimulatório, é entre cerca de 12 horas e cerca de 36 horas, por exemplo, entre cerca de 18 horas e cerca de 30 horas; as células, por exemplo, as células da composição de entrada, são incubadas sob as condições de estimulação tal como na presença de um reagente estimulatório, em uma densidade entre cerca de 5×10^5 células/mL e cerca de 5×10^7 células/mL, por exemplo, em, ou cerca de, 3×10^6 células/mL; e/ou as células, por exemplo, células da composição de entrada, são estimuladas e/ou ativadas em um meio livre de soro (por exemplo, um meio livre de soro compreendendo uma ou mais citocinas recombinantes, tal como IL-2, IL-7, e IL-15). Em algumas concretizações, as células são submetidas à modificação sob condições que incluem: contactar as células com uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína recombinante, por exemplo, um receptor recombinante, sob centrifugação, tal como espinoculação (por exemplo, inoculação centrifugal), por exemplo, a cerca de 1600 x g por cerca de 60 minutos; as células são submetidas à modificação em uma densidade entre cerca de 5×10^5 células/mL e cerca de 5×10^7 células/mL, por exemplo, a, ou a cerca de 1×10^6 células/mL; pelo menos cerca de 100×10^6 células e até cerca de 200×10^6 células da composição cultivada sob condições de estimulação são submetidas à modificação; a duração total da etapa de modificação, por exemplo, transdução, é entre cerca de 12 horas e cerca de 36 horas, por exemplo, entre cerca de 18 horas e cerca de 30 horas; e/ou as células são submetidas à modificação em um meio livre de soro (por exemplo, um meio livre de soro compreendendo uma ou mais citocinas recombinantes, tal como IL-2, IL-7, e IL-15). Em algumas concretizações, as células são cultivadas sob condições que promovam a expansão ou proliferação celular que incluem: as células são cultivadas sob condições

de agitação e/ou perfusão; e/ou as células são cultivadas em um meio livre de soro (por exemplo, um meio livre de soro compreendendo uma ou mais citocinas recombinantes, tal como IL-2, IL-7, e IL-15, opcionalmente com maiores concentrações das citocinas recombinantes do que o meio livre de soro empregado para a estimulação/ativação e/ou modificação). Em algumas concretizações, cultivo termina e as células são colhidas quando elas alcançam uma quantidade limite, concentração, e/ou expansão, por exemplo, uma contagem de célula limite (por exemplo, contagem de célula nucleada total) de pelo menos cerca de 2400×10^6 células, e quando as células alcançam uma viabilidade limite, por exemplo, pelo menos cerca de 75% ou pelo menos cerca de 85% das células são viáveis. Em algumas concretizações, quando as células não alcançaram um alvo ou limite em um tempo fornecido durante os processos de estimulação/ativação, modificação, cultivo, e/ou colheita, as células podem ser estimuladas/ativadas, submetidas à modificação, e/ou cultivadas até um ponto mais tarde quando o alvo ou limite for alcançado.

[00101] Em algumas concretizações, as células ou composições das células que são produzidas e/ou processadas pelos métodos fornecidos podem ser comparadas às células ou composições de células processadas ou produzidas por um processo exemplar e/ou alternativo. Em algumas concretizações, o processo alternativo e/ou exemplar pode diferenciar em um ou mais aspectos específicos, porém de outra forma conter similares ou as mesmas características, aspectos, etapas, estágios, reagentes, e/ou condições da concretização ou aspecto dos métodos fornecidos que são comparados. Por exemplo, quando os métodos fornecidos são empregados em conexão com as células de incubação na presença de um reagente, tais células podem ser comparadas às células que não são incubadas com o reagente em um processo alternativo e/ou exemplar. Em algumas concretizações, a

menos que de outro modo especificado, os métodos fornecidos e o processo alternativo e/ou exemplar seria de outra forma similar e/ou idêntico, tal como com similares ou idênticas etapas para isolar, selecionar, enriquecer, ativar, estimular, modificar, transfectar, transduzir, cultivar e/ou formular. Em algumas concretizações, a menos que de outro modo especificado, os métodos fornecidos e o processo alternativo isolam, selecionam e/ou enriquecem as células dos mesmos ou similares tipos de amostras biológicas, e/ou células de processo e/ou células de entrada do mesmo tipo celular.

[00102] Também fornecidas são as células e composições preparadas pelos métodos, incluindo formulações e composições farmacêuticas e *kits*, sistemas, e dispositivos para realizar os métodos. Também fornecidos são os métodos para o uso das células e composições preparadas pelos métodos, incluindo métodos terapêuticos, tais como os métodos para terapia celular adotiva, e as composições farmacêuticas para a administração aos indivíduos.

A. Amostras e Preparação celular

[00103] Em concretizações particulares, os métodos fornecidos são empregados em conexão com células de isolamento, seleção e/ou enriquecimento da amostra biológica para gerar uma ou mais composições de entrada de células enriquecidas, por exemplo, células T. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos incluem o isolamento de células ou composições destas a partir de amostras biológicas, tais como aquelas obtidas de ou derivadas de um indivíduo, tal como um tendo uma doença ou condição particular o em necessidade de uma terapia celular ou aquela terapia celular será administrada. Em alguns aspectos, o indivíduo é um humano, tal como um indivíduo que é um paciente em necessidade de uma intervenção terapêutica particular, tal como a terapia celular adotiva para as células que estão sendo isoladas, processadas e/ou modificadas. Consequentemente, as células

em algumas concretizações são células primárias, por exemplo, células humanas primárias. As amostras incluem tecido, fluido e outras amostras tiradas diretamente do indivíduo. A amostra biológica pode ser uma amostra obtida diretamente de uma fonte biológica ou uma amostra que é processada. As amostras biológicas incluem, porém não são limitadas a, fluidos corporais, tais como sangue, plasma, soro, fluido cerebrospinal, fluido sinovial, urina e suor, amostras de tecido e órgãos, incluindo amostras processadas derivadas destes.

[00104] Em alguns aspectos, a amostra é sangue ou uma amostra derivada de sangue, ou é, ou é derivada de um produto de aferese ou leucaferese. Amostras exemplares incluem sangue total, células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), leucócitos, medula óssea, timo, biópsia de tecido, tumor, leucemia, linfoma, linfonodo, tecido linfóide associado ao intestino, tecido linfóide associado à mucosa, baço, outros tecidos linfóides, fígado, pulmão, estômago, intestino, cólon, rim, pâncreas, mama, osso, próstata, colo do útero, testículos, ovários, amígdala, ou outro órgão e/ou células derivadas destes. As amostras incluem, no contexto de terapia celular, por exemplo, terapia celular adotiva, amostras de fontes alogeneicas e autólogas.

[00105] Em alguns exemplos, as células do sangue circulante de um indivíduo são obtidas, por exemplo, por aferese ou leucaferese. As amostras, em alguns aspectos, contêm linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outras células brancas do sangue nucleadas, células vermelhas do sangue, e/ou plaquetas, e em alguns aspectos contêm células diferentes de plaquetas e células vermelhas do sangue.

[00106] Em algumas concretizações, as células do sangue coletadas do indivíduo são lavadas, por exemplo, para remover a fração de plasma e colocar as células no meio ou tampão apropriado para as etapas de processamento subsequentes. Em algumas concretizações,

as células são lavadas com salina tamponada por fosfato (PBS). Em algumas concretizações, na solução de lavagem faltam cálcio e/ou magnésio e/ou muitos ou todos os cátions divalentes. Em alguns aspectos, uma etapa de lavagem é realizada em uma centrífuga "através de fluxo" semi-automática (por exemplo, o processador celular Cobe 2991, Baxter) de acordo com as instruções do fabricante. Em alguns aspectos, uma etapa de lavagem é realizada por filtração de fluxo tangencial (TFF) de acordo com as instruções do fabricante. Em algumas concretizações, as células são ressuspensas em uma variedade de tampões biocompatíveis após a lavagem, tal como, por exemplo, PBS livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Em certas concretizações, os componentes de uma amostra celular de sangue são removidos e as células diretamente ressuspensas em meios de cultura.

[00107] Em algumas concretizações, os métodos de preparação incluem etapas para congelamento, por exemplo, crioconservação, as células, antes ou após o isolamento, seleção e/ou enriquecimento e/ou incubação para transdução e modificação. Em algumas concretizações, a etapa de congelamento e subsequente descongelamento removem os granulócitos e, até certo ponto, os monócitos na população celular. Em algumas concretizações, as células são suspensas em uma solução de congelamento, por exemplo, após uma etapa de lavagem para remover o plasma e as plaquetas. Qualquer uma de uma variedade de parâmetros e soluções de congelamento conhecidas em alguns aspectos pode ser empregada. Em algumas concretizações, as células são congeladas, por exemplo, criocongeladas ou crioconservadas, em meios e/ou solução com uma concentração final de ou cerca de 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5%, ou 5,0% de DMSO, ou entre, ou de cerca de 1% e a, ou cerca de 15%, entre, ou de cerca de 6% e a, ou cerca de 12%, entre, ou de cerca de 5% e a, ou cerca de 10%, ou

entre, ou de cerca de 6% e a, ou cerca de 8% de DMSO. Em concretizações particulares, as células são congeladas, por exemplo, criocongeladas ou crioconservadas, em meios e/ou solução com uma concentração final de ou cerca de 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5%, ou 0,25% de HSA, ou entre 0,1% e -5%, entre 0,25% e 4%, entre 0,5% e 2%, ou entre 1% e 2% de HSA. Um exemplo envolve usar PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina de soro humano (HSA), ou outros meios de congelamento adequados. Este é em seguida diluído 1:1 com meios para que a concentração final de DMSO e HSA sejam 10% e 4%, respectivamente. As células são geralmente em seguida congeladas a, ou cerca de -80° C em uma taxa de, ou cerca de 1° por minuto e armazenadas na fase de vapor de um tanque de armazenagem de nitrogênio líquido.

[00108] Em algumas concretizações, o isolamento das células ou populações incluem uma ou mais etapas de separação e/ou preparação de célula baseada em não afinidade. Em alguns exemplos, as células são lavadas, centrifugadas e/ou incubadas na presença de um ou mais reagentes, por exemplo, para remover os componentes indesejados, enriquecer componentes desejados, lisar ou remover células sensíveis aos reagentes particulares. Em alguns exemplos, as células são separadas com base em uma ou mais propriedades, tal como densidade, propriedades aderentes, tamanho, sensibilidade e/ou resistência aos componentes particulares. Em algumas concretizações, os métodos incluem métodos de separação de célula com base na densidade, tal como a preparação de células brancas do sangue a partir do sangue periférico, lisando-se as células vermelhas do sangue e centrifugação através de um gradiente *Percoll* ou *Ficoll*.

[00109] Em algumas concretizações, pelo menos uma porção da etapa de seleção inclui a incubação de células com um reagente de seleção. A incubação com reagentes ou reagente de seleção, por

exemplo, como parte de métodos de seleção os quais podem ser realizados empregando-se um ou mais reagentes de seleção para a seleção de um ou mais diferentes tipos de célula com base na expressão ou presença ou na célula de uma ou mais moléculas específicas, tais como marcadores de superfície, por exemplo, proteínas de superfície, marcadores intracelulares, ou ácido nucleico. Em algumas concretizações, qualquer método conhecido empregando-se reagentes ou reagente de seleção para separação com base em tais marcadores, pode ser empregado. Em algumas concretizações, os reagentes ou reagente de seleção resultam em uma separação que é separação com base na afinidade ou imunoafinidade. Por exemplo, a seleção em alguns aspectos inclui a incubação com um reagente ou reagentes para a separação de células e populações de célula com base na expressão de célula ou nível de expressão de um ou mais marcadores, tipicamente marcadores de superfície celular, por exemplo, pela incubação com um anticorpo ou parceiro de ligação que especificamente se liga aos tais marcadores, seguido geralmente por etapas de lavagem e separação de células tendo ligação ao anticorpo ou parceiro de ligação, daquelas células não tendo ligação ao anticorpo ou parceiro de ligação.

[00110] Em alguns aspectos de tais processos, um volume de células é misturado com uma quantidade de um reagente de seleção com base na afinidade desejada. A seleção com base na imunoafinidade pode ser realizada empregando-se qualquer sistema ou método que resulte em uma interação energética favorável entre as células sendo separadas e a molécula especificamente ligando-se ao marcador na célula, por exemplo, o anticorpo ou outro parceiro de ligação na superfície sólida, por exemplo, partícula. Em algumas concretizações, os métodos são realizados empregando-se partículas tais como contas, por exemplo, contas magnéticas, que são revestidas com um agente

de seleção (por exemplo, anticorpo) específico para o marcador das células. As partículas (por exemplo, contas) podem ser incubadas ou misturadas com as células em um recipiente, tal como um tubo ou bolsa, ao mesmo tempo que agitando ou misturando, com uma relação densidade-para-partícula celular constante (por exemplo, conta) para auxiliar na promoção das interações energeticamente favorecidas. Em outros casos, os métodos incluem a seleção de células em que toda ou uma porção da seleção é realizada na cavidade interna de uma câmara centrífuga, por exemplo, sob rotação centrífuga. Em algumas concretizações, a incubação de células com os reagentes de seleção, tais como reagentes de seleção com base na imunoafinidade, é realizada em uma câmara centrífuga. Em certas concretizações, o isolamento ou separação é realizado empregando-se um sistema, dispositivo ou aparato descrito no Pedido de Patente Internacional, Número de publicação WO2009/072003, ou US 20110003380 A1. Em um exemplo, o sistema é um sistema como descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602.

[00111] Em algumas concretizações, conduzindo-se tais etapas de seleção ou porções destas (por exemplo, incubação com partículas revestidas por anticorpo, por exemplo, contas magenéticas) na cavidade de uma câmara centrífuga, o usuário é capaz de controlar certos parâmetros, tal como o volume de várias soluções, a adição da solução durante o processamento e cronometragem deste, que pode fornecer vantagens comparado com outros métodos disponíveis. Por exemplo, a capacidade de diminuir o volume líquido na cavidade durante a incubação pode aumentar a concentração das partículas (por exemplo, reagente de conta) empregadas na seleção, e assim o potencial químico da solução, sem afetar o número total de células na cavidade. Isto por sua vez pode realçar as interações em pares entre as células sendo processadas e as partículas empregadas para a se-

leção. Em algumas concretizações, realizando a etapa de incubação na câmara, por exemplo, quando associada com os sistemas, circuitos, e controle como descrito aqui, permite ao usuário efetuar a agitação da solução em tempo(s) desejado(s) durante a incubação, que também pode melhorar a interação.

[00112] Em algumas concretizações, pelo menos uma porção da etapa de seleção é realizada em uma câmara centrífuga, a qual inclui a incubação das células com um reagente de seleção. Em alguns aspectos de tais processos, um volume de células é misturado com uma quantidade de um reagente de seleção com base na afinidade desejada que é muito menos do que é normalmente empregado quando realizando seleções similares em um tubo ou recipiente para a seleção do mesmo número de células e/ou volume de células de acordo com as instruções do fabricante. Em algumas concretizações, um quantidade de reagentes ou reagente de seleção que é/não são mais do que, ou cerca de 5%, não mais do que, ou cerca de 10%, não mais do que, ou cerca de 15%, não mais do que, ou cerca de 20%, não mais do que, ou cerca de 25%, não mais do que, ou cerca de 50%, não mais do que, ou cerca de 60%, não mais do que, ou cerca de 70% ou não mais do que, ou cerca de 80% da quantidade do(s) mesmo(s) reagente(s) de seleção empregado(s) para seleção de células na incubação com base em recipiente ou tubo para o mesmo número de células e/ou o mesmo volume de células de acordo com as instruções do fabricante é empregada.

[00113] Em algumas concretizações, para seleção, por exemplo, seleção com base na imunoafinidade das células, as células são incubadas na cavidade da câmara em uma composição que também contém o tampão de seleção com um reagente de seleção, tal como uma molécula que especificamente se liga a um marcador de superfície em uma célula que é desejada para enriquecer e/ou esgotar, porém não

em outras células na composição, tal como um anticorpo, o qual é opcionalmente acoplado a uma armação tal como um polímero ou superfície, por exemplo, conta, por exemplo, conta magnética, tal como contas magnéticas acopladas aos anticorpos monoclonais específicos para CD4 e CD8. Em algumas concretizações, como descrito, o reagente de seleção é adicionado às células na cavidade da câmara em uma quantidade que seja substancialmente menor do que, ou cerca de (por exemplo, não seja mais do que, ou cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80% da quantidade) como comparada à quantidade do reagente de seleção que é tipicamente empregada ou seria necessário para obter cerca de a mesma ou similar eficiência de seleção do mesmo número de células ou o mesmo volume de células quando a seleção é realizada em um tubo com agitação ou rotação. Em algumas concretizações, a incubação é realizada com a adição de um tampão de seleção às células e reagente de seleção para obter um volume alvo com a incubação do reagente de, por exemplo, a, ou cerca de 10 mL a, ou cerca de 200 mL, tal como pelo menos ou pelo menos cerca de ou cerca de 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL ou 200 mL. Em algumas concretizações, o tampão de seleção e o reagente de seleção são misturados antes da adição às células. Em algumas concretizações, o tampão de seleção e o reagente de seleção são separadamente adicionados às células. Em algumas concretizações, a incubação de seleção é realizada com condição de mistura suave periódica, a qual pode auxiliar na promoção de interações energeticamente favorecidas e, desse modo, permitir o uso de menos reagente de seleção total, ao mesmo tempo que obtendo uma elevada eficiência de seleção.

[00114] Em algumas concretizações, a duração total de uma incubação com o reagente de seleção é de ou cerca de 5 minutos a ou cerca de 6 horas, tal como 30 minutos a 3 horas, por exemplo, pelo

menos ou pelo menos cerca de 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos ou 180 minutos.

[00115] Em algumas concretizações, a incubação geralmente é realizada sob condições de mistura, tal como na presença de centrifugação, geralmente em velocidade ou força relativamente baixa, tal como velocidade menor do que aquela empregada ao pélete das células, tal como de ou cerca de 600 rpm a ou a cerca de 1700 rpm (por exemplo a, ou cerca de ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm, ou 1500 rpm ou 1700 rpm), tal como em um RCF na amostra ou parede da câmara ou outro recipiente de ou cerca de 80 g a 100 g (por exemplo a, ou cerca de ou pelo menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, ou 100 g). Em algumas concretizações, o giro é realizado empregando-se intervalos repetidos de um giro em velocidade baixa seguido por um período de descanso, tal como um giro e/ou descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 segundos, tal como um giro em aproximadamente 1 ou 2 segundos seguido por um descanso de aproximadamente 5, 6, 7, ou 8 segundos.

[00116] Em algumas concretizações, tal processo é realizado dentro de um sistema completamente fechado ao qual a câmara é integrante. Em algumas concretizações, este processo (e em alguns aspectos também uma ou mais etapa adicional, tal como uma etapa de lavagem anterior lavando uma amostra contendo as células, tal como uma amostra aferese) é realizado em um modelo automatizado, tal que as células, reagente, e outros componentes são conduzidos em e expandidos da câmara em tempos apropriados e a centrifugação efetuada, a fim de concluir a lavagem e a etapa de ligação em um sistema único fechado, empregando-se um programa automático.

[00117] Em algumas concretizações, após a incubação e/ou mistura das células e reagente de seleção e/ou reagentes, as células incubadas são submetidas a uma separação para selecionar células com base na presença ou ausência dos reagentes ou reagente particular. Em

algumas concretizações, a separação é realizada no mesmo sistema fechado em que a incubação das células com o reagente de seleção foi realizada. Em algumas concretizações, após a incubação com os reagentes de seleção, as células incubadas, incluindo as células em que o reagente de seleção foi ligado, são transferidas em um sistema para separação com base na imunoafinidade das células. Em algumas concretizações, o sistema para separação com base na imunoafinidade é ou contém uma coluna de separação magnética.

[00118] Tais etapas de separação podem ser baseadas na seleção positiva, em que as células tendo ligação aos reagentes, por exemplo, anticorpo ou parceiro de ligação, são retidas para outro uso, e/ou seleção negativa, em que as células não tendo ligação ao reagente, por exemplo, anticorpo ou parceiro de ligação, são retidas. Em alguns exemplos, ambas as frações são retidas para outro uso. Em alguns aspectos, a seleção negativa pode ser particularmente útil onde nenhum anticorpo está disponível o que especificamente identifica um tipo de célula em uma população heterogênea, tal que a separação seja melhor realizada com base nos marcadores expressos por células diferentes da população desejada.

[00119] Em algumas concretizações, as etapas de processo também incluem seleção negativa e/ou positiva das incubadas e células, tal como empregando-se um sistema ou aparato que pode realizar uma seleção com base na afinidade. Em algumas concretizações, o isolamento é realizado enriquecendo-se uma população de célula particular por seleção positiva, ou esgotamento de uma população de célula particular, por seleção negativa. Em algumas concretizações, a seleção positiva ou negativa é obtida por células de incubação com um ou mais anticorpos ou outro agente de ligação que especificamente liga-se a um ou mais marcadores de superfície expressos ou expressos (marcador⁺) em um nível relativamente maior (marcador^{alto}) nas

células positivamente ou negativamente selecionadas, respectivamente.

[00120] A separação não precisa resultar em 100% de enriquecimento ou a remoção de uma população de célula particular ou células expressando um marcador particular. Por exemplo, a seleção positiva de, ou o enriquecimento por células de um tipo particular, tais como aquelas expressando um marcador, refere-se ao aumento do número ou percentagem de tais células, porém não precisa resultar na ausência completa de células não expressando o marcador. Da mesma forma, seleção negativa, remoção, ou o esgotamento das células de um tipo particular, tais como aquelas expressando um marcador, refere-se a diminuir o número ou percentagem de tais células, porém não precisa resultar em uma remoção completa de todas tais células.

[00121] Em alguns exemplos, rodadas múltiplas de etapas de separação são realizadas, onde a fração positivamente ou negativamente selecionada a partir de uma etapa é submetida a outra etapa de separação, tal como uma seleção positiva ou negativa subsequente. Em alguns exemplos, uma etapa de separação única pode esgotar células expressando múltiplos marcadores simultaneamente, tal como incubando-se as células com uma pluralidade de anticorpos ou parceiros de ligação, cada qual específico para um marcador alvejado para seleção negativa. Da mesma forma, múltiplos tipos de célula podem simultaneamente ser positivamente selecionados incubando-se as células com uma pluralidade de anticorpos ou parceiros de ligação expressos em vários tipos de células. Em certas concretizações, as etapas de separação são repetidas e/ou realizadas mais do que uma vez, onde a fração positivamente ou negativamente selecionada de uma etapa é submetida à mesma etapa de separação, tal como uma seleção positiva ou negativa repetida. Em alguns exemplos, uma etapa de separação única é repetida e/ou realizada mais do que uma vez, por exem-

plo, aumentar a pureza das células selecionadas e/ou para também remover e/ou esgotar as células negativamente selecionadas da fração negativamente selecionada. Em certas concretizações, uma ou mais etapas de separação são realizadas duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, sete vezes, oito vezes, nove vezes, dez vezes, ou mais do que dez vezes. Em certas concretizações, as uma ou mais etapas de seleção são realizadas e/ou repetidas entre uma e dez vezes, entre uma e cinco vezes, ou entre três e cinco vezes.

[00122] Por exemplo, em alguns aspectos, as subpopulações específicas de células T, tais como células positivas ou expressando níveis elevados de um ou mais marcadores de superfície, por exemplo, células T CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD95+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, e/ou CD45RO+, são isoladas por técnicas de seleção positiva ou negativa. Em algumas concretizações, tais células são selecionadas por incubação com um ou mais anticorpos ou parceiros de ligação que especificamente se liga a tais marcadores. Em algumas concretizações, o anticorpo ou parceiro de ligação pode ser conjugado, tal como diretamente ou indiretamente, a uma matriz ou suporte sólido para efetuar a seleção, tal como uma conta magnética ou conta paramagnética. Por exemplo, as células T CD3+, CD28+ podem ser positivamente selecionadas empregando-se as contas magnéticas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (por exemplo, Expansor de Célula T DYNABEADS® M-450 CD3/CD28, e/ou contas ExpACT®).

[00123] Em algumas concretizações, as células T são separadas de uma amostra PBMC por seleção negativa de marcadores expressos em células não-T, tais como células B, monócitos, ou outras células brancas do sangue, tal como CD14. Em alguns aspectos, uma etapa de seleção de CD4+ or CD8+ é empregada para separar as células T citotóxicas CD8+ e auxiliares CD4+. Tais populações de CD4+ e CD8+

podem ser também ordenadas em subpopulações por seleção positiva ou negativa para marcadores expressos ou expressas a um grau relativamente maior em uma ou mais populações de célula T virgem, memória e/ou efetora.

[00124] Em algumas concretizações, as células CD8+ são também enriquecidas para ou esgotadas de células tronco de memória central, de memória efetora, memória central e/ou infantis, tal como por seleção positiva ou negativa com base nos antígenos de superfície associados com a respectiva subpopulação. Em algumas concretizações, o enriquecimento para as células de memória T central (T_{CM}) é realizado para aumentar a eficácia, tal como melhorar a sobrevivência a longo prazo, expansão e/ou enxerto após a administração, que em alguns aspectos é particularmente robusta em tais sub-populações. Ver, *por exemplo*, Terakura e outro(s), (2012) Blood.1:72–82; Wang e outro(s) (2012) J Immunother. 35(9):689-701. Em algumas concretizações, combinando células T CD8+ enriquecidas com T_{CM} e células T CD4+ também realça a eficácia.

[00125] Em algumas concretizações, as células T de memória estão presentes em ambos subgrupos CD62L+ e CD62L- de linfócitos de sangue periférico CD8+. PBMC pode ser enriquecido para ou esgotado de frações de CD62L-CD8+ e/ou CD62L+CD8+, tal como empregando-se anticorpos anti-CD8 e anti-CD62L.

[00126] Em algumas concretizações, o enriquecimento para as células T de memória central (T_{CM}) é baseado na expressão positiva ou elevada da superfície de CD45RO, CD62L, CCR7, CD27, CD28, CD95, CD3, e/ou CD127; em alguns aspectos, é baseado na seleção negativa para as células expressando ou altamente expressando CD45RA e/ou granzima B. Em alguns aspectos, o isolamento de uma população de CD8+ enriquecido para as células T_{CM} é realizado pela depleção das células expressando CD4, CD14, CD45RA, e seleção

positiva ou enriquecimento para as células expressando CD62L. Em um aspecto, o enriquecimento para as células T de memória central (T_{CM}) é realizado iniciando com uma fração negativa de células selecionadas com base na expressão de CD4, que é submetida a uma seleção negativa na expressão de CD14 e CD45RA, e uma seleção positiva com base em CD62L. Tais seleções, em alguns aspectos, são realizadas simultaneamente e, em outros aspectos, são realizadas sequencialmente, em qualquer ordem. Em alguns aspectos, a mesma etapa de seleção com base na expressão de CD4 empregada na preparação da subpopulação ou população de célula CD8+, também é empregada para gerar a subpopulação ou população de célula CD4+, tal que ambas as frações positivas e negativas da separação com base em CD4 são retidas e empregadas nas etapas subsequentes dos métodos, opcionalmente após uma ou mais outras etapas de seleção positivas ou negativas. Em algumas concretizações, a seleção para a população de célula CD4+ e a seleção para a população de célula CD8+ são realizadas simultaneamente. Em algumas concretizações, a população de célula CD4+ e a seleção para a população de célula CD8+ são realizadas sequencialmente, em qualquer ordem. Em algumas concretizações, os métodos para selecionar as células podem incluir aqueles como descrito na publicação do Pedido dos Estados Unidos N° US20170037369. Em algumas concretizações, a população de célula CD4+ selecionada e a população de célula CD8+ selecionada podem ser combinadas subsequentes à seleção. Em alguns aspectos, a população de célula CD4+ selecionada e a população de célula CD8+ selecionada podem ser combinadas em uma bolsa de biorreator como descrito aqui.

[00127] Em algumas concretizações, células CD8+ de memória central são CD27+, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD45RA-, e/ou CD45RO+. Em algumas concretizações, células CD8+ de memória

central são CD62L+ e CD45RO+. Em algumas concretizações, as células CD8+ de memória central são CCR7+ e CD45RO+. Em algumas concretizações, as células CD8+ de memória central são CCR7+ e CD45RA-. Em algumas concretizações, as células CD8+ de memória central são CD62L+ e CCR7+. Em algumas concretizações, as células CD8+ de memória central são CD62L+/CD45RA-, CCR7+/CD45RA-, CD62L+/CCR7+, ou CD62L+/CCR7+/CD45RA-, e possuem intermediário para expressão elevada de CD44. Em algumas concretizações, as células CD8+ de memória central são CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+, ou CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA-.

[00128] Em concretizações particulares, uma amostra biológica, por exemplo, uma amostra de PBMCs ou outras células brancas do sangue, são submetidas à seleção de células T CD4+, onde ambas as frações negativas e positivas são retidas. Em certas concretizações, as células T CD8+ são selecionadas da fração negativa. Em algumas concretizações, uma amostra biológica é submetida à seleção de células T CD8+, onde ambas as frações negativas e positivas são retidas. Em certas concretizações, as células T CD4+ são selecionadas da fração negativa.

[00129] Em um exemplo particular, uma amostra de PBMCs ou outra amostra de célula branca do sangue é submetida à seleção de células CD4+, onde ambas as frações negativas e positivas são retidas. A fração negativa em seguida é submetida à seleção negativa com base na expressão de CD14 e CD45RA ou CD19, e a seleção positiva com base em uma característica de marcador de células T de memória central, tal como CD62L ou CCR7, onde as seleções positivas e negativas são realizadas em qualquer ordem.

[00130] Em algumas concretizações, as células T auxiliares CD4+

são ordenadas em células efectoras, de memória central e infantis identificando-se as populações celulares que possuem antígenos de superfície celular. Os linfócitos CD4⁺ podem ser obtidos por métodos padrão. Em algumas concretizações, os linfócitos T CD4⁺ infantis são células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ ou CD4⁺. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CD62L⁺ e CD45RO⁺. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CD27⁺, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD45RA⁻, e/ou CD45RO⁺. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CD62L⁺ e CD45RO⁺. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CCR7⁺ e CD45RO⁺. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CCR7⁺ e CD45RA⁻. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CD62L⁺ e CCR7⁺. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CD62L⁺/CD45RA⁻, CCR7⁺/CD45RA⁻, CD62L⁺/CCR7⁺, ou CD62L⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻, e possuem intermediário para expressão elevada de CD44. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ de memória central são CD27⁺/CD28⁺/CD62L⁺/CD45RA⁻, CD27⁺/CD28⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻, CD27⁺/CD28⁺/CD62L⁺/CCR7⁺, ou CD27⁺/CD28⁺/CD62L⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻. Em algumas concretizações, as células CD4⁺ efectoras são CD62L⁻ e CD45RO⁻.

[00131] Em um exemplo, para enriquecer células CD4⁺ por seleção negativa, um coquetel de anticorpo monoclonal tipicamente inclui anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, e CD8. Em algumas concretizações, o anticorpo ou parceiro de ligação é ligado a uma matriz ou suporte sólido, tal como uma conta magnética ou conta paramagnética, para permitir a separação das células por seleção positiva e/ou negativa. Por exemplo, em algumas concretizações, as células e as populações celulares são separadas ou isoladas empregando-se

técnicas de separação imunomagnéticas (ou afinidade magnética) (revisito em *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior in vitro and in vivo*, p 17-25 Editado por: S. A. Brooks e U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[00132] Em alguns aspectos, a composição ou amostra incubada de células a serem separadas é incubada com um reagente de seleção contendo pequeno material magneticamente responsivo ou magnetizável, tais como micropartículas ou partículas magneticamente responsivas, tais como contas paramagnéticas (por exemplo, tais como Dynalcontas ou contas MACS®). O material magneticamente responsivo, por exemplo, partícula, geralmente é diretamente ou indiretamente ligado a um parceiro de ligação, por exemplo, um anticorpo, que especificamente se liga a uma molécula, por exemplo, marcador de superfície, presente na célula, células, ou população de células que são desejadas para separar, por exemplo, que são desejadas para selecionar negativamente ou positivamente.

[00133] Em algumas concretizações, as contas ou partículas magnéticas compreendem um material magneticamente responsivo ligado a um membro de ligação específico, tal como um anticorpo ou outro parceiro de ligação. Existem muitos materiais magneticamente responsivos bem conhecidos empregados em métodos de separação magnéticos. As partículas magnéticas adequadas incluem aquelas descritas em Molday, Patente dos Estados Unidos nº 4.452.773, e na Patente de Especificação Europeia EP 452342 B, as quais são incorporadas aqui por referência. As partículas de tamanho coloidal, tais como aquelas descritas na Patente dos Estados Unidos Owen nº 4.795.698, e Liberti e outro(s), Patente dos Estados Unidos nº 5.200.084 são outros exemplos.

[00134] A incubação geralmente é realizada sob condições em que os anticorpos ou parceiros de ligação, ou moléculas, tais como anti-

corpos secundários ou outros reagentes, os quais especificamente ligam-se a tais anticorpos ou parceiros de ligação, os quais são ligados às contas ou partículas magnéticas, especificamente ligam-se às moléculas de superfície celular, se presente nas células dentro da amostra.

[00135] Em certas concretizações, as partículas magneticamente responsivas são revestidas em anticorpos primários ou outros parceiros de ligação, anticorpos secundários, lectinas, enzimas, ou estreptavidina. Em certas concretizações, as partículas magnéticas são ligadas às células por meio de um revestimento de anticorpos primários específicos para um ou mais marcadores. Em certas concretizações, as células, ao invés das contas, são rotuladas com um anticorpo primário ou parceiro de ligação, e em seguida partículas magnéticas revestidas por anticorpo secundário específico de tipo de célula ou outro parceiro de ligação (por exemplo, estreptavidina), são adicionadas. Em certas concretizações, as partículas magnéticas revestidas por estreptavidina são empregadas em conjunto com anticorpos primários ou secundários biotinilados.

[00136] Em alguns aspectos, a separação é alcançada em um procedimento em que a amostra é colocada em um campo magnético, e aquelas células tendo partículas magnetizáveis ou magneticamente responsivas ligadas a ela será ligada ao magneto e separada das células não rotuladas. Para seleção positiva, as células que são ligadas ao magneto são retidas; para seleção negativa, as células que não são ligadas (células não rotuladas) são retidas. Em alguns aspectos, uma combinação de seleção positiva e negativa é realizada durante a mesma etapa de seleção, onde as frações positivas e negativas são retidas e também processadas ou sujeitas a outras etapas de separação.

[00137] Em algumas concretizações, a seleção com base na afini-

dade é por meio de separação celular ativada por magnético (MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). A separação celular ativada por magnético (MACS), por exemplo, os sistemas CliniMACS são capazes de seleção de alta pureza de células tendo partículas magnetizadas ligadas a eles. Em certas concretizações, MACS opera em um modo em que as espécies não alvo e alvo são sequencialmente eluídas após a aplicação do campo magnético externo. Isto é, as células ligadas às partículas magnetizadas são mantidas no lugar ao mesmo tempo que as espécies não ligadas são eluídas. Em seguida, após esta primeira etapa de eluição ser concluída, as espécies que foram capturadas no campo magnético e foram prevenidas de serem eluídas, são libertadas de alguma maneira, tal que elas possam ser eluídas e recuperadas. Em certas concretizações, as células não alvo são rotuladas e esgotadas da população heterogênea das células.

[00138] Em algumas concretizações, as partículas magneticamente responsivas são deixadas ligadas às células que devem ser subsequentemente incubadas, cultivadas e/ou modificadas; em alguns aspectos, as partículas são deixadas ligadas às células para administração a um paciente. Em algumas concretizações, as partículas magnetizáveis ou magneticamente responsivas são removidas das células. Os métodos para remover as partículas magnetizáveis das células são conhecidas e incluem, por exemplo, o uso de anticorpos não rotulados de competição, partículas magnetizáveis ou anticorpos conjugados aos ligadores cliváveis, etc. Em algumas concretizações, as partículas magnetizáveis são biodegradáveis.

[00139] Em alguns aspectos, a separação e/ou outras etapas são realizadas empregando-se o sistema CliniMACS (Miltenyi Biotec), por exemplo, para separação automática de células em um nível de escala clínico em um sistema fechado e estéril. Os componentes podem incluir um microcomputador integrado, unidade de separação magnética,

bomba peristáltica, e várias válvulas de compressão. O computador integrado em alguns aspectos controla todos os componentes do instrumento e direcionam o sistema para realizar procedimentos repetidos em uma sequência padronizada. A unidade de separação magnética em alguns aspectos inclui um magneto permanente móvel e um suporte para a coluna de seleção. A bomba de peristáltica controla a taxa de fluxo através da tubulação e, junto com as válvulas de compressão, garantir o fluxo controlado do tampão através do sistema e suspensão contínua das células.

[00140] O sistema CliniMACS em alguns aspectos usa partículas magnetizáveis acopladas ao anticorpo que são fornecidas em uma solução estéril não pirogênica. Em algumas concretizações, após a rotulagem das células com as partículas magnéticas, as células são lavadas para remover o excesso de partículas. Uma bolsa de preparação celular é em seguida conectada à tubulação, a qual por sua vez é conectada a uma bolsa contendo o tampão e uma bolsa de coleta de célula. A tubulação consiste em uma tubulação estéril pré-montada, incluindo uma pré-coluna e uma coluna de separação, e são apenas para uso único. Após o início do programa de separação, o sistema automaticamente aplica a amostra celular na coluna de separação. As células rotuladas são retidas dentro da coluna, ao mesmo tempo que as células não rotuladas são removidas por uma série de etapas de lavagem. Em algumas concretizações, as populações celulares, para o uso com os métodos descritos aqui, são não rotuladas e não são retidas na coluna. Em algumas concretizações, as populações celulares para o uso com os métodos descritos aqui são rotuladas e são retidas na coluna. Em algumas concretizações, as populações celulares, para o uso com os métodos descritos aqui, são eluídas da coluna após a remoção do campo magnético, e são coletadas dentro da bolsa de coleta celular.

[00141] Em certas concretizações, a separação e/ou outras etapas são realizadas empregando-se o sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). O sistema CliniMACS Prodigy, em alguns aspectos, é equipado com uma unidade de processamento celular que permite a lavagem automática e o fracionamento das células por centrifugação. O sistema CliniMACS Prodigy pode também incluir uma câmara *onboard* e um *software* de reconhecimento de imagem que determina a meta de fracionamento celular ideal discernindo-se as camadas macroscópicas da fonte do produto celular. Por exemplo, o sangue periférico é automaticamente separado em eritrócitos, células brancas do sangue e camadas de plasma. O sistema CliniMACS Prodigy pode também incluir uma câmara de cultivo celular integrada que realiza os protocolos de cultura celular tal como, por exemplo, expansão e diferenciação celular, carregamento de antígeno, e cultura celular de longo prazo. As portas de entrada podem permitir a remoção estéril e o reabastecimento de meios e as células podem ser monitoradas empregando-se um microscópio integrado. Ver, por exemplo, Klebanoff e outro(s) (2012) *J Immunother.* 35(9): 651–660, Terakura e outro(s) (2012) *Blood.* 1:72–82, e Wang e outro(s) (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

[00142] Em algumas concretizações, a população celular descrita aqui é coletada e enriquecida (ou esgotada) por meio de citometria de fluxo, em que as células manchadas por múltiplos marcadores de superfície celular são carregadas em uma corrente fluídica. Em algumas concretizações, uma população celular descrita aqui é coletada e enriquecida (ou esgotada) por meio de separação de escala preparativa (FACS). Em certas concretizações, uma população celular descrita aqui é coletada e enriquecida (ou esgotada) pelo uso de *chips* de sistemas microeletromecânicos (MEMS) em combinação com um sistema de detecção com base em FACS (ver, por exemplo, WO 2010/033140, Cho e outro(s) (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; e Godin e outro(s)

(2008) *J Biophoton*. 1(5):355–376. Em ambos os casos, as células podem ser rotuladas com múltiplos marcadores, permitindo o isolamento de subgrupos de célula T bem definidos em alta pureza.

[00143] Em algumas concretizações, os anticorpos ou parceiros de ligação são rotulados com um ou mais marcadores detectáveis, para facilitar a separação por seleção positiva e/ou negativa. Por exemplo, a separação pode ser baseada na ligação aos anticorpos fluorescentemente rotulados. Em alguns exemplos, a separação de células com base na ligação de anticorpos ou outros parceiros de ligação específicos para um ou mais marcadores de superfície celular são carregados em uma corrente fluídica, tal como por separação celular ativada por fluorescência (FACS), incluindo escala preparativa (FACS) e/ou *chips* de sistemas microeletromecânicos (MEMS), por exemplo, em combinação com um sistema de detecção citométrica de fluxo. Tais métodos permitem a seleção positiva e negativa com base em marcadores múltiplos simultaneamente.

[00144] Em algumas concretizações, o isolamento e/ou a seleção resultam em uma ou mais composições de células T enriquecidas, por exemplo, células T CD3+, células T CD4+, e/ou células T CD8+. Em algumas concretizações, duas ou mais composições separadas de células T enriquecidas são isoladas, selecionadas, enriquecidas, ou obtidas da amostra biológica única. Em algumas concretizações, as composições separadas são isoladas, selecionadas, enriquecidas e/ou obtidas de amostras biológicas separadas coletadas, tiradas e/ou obtidas do mesmo indivíduo.

[00145] Em certas concretizações, o isolamento e/ou seleção resultam em uma ou mais composições de células T enriquecidas que incluem pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos,

ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou cerca de 100% células T CD3+. Em uma concretização particular, a composição de células T enriquecidas consiste essencialmente em células T CD3+.

[00146] Em certas concretizações, o isolamento e/ou o enriquecimento resultam em composições de células T CD4+ enriquecidas que incluem pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou a, ou cerca de 100% de células T CD4+. Em certas concretizações, a composição de entrada de células T CD4+ inclui menos do que a, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 35%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 25%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 15%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 0,1%, ou menos do que a, ou cerca de 0,01% células T CD8+, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+. Em algumas concretizações, a composição de células T enriquecidas consiste essencialmente em células T CD4+.

[00147] Em certas concretizações, o isolamento e/ou enriquecimento resultam em composições de células T CD8+ enriquecidas, que incluem pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de

99.5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou a, ou cerca de 100% de células T CD8+. Em certas concretizações, a composição de células T CD8+ contém menos do que a, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 35%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 25%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 15%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 0,1%, ou menos do que a, ou cerca de 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém nenhuma célula T CD4+, e/ou é livre de ou substancialmente livre de células T CD4+. Em algumas concretizações, a composição de células T enriquecidas consiste essencialmente em células T CD8+.

[00148] Em algumas concretizações, uma ou mais composições de células T enriquecidas são congeladas, por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, após o isolamento, seleção e/ou enriquecimento. Em concretizações particulares, uma composição de células T CD4+ enriquecidas são congeladas, por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, após o isolamento, seleção e/ou enriquecimento. Em certas concretizações, uma composição de células T CD8+ enriquecidas são congeladas, por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, após o isolamento, seleção e/ou enriquecimento. Em algumas concretizações, uma ou mais composições de células T enriquecidas são congeladas por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, antes de quaisquer etapas de incubação, ativação, estimulação, modificação, transdução, transfecção, cultivo, expansão, colheita, e/ou formulação de uma composição de células. Em concretizações particulares, uma composição de células T CD4+ enriquecidas são congeladas por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, antes de quaisquer etapas de incubação, ativação, estimulação, modificação, transdução, transfecção, cultivo, expansão, colheita, e/ou formulação a composição de células. Em algumas concretizações, uma composição de célu-

las T CD8+ enriquecidas são congeladas, por exemplo, crioconservadas e/ou criocongeladas, antes de quaisquer etapas de incubação, ativação, estimulação, modificação, transdução, transfecção, cultivo, expansão, colheita, e/ou formulação de uma composição de células. Em concretizações particulares, uma ou mais composições criocongeladas de entrada são armazenadas, por exemplo, a, ou cerca de -80°C, entre 12 horas e 7 dias, entre 24 horas e 120 horas, ou entre 2 dias e 5 dias. Em concretizações particulares, uma ou mais composições criocongeladas de entrada são armazenadas a, ou cerca de -80°C, durante um período de tempo de menos do que 10 dias, 9 dias, 8 dias, 7 dias, 6 dias, ou 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias, ou 1 dia. Em algumas concretizações, uma ou mais composições criocongeladas de entrada são armazenadas a, ou cerca de -80°C, por, ou por cerca de 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, ou 6 dias.

[00149] Em algumas concretizações, a amostra contendo células (por exemplo, um produto aferese ou um produto de leucaferese) é lavada a fim de remover um ou mais anti-coagulantes, tal como heparina, adicionado durante a aferese ou leucaferese.

[00150] Em algumas concretizações, a amostra contendo células (por exemplo, uma amostra de sangue total, uma amostra da camada leucocitária, uma amostra de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), uma amostra de célula T não fracionada, uma amostra de linfócito, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aferese, ou um produto de leucaferese) é crioconservada e/ou crioprotégida (por exemplo, congelada) e em seguida descongelada antes de quaisquer etapas para isolar, selecionar, ativar, estimular, modificar, transduzir, transfectar, incubar, cultivar, colher, formular uma população das células, e/ou administrar a população de célula formulada a um indivíduo.

[00151] Em concretizações particulares, um produto aferese ou um

produto de leucaferese é crioconservado e/ou crioprotegido (por exemplo, congelado) e em seguida descongelado antes de ser submetido a uma seleção celular ou etapa de isolamento (por exemplo, uma seleção de célula T ou etapa de isolamento) como descrito *infra*. Em algumas concretizações, após um produto aferese ou produto leucaferese crioconservado e/ou crioprotegido ser submetido a uma seleção de célula T ou etapa de isolamento, nenhuma etapa adicional de crioconservação e/ou crioproteção é realizada durante ou entre qualquer uma das etapas subsequentes, tais como as etapas de ativação, estimulação, modificação, transdução, transfecção, incubação, cultura, colheita, formulação de uma população das células, e/ou administração da população de célula formulada a um indivíduo. Por exemplo, as células T selecionadas de um produto aferese ou produto leucaferese descongelado crioconservado e/ou crioprotegido não são novamente crioconservadas e/ou crioprotegidas antes de serem descongeladas para um processo a jusante, tal como ativação/estimulação de célula T ou transdução.

[00152] Em concretizações particulares, produto aferese ou produto leucaferese crioconservado e/ou crioprotegido é depositado (por exemplo, sem seleção de célula T antes de congelar a amostra), o qual, em alguns aspectos, pode permitir mais flexibilidade para as etapas de fabricação subsequentes. Em um aspecto, as células depositárias antes da seleção aumenta a produção de célula para um processo a jusante, e as células depositadas mais cedo pode significar que elas são mais saudáveis e podem ser mais fácil de encontrar os critérios para o sucesso na fabricação. Em outro aspecto, uma vez descongelado, o produto aferese ou produto leucaferese crioconservado e/ou crioprotegido pode ser submetido a um ou mais diferentes métodos de seleção. As vantagens destes métodos são, entre outras coisas, realçar a capacidade, eficácia e/ou outros aspectos das células de uma

terapia celular para o tratamento de uma doença ou condição de um indivíduo, tal como no doador de uma amostra e/ou outro recebedor.

[00153] Em algumas concretizações, a amostra (por exemplo, amostra aferese ou leucaferese) é coletada e crioconservada e/ou crioprotegida antes ou sem seleção celular anterior (por exemplo, sem a seleção de célula T anterior, tal como a seleção por cromatografia), em um tempo após o doador ser diagnosticado com uma doença ou condição. Em alguns aspectos, o tempo de crioconservação também é antes do doador ter recebido um ou mais do seguinte: qualquer tratamento inicial para uma doença ou condição, qualquer tratamento alvejado ou qualquer tratamento rotulado para o tratamento de uma doença ou condição, ou qualquer tratamento diferente de radiação e/ou quimioterapia. Em algumas concretizações, a amostra é coletada após uma primeira recaída de uma doença após o tratamento inicial para uma doença, e antes do doador ou indivíduo receber o tratamento subsequente para a doença. Os tratamentos iniciais e/ou subsequentes podem ser uma terapia diferente de uma terapia celular. Em algumas concretizações, as células coletadas podem ser empregadas em uma terapia celular após os tratamentos inicial e/ou subsequente. Em um aspecto, a amostra crioconservada e/ou crioprotegida sem seleção celular anterior pode ajudar a reduzir os custos na frente, tais como aqueles associados com os pacientes de não tratamento em um ensaio clínico randomizado que pode cruzar e requerer tratamento mais tarde.

[00154] Em algumas concretizações, a amostra (por exemplo, amostra aferese ou leucaferese) é coletada e crioconservada e/ou crioprotegida antes ou sem seleção celular anterior (por exemplo, sem seleção de célula T, tal como seleção por cromatografia), em um tempo após uma segunda recaída de uma doença após uma segunda linha de tratamento para a doença, e antes do doador ou indivíduo re-

ceber subsequente tratamento para a doença. Em algumas concretizações, os pacientes são identificados como sendo provável recair após uma segunda linha de tratamento, por exemplo, por avaliar certos fatores de risco. Em algumas concretizações, os fatores de risco são baseados no tipo da doença e/ou genética, tal como linfoma de duplo golpe, câncer refratário primário, ou linfoma de célula B. Em algumas concretizações, os fatores de risco são baseados na apresentação clínica, tal como recaída cedo após a primeira linha de tratamento, ou outros indicadores prognósticos ruins após o tratamento (por exemplo, IPI (Índice de Prognóstico Internacional) > 2).

[00155] Em algumas concretizações, a amostra (por exemplo, amostra aferese ou leucaferese) é coletada e crioconservada e/ou crioprotetida antes ou sem seleção celular anterior (por exemplo, sem seleção anterior de célula T, tal como seleção por cromatografia), em um tempo antes do doador ou indivíduo ser diagnosticado com a doença. Em alguns aspectos, o doador ou indivíduo pode ser determinado estar em risco para desenvolver a doença. Em alguns aspectos, o doador ou indivíduo pode ser um indivíduo saudável. Em certos casos, o doador ou indivíduo pode eleger depositar ou armazenar as células sem considerar em risco para desenvolver a doença o user diagnosticado com uma doença no evento que a terapia celular é requerida em um estágio posterior na vida. Em algumas concretizações, um doador ou indivíduo pode ser considerado em risco para desenvolver uma doença com base em fatores tais como, mutações genéticas, anormalidades genéticas, disrupções genéticas, histórico familiar, anormalidades de proteína (tais como deficiências com a produção de proteína e/ou processamento), e mudanças no estilo de vida que podem aumentar o risco de desenvolver uma doença. Em algumas concretizações, as células são coletadas como um profilático.

[00156] Em algumas concretizações, a amostra crioconservada

e/ou crioprottegida das células (por exemplo, amostra aferese ou leucaferese), tal como uma amostra de células que não foram submetidas a uma seleção celular anterior (por exemplo, sem seleção anterior de célula T, tal como seleção por cromatografia) é armazenada ou depositada durante um período de tempo maior que ou igual a, ou cerca de 12 horas, 24 horas, 36 horas, ou 48 horas. Em algumas concretizações, a amostra é armazenada ou depositada durante um período de tempo maior que ou igual a 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, ou 4 semanas. Em algumas concretizações, a amostra é colocada em armazenagem a longo prazo ou depósito a longo prazo. Em alguns aspectos, a amostra é armazenada durante um período de tempo maior que ou igual a, ou cerca de 1 mês, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 ano, 2 anos, 3 anos, 4 anos, 5 anos, 6 anos, 7 anos, 8 anos, 9 anos, 10 anos, 11 anos, 12 anos, 13 anos, 14 anos, 15 anos, 16 anos, 17 anos, 18 anos, 19 anos, 20 anos, 25 anos, 30 anos, 35 anos, 40 anos, ou mais.

[00157] Em algumas concretizações, uma amostra aferese ou leucaferese tirada de um doador é enviada em um meio resfriado para uma facilidade de armazenagem ou processamento, e/ou criogenicamente armazenada na facilidade de armazenagem ou processada na facilidade de processamento. Em algumas concretizações, antes de enviar, a amostra é processada, por exemplo, selecionando-se as células T, tal como CD4+ e/ou células T CD8+. Em algumas concretizações, tal processamento é realizado após enviar e antes de criogenicamente armazenar a amostra. Em algumas concretizações, o processamento é realizado após descongelar a amostra após criogenicamente armazenar.

[00158] Permitindo aos doadores armazenarem suas células em um estágio quando os doadores, e desse modo suas células, não terem

sofrido tratamento extensivo para uma doença e/ou antes de contrair uma doença ou condição ou diagnose desta, tais células podem ter certas vantagens para o uso na terapia celular comparadas com as células colhidas após um ou após múltiplas rodadas de tratamento. Por exemplo, as células colhidas antes de uma ou mais rodadas de tratamento podem ser mais saudáveis, podem exibir níveis maiores de certas atividades celulares, podem se desenvolver mais rapidamente e/ou podem ser mais receptivas para manipulação genética do que as células que sofreram várias rodadas de tratamento. Outro exemplo de uma vantagem de acordo com as concretizações descritas aqui pode incluir conveniência. Por exemplo, coletando-se, opcionalmente processando, e armazenando células de doadores antes de elas serem necessárias para a terapia celular, as células estariam facilmente disponíveis se, e quando um recebedor precisar mais tarde delas. Isto poderia aumentar a capacidade laboratorial de aferese, fornecer técnicas com mais flexibilidade para planejar o processo de coleta de aferese.

[00159] Métodos exemplares e sistemas para armazenagem criogênica e processamento de células de uma amostra, tal como uma amostra de aferese, podem incluir aqueles descritos no Pedido Internacional publicado nº WO2018170188. Em algumas concretizações, os métodos e sistemas envolvem coletar aferese antes do paciente precisar da terapia celular, e em seguida submeter a amostra de aferese para criopreservação para o uso posteriormente em um processo para a modificação das células, por exemplo, células T, com um receptor recombinante (por exemplo, CAR). Em alguns casos, tais processos podem incluir aqueles descritos aqui. Em algumas concretizações, uma amostra de aferese é coletada de um indivíduo e criopreservada antes da subsequente seleção de célula T, ativação, estimulação, modificação, transdução, transfecção, incubação, cultura, colheita, formula-

ção de uma população das células, e/ou administração da população de célula formulada a um indivíduo. Em tais exemplos, a amostra de aferese crioconservada é descongelada antes de submeter a amostra a uma ou mais etapas de seleção, tal como qualquer uma como descrito aqui.

[00160] Em algumas concretizações, a amostra crioconservada e/ou crioprotegida das células (por exemplo, amostra aferese ou leucaferese), tal como uma amostra de células que não foi submetida a uma seleção celular anterior (por exemplo, sem seleção anterior de célula T, tal como seleção por cromatografia) é descongelada antes de seu uso para processos a jusante para fabricar uma população de célula para a terapia celular, por exemplo, uma população de célula T contendo células T CAR+. Em algumas concretizações, uma tal amostra crioconservada e/ou crioprotegida das células (por exemplo, amostra de aferese ou leucaferese) é empregada em conexão com o processo fornecido aqui para modificar uma terapia de célula T, tal como uma terapia de célula T CAR+. Em exemplos particulares, nenhuma outra etapa de crioconservação é realizada antes ou durante as etapas de colheita/formulação.

1. Composições de Entrada

[00161] Em certas concretizações, os métodos fornecidos são empregados em conexão com a produção e/ou preparação de uma composição de entrada de células. Em certas concretizações, a composição de célula de entrada é uma composição de células para o uso na modificação genética, por exemplo, células que serão geneticamente modificadas e/ou que sofrerão um processo para produzir células geneticamente modificadas. Em certas concretizações, as células serão tratadas com, contatadas com, e/ou incubadas com um ácido nucleico que codifica um receptor recombinante. Em certas concretizações, a composição de célula de entrada contém células T CD4+ e células T

CD8+. Em concretizações particulares, a composição de célula de entrada contém células T CD4+ e células T CD8+ que são células T virgens e/ou tipo virgens.

[00162] Em algumas concretizações, a relação desejada, fixa e/ou controlada é a relação ou número de células em que dois tipos de células ou populações celulares isoladas são incluídas em uma composição de célula de entrada, designada para resultar em uma composição de célula de saída com uma relação desejada, definida e/ou controlada de CD4+ modificado para células T CD8+, ou dentro de uma taxa de erro tolerada ou diferente desta, na conclusão de uma etapa de incubação e/ou modificação ou outras etapas de processamento e/ou após o degelo e/ou logo antes da administração a um indivíduo.

[00163] Em concretizações particulares, a composição de entrada é uma composição de células T CD3+ enriquecidas. Em algumas concretizações, a composição de entrada é ou inclui pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99.5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou a, ou cerca de 100% células T CD3+. Em algumas concretizações, a composição de entrada consiste essencialmente em células T CD3+. Em certas concretizações, a composição de entrada é uma composição de células enriquecidas para células enriquecidas T CD4+ e células T CD8+. Em concretizações particulares, a composição de entrada é ou inclui pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos,

ou cerca de 99.5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou a, ou cerca de 100% de células que são CD4+ ou CD8+T células. Em algumas concretizações, a composição de entrada consiste essencialmente em células T CD4+ e CD8+.

[00164] Em concretizações particulares, a composição de entrada contém entre, ou de cerca de 30% e a, ou cerca de 70%, entre, ou de cerca de 35% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 60%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 55%, ou cerca de 50% ou 50% de células T CD4+ e entre, ou de cerca de 30% e a, ou cerca de 70%, entre, ou de cerca de 35% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 60%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 55%, ou cerca de 50% ou 50% células T CD8+. Em certas concretizações, a composição de entrada contém entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 55%, cerca de 50%, ou 50% de células T CD4+ e entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 55%, cerca de 50%, ou 50% células T CD8+.

[00165] Em algumas concretizações, pelo menos uma composição separada de células T CD4+ enriquecidas e pelo menos uma composição separada de células T CD8+ enriquecidas são isoladas, selecionadas, enriquecidas ou obtidas da amostra biológica única, por exemplo, uma amostra de PBMCs ou outras células brancas do sangue do mesmo doador tal como um paciente ou indivíduo saudável. Em algumas concretizações, uma composição separada de células T CD4+ enriquecidas e a composição separada de células T CD8+ enriquecidas originadas, por exemplo, foram inicialmente isoladas, selecionadas e/ou enriquecidas, da mesma amostra biológica, tal como uma amostra biológica única obtida, coletada e/ou tirada de um único indivíduo. Em algumas concretizações, uma amostra biológica é primeiro submetida à seleção de células T CD4+, onde ambas as frações negativas e positivas são retidas, e a fração negativa é também submetida à sele-

ção de células T CD8+. Em outras concretizações, uma amostra biológica é primeiro submetida à seleção de células T CD8+, onde ambas as frações negativas e positivas são retidas, e a fração negativa é também submetida à seleção de células T CD4+. Em algumas concretizações, os métodos de seleção são realizados como descrito na Publicação Internacional PCT Nº WO2015/164675. Em alguns aspectos, uma amostra biológica é primeiro positivamente selecionada para células T CD8+ para gerar pelo menos uma composição de células T CD8+ enriquecidas, e a fração negativa é em seguida positivamente selecionada para células T CD4+ para gerar pelo menos uma composição de células T CD4+ enriquecidas, tal que pelo menos uma composição de células T CD8+ enriquecidas e pelo menos uma composição de células T CD4+ enriquecidas são composições separadas da mesma amostra biológica, por exemplo, do mesmo doador ou indivíduo saudável. Em alguns aspectos, duas ou mais composições separadas de células T enriquecidas, por exemplo, pelo menos uma sendo uma composição de células T CD4+ enriquecidas e pelo menos uma sendo uma composição separada de células T CD8+ enriquecidas do mesmo doador, são separadamente congeladas, por exemplo, criocongeladas ou crioconservadas em um meio de crioconservação. Em alguns aspectos, as composições celulares separadamente crioconservadas são armazenadas e/ou enviadas em recipientes separados em um ou mais envios. Em alguns aspectos, as composições celulares separadamente crioconservadas são descongeladas e opcionalmente lavadas.

[00166] Em alguns aspectos, duas ou mais composições separadas de células T enriquecidas, por exemplo, pelo menos uma sendo uma composição de células T CD4+ enriquecidas e pelo menos uma sendo uma composição separada de células T CD8+ enriquecidas da mesma amostra biológica, são descongeladas e misturadas, combinadas e/ou

agrupadas e as composições podem ser opcionalmente lavadas antes ou após a mistura, combinação e/ou agrupamento. Em alguns aspectos, as composições misturadas, combinadas e/ou agrupadas e opcionalmente lavadas de células T enriquecidas formam uma composição de entrada. Em alguns aspectos, a composição de entrada (por exemplo, compreendendo células T CD4+ e células T CD8+ em uma relação de, ou de cerca de 1:1) é ativada e/ou estimulada contatando-se com um reagente estimulatório (por exemplo, por incubação com contatos magnéticas conjugadas CD3/CD28 para a ativação de célula T), e o volume de uma composição celular da ativação/estimulação é opcionalmente ajustado, por exemplo, reduzido, a fim de obter um volume alvo. Em alguns aspectos, a composição celular ativada/estimulada é modificada, transduzida e/ou transfectada, por exemplo, empregando-se um vetor retroviral codificando uma proteína recombinante (por exemplo, CAR), para expressar a mesma proteína recombinante em células T CD4+ e células T CD8+ da composição celular. Em alguns aspectos, o volume de uma composição celular a partir da modificação é opcionalmente ajustado, por exemplo, reduzido, a fim de obter um volume alvo. Em alguns aspectos, o método compreende remover o reagente estimulatório, por exemplo, contatos magnéticas, da composição celular. Em alguns aspectos, uma composição celular contendo células T modificadas CD4+ e células modificadas T CD8+ é cultivada, por exemplo, para expansão da célula T CD4+ e/ou populações de célula T CD8+ nela. Em certas concretizações, uma composição celular do cultivo é colhida e/ou coletada e/ou formulada, por exemplo, lavando-se a composição celular em um tampão de formulação. Em certas concretizações, uma composição celular formulada compreendendo células T CD4+ e células T CD8+ é congelada, por exemplo, criocongelada ou crioconservada em um meio de crioconservação. Em alguns aspectos, a formulação crioconservada pode ser armazenada

e/ou enviada em um ou mais recipientes. Em alguns aspectos, as células T CD4+ modificadas e as células T CD8+ na formulação originada do mesmo doador ou amostra biológica e expressam a mesma proteína de recombinação (por exemplo, CAR), e a formulação é administrada a um indivíduo em necessidade desta tal como o mesmo doador.

[00167] Em concretizações particulares, a composição de entrada contém uma relação entre 3:1 e 1:3, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5 e 0,75, entre 1,25 e 0,75, ou entre 1,2 e 0,8 células T CD4+ para as células T CD8+. Em certas concretizações, a composição de entrada contém uma relação de, ou de cerca de 1:1 células T CD4+ para as células T CD8+.

[00168] Em algumas concretizações, as células de uma composição de células T CD4+ enriquecidas e células de uma composição de células T CD8+ enriquecidas são misturadas, combinadas e/ou agrupadas para gerar uma composição de entrada contendo células T CD4+ e células T CD8+. Em certas concretizações, as composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ são agrupadas, misturadas e/ou combinadas antes da incubação das células sob condições de estimulação. Em certas concretizações, as composições de células T CD4+ enriquecidas e CD8+ são agrupadas, misturadas, e/ou combinadas subsequente ao isolamento, enriquecimento e/ou seleção de células T CD4+ e CD8+ de uma amostra biológica. Em concretizações particulares, as composições de células T CD4+ enriquecidas e CD8+ são agrupadas, misturadas, e/ou combinadas subsequente ao congelamento, por exemplo, criocongelamento, e o descongelamento das composições de células T CD4+ enriquecidas e CD8+.

[00169] Em certas concretizações, a composição de entrada é produzida, gerada ou feita por mistura, agrupamento e/ou combinação das células de uma composição de células CD4+ enriquecidas com células de uma composição de células CD8+ enriquecidas. Em certas

concretizações, a composição de células T CD4+ enriquecidas contém pelo menos, ou cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou 99,9% de células T CD4+. Em concretizações particulares, a composição de células T CD4+ enriquecidas contém 100% de células T CD4+ ou contém cerca de 100% de células T CD4+. Em certas concretizações, a composição de células T enriquecidas inclui ou contém menos do que a, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 0,1%, ou menos do que a, ou cerca de 0,01% células T CD8+, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+. Em algumas concretizações, as populações de células consistem essencialmente em células T CD4+. Em certas concretizações, a composição de células T CD8+ enriquecidas contém pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou 99,9% células T CD8+, ou contém cerca de 100% de células T CD8+. Em certas concretizações, a composição de células T CD8+ enriquecidas inclui ou contém menos do que a, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 0,1%, ou menos do que a, ou cerca de 0,01% de células T CD4+, e/ou contém no células T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+. Em algumas concretizações, as populações de células consistem essencialmente em células T CD8+.

[00170] Em certas concretizações, células T CD4+ e células T CD8+ são agrupadas, misturadas, e/ou combinadas em uma relação entre 1:10 e 10:1, entre 1:5 e 5:1, entre 4:1 e 1:4, entre 3:1, entre 1:3 e 3:1, entre 2:1 e 1:2, entre 1.5:1 e 1:1.5, entre 1.25:1 e 1:1.25, entre 1,2:1 e 1:1,2, entre 1,1:1 e 1:1,1, ou cerca de 1:1 ou 1:1 células T CD4+ para as células T CD8+. Em concretizações particulares, as células T CD4+ e células T CD8+ são agrupadas, misturadas, e/ou com-

binadas em uma relação entre 2:1 e 1:2, entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,25:1 e 1:1,25, entre 1,2:1 e 1:1,2, entre 1,1:1 e 1:1,1, ou cerca de 1:1 ou 1:1 células T CD4+ para as células T CD8+. Em algumas concretizações, as células T CD4+ e células T CD8+ são agrupadas, misturadas e/ou combinadas em uma relação de, ou de cerca de 1:1 células T CD4+ para as células T CD8+.

[00171] Em algumas concretizações, as células das composições de células T CD4+ enriquecidas e uma composição de células T CD8+ enriquecidas são agrupadas, misturadas, e/ou combinadas em uma relação entre 1:10 e 10:1, entre 1:5 e 5:1, entre 4:1 e 1:4, entre 3:1, entre 1:3 e 3:1, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,25:1 e 1:1,25, entre 1,2:1 e 1:1,2, entre 1,1:1 e 1:1,1, ou cerca de 1:1 ou 1:1 células T CD4+ para células T CD8+. Em concretizações particulares, células das composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ são agrupadas, misturadas, e/ou combinadas em uma relação entre 2:1 e 1:2, entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,25:1 e 1:1,25, entre 1,2:1 e 1:1,2, entre 1,1:1 e 1:1,1, ou cerca de 1:1 ou 1:1 células T CD4+ para células T CD8+. Em algumas concretizações, células de composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ são agrupadas, misturadas e/ou combinadas em uma relação de, ou de cerca de 1:1 células T CD4+ para células T CD8+.

[00172] Em certas concretizações, a composição de entrada contém uma relação, por exemplo, uma relação definida, controlada e/ou fixa, células T tipo CD4+ virgem para células T tipo CD8+ virgem. Em concretizações particulares, a relação de células T tipo CD4+ virgem para células T tipo CD8+ virgem é entre 10:1 para 0,05:1, entre 8:1 para 0,1:1, entre 5:1 para 0,2:1, entre 2,5:1 para 0,25:1, entre 2,2:1 para 0,8:1, entre 2:1 a 0,5:1, ou entre 1,5:1 para 1:1, inclusive. Em concretizações particulares, a relação de células T tipo CD4+ virgem para células T tipo CD8+ virgem é entre 2:1 a 0,8:1, entre 1,6:1 a 0,8:1, entre

1,4:1 a 0,8:1, entre 1,2:1 a 0,8:1, ou entre 1,2:1 a 0,8:1, inclusive. Em algumas concretizações, a relação é entre 2,2:1 a 0,8:1, inclusive. Em certas concretizações, a relação de células T tipo CD4+ virgem para células T tipo CD8+ virgem é de, ou é de, ou de cerca de 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, ou 0,8:1. Em certas concretizações, a relação é de, ou é de, ou de cerca de 1.1:1.

[00173] Em concretizações particulares, a composição de entrada possui uma quantidade de, ou cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células totais ou células viáveis totais. Em certas concretizações, a composição de entrada possui uma quantidade de ou cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células que expressam CD4 ou CD8. Em algumas concretizações, a composição de entrada possui uma quantidade de ou cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células CD4+ tipo virgem e células T CD8+ tipo virgem.

[00174] Em concretizações particulares, a composição de entrada possui entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 1×10^{10} , entre, ou de cerca de 1×10^7 e a, ou cerca de 1×10^9 , entre, ou de cerca de

5×10^7 e a, ou cerca de 5×10^8 , ou entre, ou de cerca de 1×10^8 e a, ou cerca de 3×10^8 de células totais ou células viáveis totais. Em certas concretizações, a composição de entrada possui uma quantidade de ou cerca de entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 1×10^{10} , entre, ou de cerca de 1×10^7 e a, ou cerca de 1×10^9 , entre, ou de cerca de 5×10^7 e a, ou cerca de 5×10^8 , ou entre, ou de cerca de 1×10^8 e a, ou cerca de 3×10^8 células que expressam CD4 ou CD8. Em algumas concretizações, a composição de entrada possui uma quantidade de ou cerca de entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 1×10^{10} , entre, ou de cerca de 1×10^7 e a, ou cerca de 1×10^9 , entre, ou de cerca de 5×10^7 e a, ou cerca de 5×10^8 , ou entre, ou de cerca de 1×10^8 e a, ou cerca de 3×10^8 de CD4+ tipo virgem e a, ou cerca de células T CD8+ tipo virgem.

[00175] Em algumas concretizações, a composição de entrada possui ou contém pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 96%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou 100% ou cerca de 100% de células tipo virgem. Em concretizações particulares, a composição de entrada contém ou inclui não mais do que, ou cerca de 100%, não mais do que, ou cerca de 99%, não mais do que, ou cerca de 98%, não mais do que, ou cerca de 97%, não mais do que, ou cerca de 96%, não mais do que, ou cerca de 95%, não mais do que, ou cerca de 90%, ou não mais do que a, ou cerca de 85% de células tipo virgem.

[00176] Em concretizações particulares, os métodos fornecidos aqui incluem uma ou mais etapas de produzir, gerar e/ou preparar uma composição de entrada. Em certas concretizações, a produção, geração e/ou preparação de uma composição de entrada inclui uma ou mais etapas de misturar ou combinar as células de uma composição de células T CD4+ com células de uma composição de células T CD8+.

[00177] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células T CD4+ células T CD8+, da composição de entrada foram isoladas e/ou selecionadas de uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em certas concretizações, a fonte das células da composição de entrada são composições de células, por exemplo, composições de CD4+ e células T CD8+, que foram isoladas e/ou selecionadas da amostra. Em concretizações particulares, a composição de células T CD4+ e a composição de células T CD8+ são isoladas e/ou selecionadas da amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em certas concretizações, a composição de células T CD4+ e a composição de células T CD8+ são isoladas e/ou selecionadas da mesma amostra. Em certas concretizações, a composição de células T CD4+ e a composição de células T CD8+ são isoladas e/ou selecionadas das amostras tiradas ou obtidas do mesmo indivíduo.

[00178] Em concretizações particulares, a composição de células T CD4+ contém ou inclui pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 96%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99.5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou 100% ou cerca de 100% de células T CD4+. Em algumas concretizações, a composição de células T CD4+ contém ou inclui não mais do que, ou cerca de

100%, não mais do que, ou cerca de 99%, não mais do que, ou cerca de 98%, não mais do que, ou cerca de 97%, não mais do que, ou cerca de 96%, não mais do que, ou cerca de 95%, não mais do que, ou cerca de 90%, ou não mais do que a, ou cerca de 85% de células T CD4+.

[00179] Em certas concretizações, a composição de células T CD8+ contém ou inclui pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 96%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99.5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou 100% ou cerca de 100% células T CD8+. Em concretizações particulares, a composição de células T CD8+ contém ou inclui não mais do que, ou cerca de 100%, não mais do que, ou cerca de 99%, não mais do que, ou cerca de 98%, não mais do que, ou cerca de 97%, não mais do que, ou cerca de 96%, não mais do que, ou cerca de 95%, não mais do que, ou cerca de 90%, ou não mais do que a, ou cerca de 85% células T CD8+.

[00180] Em certas concretizações, a produção, geração e/ou preparação de uma composição de entrada inclui uma ou mais etapas de avaliar, determinar e/ou quantificar a quantidade, porção, número por volume, número por peso e/ou percentagem de células T CD4+ viáveis e/ou células T CD8+ viáveis que estão presentes na composição de células T CD4+ e/ou a composição de células T CD8+, por exemplo, antes de combinar ou misturar as células da composição celulares. Em concretizações particulares, a produção, geração e/ou preparação de uma composição de entrada inclui uma ou mais etapas de avaliar, determinar e/ou quantificar a quantidade, porção, número, número por volume, número por peso e/ou percentagem de células T CD4+ tipo

virgem e/ou células T CD8+ tipo virgem que estão presentes na composição de células T CD4+ e/ou na composição de células T CD8+. Em algumas concretizações, CD4+ tipo virgem e/ou células T CD8+ tipo virgem são células tipo virgem viáveis.

[00181] Em certas concretizações, a produção, geração e/ou preparação de uma composição de entrada inclui uma ou mais etapas de avaliar, determinar e/ou quantificar a quantidade, porção, número, número por volume, número por peso e/ou percentagem de células T CD4+ viáveis e/ou células viáveis T CD8+ que estão presentes na amostra, por exemplo, a amostra biológica. Em concretizações particulares, a produção, geração e/ou preparação uma composição de entrada inclui uma ou mais etapas de avaliar, determinar e/ou quantificar a quantidade, porção, número, número por volume, número por peso e/ou percentagem de células T CD4+ tipo virgem e/ou células T CD8+ tipo virgem que estão presentes na amostra. Em algumas concretizações, CD4+ tipo virgem e/ou células T CD8+ tipo virgem são células tipo virgem viáveis.

[00182] Em algumas concretizações, as células da composição de entrada são isoladas e/ou selecionadas a partir de uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em concretizações particulares, as porções de células tipo virgens na amostra, por exemplo, porção de células T CD4+ tipo virgem e CD8+ são bem conhecidas ou foram determinadas, medidas ou avaliadas. Em algumas concretizações, as células de uma amostra são isoladas e/ou selecionadas para diretamente produzirem uma composição celular, por exemplo, uma composição de entrada, com uma relação definida, fixa ou controlada de células T CD4+ tipo virgens para células T CD8+ tipo virgens. Em certas concretizações, as células são isoladas e/ou selecionadas com seleção de conta de imunoafinidade. Em algumas concretizações, as células são isoladas e/ou selecionadas com colunas de afinidade. Em con-

cretizações particulares, as células de uma amostra são isoladas ou selecionadas de acordo com qualquer um dos métodos descritos em WO 2015/164675 para produzir uma composição celular com uma relação definida, controlada e/ou fixa de células CD4+ tipo virgens para células CD8+ tipo virgens.

[00183] Em certas concretizações, a composição de entrada contém células que foram diretamente isoladas e/ou selecionadas de uma amostra por um primeiro e segundo isolamento ou seleção. Em certas concretizações, a composição de entrada é produzida realizando-se uma primeira e segunda seleção para isolar uma quantidade, número ou concentração de células T CD4+ e células T CD8+ suficiente para produzir a relação definida, fixa e/ou controlada de células T CD4+ tipo virgens para células T CD8+ tipo virgens.

[00184] Em algumas concretizações, as células a partir de uma amostra são diretamente isoladas, selecionadas e/ou enriquecidas para produzir uma composição de entrada enriquecida por células CD4+ e células CD8+. Em algumas concretizações, a quantidade, número, percentagem, número por volume e/ou número por peso de células CD4+ tipo virgens e células CD8+ tipo virgens foram medidas, avaliadas e/ou determinadas na amostra, e as células CD4+ e CD8+ são isoladas, selecionadas, e/ou enriquecidas em quantidades suficientes para obter uma composição de entrada com uma relação definida, fixa, ou controlada de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens. Em algumas concretizações, as células que são diretamente isoladas, selecionadas e/ou enriquecidas de uma amostra são uma composição de entrada e são empregadas em etapas de processamento subsequentes, tais como etapas de processamento subsequentes envolvendo incubação, estimulação, ativação, modificação e/ou formulação das células enriquecidas.

[00185] Em algumas concretizações, as células isoladas, selecio-

nadas e/ou enriquecidas da amostra, tal como uma composição de entrada, contêm uma relação de células CD4+ para células CD8+ em uma relação definida, fixa, ou controlada de células CD4+ tipo virgens para células CD8+ virgens. Em concretizações dos métodos fornecidos aqui, a primeira e/ou segunda seleções, ou seleções para subpopulações das mesmas, de uma amostra podem ser realizadas de uma maneira a resultar em uma composição de entrada com uma relação desejada de células T CD4+ virgens para células CD8+ virgens.

[00186] Em algumas concretizações, antes da realização da primeira e/ou segunda seleção da amostra, a relação de células T CD4+ para CD8+ na amostra, por exemplo, a amostra biológica é determinada. Em certas concretizações, antes da realização da primeira e/ou segunda seleção, a relação de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens na amostra é determinada. Com base na particular relação de células T CD4+ para CD8+ e/ou células T CD4+ para CD8+ virgens na amostra, que pode variar entre as amostras, o modo de seleção específico pode ser individualizado para a amostra, por exemplo, por dimensionamento de colunas de cromatografia ou seleção da quantidade ou concentração de reagentes de imunoafinidade, para obter a relação desejada, fixa, ou controlada. O nível ou frequência relativa de várias populações celulares em um indivíduo pode ser determinado com base na avaliação da expressão de superfície de um marcador ou marcadores presentes nessas populações ou subpopulações. Um número de métodos bem conhecidos para avaliar o nível de expressão de marcadores ou proteínas de superfície pode ser usado, como detecção por métodos baseados em afinidade, por exemplo, métodos baseados em imunoafinidade, por exemplo, no contexto de proteínas da superfície celular, como por citometria de fluxo.

[00187] Em alguns contextos, a relação apropriada para células T CD4+ e CD8+ virgens pode variar dependendo do contexto, por

exemplo, para uma determinada doença, condição ou tratamento anterior de um indivíduo do qual as células são derivadas, e/ou uma especificidade particular de antígeno das células, representação relativa entre células de um tipo particular (por exemplo, células CD4 +) de várias subpopulações, por exemplo, efetor versus memória versus células virgens, e/ou uma ou mais condições sob as quais as células serão incubadas, meio tal como, agentes estimulantes, tempo de cultura, tampões, conteúdo de oxigênio, conteúdo de dióxido de carbono, antígeno, citocina, anticorpos e outros componentes. Assim, pode ser que um tipo de célula que normalmente ou em geral seja conhecido por proliferar ou expandir mais rapidamente do que outro nem sempre tenha essa propriedade em todos os contextos. Assim, em alguns aspectos, uma relação de células T CD4 + virgens e células T CD8 + virgens é determinada com base nas capacidades conhecidas de tipos de células em um contexto normal ou típico, juntamente com a avaliação de fenótipos ou estados das células ou indivíduos de que as células são derivadas, e/ou evidência empírica.

[00188] Em algumas concretizações, a separação e/ou etapas são realizadas usando contas imunomagnéticas. Em algumas concretizações, uma amostra de célula contendo células CD4+ e CD8+ é contactada com contas magnéticas contendo um primeiro reagente de imunoafinidade que se liga a CD4 ou CD8 e contas magnéticas contendo um segundo reagente de imunoafinidade que se liga ao outro CD4 ou CD8. A separação e/ou etapas podem ocorrer simultaneamente e/ou sequencialmente.

[00189] Em algumas concretizações, o primeiro e/ou segundo reagente de imunoafinidade está presente em uma composição de incubação com um rendimento subideal de concentração, pelo qual a composição enriquecida contém menos do que todos, por exemplo, 70% do total de células CD4 + em uma composição de incubação e/ou

menos que todas, por exemplo, 70% das células CD8 + em uma composição de incubação, produzindo assim uma composição enriquecida para células T CD4+ e CD8+.

[00190] Em algumas concretizações, o rendimento subideal de concentração do reagente de afinidade é uma concentração abaixo de uma concentração usada ou necessária para obter um rendimento ideal ou máximo de células ligadas em uma determinada seleção ou enriquecimento envolvendo incubação de células com o reagente e recuperação ou separação de células que se ligaram ao reagente ("Rendimento", por exemplo, sendo o número de células assim recuperadas ou selecionadas em comparação com o número total de células em uma incubação que são direcionadas pelo reagente ou para as quais o reagente é específico ou que possui um marcador para o qual o reagente é específico e capaz de se ligar). O rendimento subideal geralmente é uma concentração ou quantidade do reagente que, em tal processo ou etapa, atinge menos do que todos, por exemplo, não mais que 70% de rendimento de células ligadas, por exemplo, células T CD4 + e/ou CD8 +, após a recuperação das células tendo se ligado ao reagente. Em algumas concretizações, não mais do que, ou cerca de 50 %, 45 %, 40 %, 30 %, ou 25 % de rendimento é alcançado pela concentração subideal do reagente de afinidade. A concentração pode ser expressa em termos de número ou massa de partículas ou superfícies por célula e/ou número de massa ou moléculas de agente (por exemplo, anticorpo, tal como fragmento de anticorpo) por célula. Em concretizações particulares, as concentrações de rendimento subideal são suficientes para derivar ou atingir a relação fixa, controlada e/ou definida de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens.

[00191] Em algumas concretizações, por exemplo, ao operar com um rendimento subideal de concentração para cada um ou mais de dois ou mais reagentes de seleção com afinidade com células T CD4 +

e/ou CD8 +, um ou mais desses reagentes é usado em uma concentração maior que um ou mais outro(s) reagente(s), a fim de influenciar a relação do tipo de célula reconhecido por esse reagente em comparação com o(s) tipo(s) de célula reconhecido(s) pelos outros. Por exemplo, o reagente que se ligar especificamente ao marcador para o qual se deseja influenciar a relação pode ser incluído em uma concentração (por exemplo, agente ou massa por células) que é aumentada pela metade, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes ou mais, em comparação com outras, dependendo da quantidade desejada para aumentar a relação.

[00192] Em algumas concretizações, ao operar na faixa subideal e/ou com células suficientes para atingir a saturação dos reagentes, a quantidade de reagente de imunoafinidade é proporcional ao rendimento aproximado de células enriquecidas. Em certas concretizações, uma quantidade ou concentração apropriada de reagentes de imunoafinidade que dependem da relação desejada da composição gerada contendo as células T CD4+ e CD8+ enriquecidas ou selecionadas pode ser determinada como uma questão de rotina.

[00193] Em algumas concretizações, as etapas de separação e/ou de isolamento são realizadas usando contas magnéticas nas quais os reagentes de imunoafinidade são ligados reversivelmente, como por meio de uma interação do ligante peptídico com uma estreptavidina muteína, conforme descrito em WO 2015/164675. Exemplos de tais contas magnéticas são os Streptamers®. Em algumas concretizações, as etapas de separação são realizadas usando contas magnéticas, como as disponíveis comercialmente na Miltenyi Biotec.

[00194] Em algumas concretizações, a primeira seleção ou enriquecimento de células CD4+ e CD8+ de uma amostra é realizada usando reagentes baseados em imunoafinidade que incluem pelo menos uma primeira e uma segunda matriz de cromatografia de afinida-

de, respectivamente, tendo imobilizado um anticorpo. Em algumas concretizações, uma ou ambas primeiras e/ou segunda seleção podem empregar uma matriz de cromatografia de afinidade de pluralidade e/ou anticorpos, pelo que a pluralidade de matrizes e/ou anticorpos empregados para a mesma seleção, ou seja, a primeira seleção ou a segunda seleção são conectadas em série. Em algumas concretizações, a matriz ou matrizes de cromatografia de afinidade empregadas em uma primeira e/ou segunda seleção adsorve ou é capaz de selecionar ou enriquecer pelo menos, ou cerca de 50×10^6 células/mL, 100×10^6 células/mL, 200×10^6 células/mL or 400×10^6 células/mL. Em algumas concretizações, a capacidade de adsorção pode ser modulada com base no diâmetro e/ou comprimento da coluna. Em algumas concretizações, a razão de início da cultura da composição selecionada ou enriquecida é alcançada escolhendo-se uma quantidade suficiente de matriz e/ou em uma quantidade relativa suficiente para atingir a taxa de início da cultura assumindo com base, por exemplo, na capacidade de adsorção da coluna ou colunas para seleção de células.

[00195] Em uma concretização exemplar, as células T CD4 + e as células T CD8 + têm uma porção igual ou semelhante de células virgens, e a capacidade de adsorção da matriz ou matrizes é a mesma entre a primeira e a segunda seleção, por exemplo, é de, ou é de cerca de 1×10^8 células/mL para ambos, pelo qual o enriquecimento ou a seleção de células na primeira e na segunda seleção resulta em uma composição contendo células CD4 + para células CD8 + com uma relação de células T CD4 + para CD8 + virgens, de ou cerca de 1:1. Em concretizações particulares, um volume, diâmetro ou número apropriado de colunas de cromatografia de matriz de afinidade para a primeira e/ou segunda seleção, dependendo de porções de células tipo virgem e na relação desejada da composição de entrada gerada, pode ser escolhido ou determinado como uma questão de rotina.

[00196] Em algumas concretizações, a capacidade de adsorção de uma matriz ou matrizes de coluna é ajustada para levar em conta as diferenças na frequência de células do tipo virgem, por exemplo, células CD4 + ou CD8 + tipo virgem, em comparação com a frequência de células da respectiva população parental CD4 + ou CD8 + na amostra de partida do indivíduo. O nível ou frequência relativa de várias populações celulares em um indivíduo pode ser determinado com base na avaliação da expressão de superfície de um marcador ou marcadores presentes nessas populações ou subpopulações. Um número de métodos bem conhecidos para avaliar o nível de expressão de marcadores ou proteínas de superfície pode ser usado, como detecção por métodos baseados em afinidade, por exemplo, métodos baseados em imunoafinidade, por exemplo, no contexto de proteínas da superfície celular, como por citometria de fluxo.

[00197] Em algumas concretizações, células tipo virgem, por exemplo, células T CD4 + e/ou CD8 + tipo virgem, são avaliadas, medidas e/ou detectadas em composições de células, por exemplo, composições de células CD4 + e/ou CD8 +, ou em uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em algumas concretizações, uma célula T tipo virgem é uma célula T positiva para a expressão de um ou mais marcadores que indicam que a célula é virgem e/ou é uma célula do tipo virgem. Em certas concretizações, uma célula T do tipo virgem é uma célula positiva para a expressão de um marcador que está associado a um estado virgem ou tipo virgem nas células T. Em concretizações particulares, uma célula T tipo virgem é uma célula T negativa para a expressão de um ou mais marcadores que indicam que a célula não é virgem e/ou não é uma célula tipo virgem. Em certas concretizações, uma célula T virgem é uma célula negativa para a expressão de um marcador associado com um estado não virgem e/ou tipo não virgem, em células T. Em certas concretizações, um estado não virgem e/ou

tipo não virgem, em uma célula T inclui, por exemplo, mas não limitado a, células efetoras T (T_{EFF}), células T de memória, células T de memória central (T_{CM}), células T efetoras de memória (T_{EM}) e combinações do mesmo.

[00198] Em algumas concretizações, uma célula T tipo virgem é positiva para a expressão de pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais do que dez marcadores que indicam que a célula é ingênua e/ou é uma célula tipo virgem, e/ou está associada com um estado virgem ou tipo virgem nas células T. Em algumas concretizações, os marcadores são expressos na superfície celular. Em certas concretizações, a célula T tipo virgem é negativa para a expressão de pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, ou mais do que dez marcadores que indicam que a célula é uma célula não virgem e/ou é tipo não virgem, e/ou está associado a um estado não virgem e/ou tipo não virgem, em células T.

[00199] Marcadores que indicam que a célula T é virgem e/ou é uma célula T do tipo virgem, e/ou estão associados a um estado virgem ou tipo virgem nas células T incluem, mas não estão limitados a, CD27, CD28, CD45RA, CD62L, e/ou CCR7. Em algumas concretizações, uma célula T tipo virgem, por exemplo, a célula T CD4+ e/ou CD8+ tipo virgem, é positiva para a expressão de CD27, CD28, CD45RA, CD62L e/ou CCR7. Em certas concretizações, uma célula T tipo virgem é positiva para a expressão de superfície de uma ou mais de CD27, CD28, CD45RA, CD62L e/ou CCR7.

[00200] Marcadores que indicam que a célula é célula T não virgem e/ou tipo não virgem, e/ou são associados com um estado não virgem e/ou tipo não virgem, nas células T incluem, mas não se limitam a, CD25, CD45RO, CD56, KLRG1, e/ou CD95. Em algumas concretizações, a célula T tipo virgem, por exemplo, uma célula T CD4+ e/ou CD8+ tipo virgem, é negativa para expressão de CD25, CD45RO,

CD56, e/ou KLRG1. Em concretizações particulares, a célula T tipo virgem, por exemplo, uma célula T CD4+ e/ou CD8+ tipo virgem, tem baixa expressão de um marcador associado com células não virgens ou tipo não virgens. Em concretizações particulares, a célula T tipo virgem tem baixa expressão de CD95. Em certas concretizações, a célula T tipo virgem é negativa para a expressão de superfície de uma ou mais de CD25, CD45RO, CD56, e/ou KLRG1.

[00201] Em algumas concretizações, baixa expressão de um marcador associado a células não virgens ou tipo não virgens é ou inclui pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99% menos expressão do que a expressão do marcador em uma célula que é uma célula tipo não virgem, e/ou uma célula que é positiva para um ou mais marcadores que indicam que a célula é uma célula T não virgem e/ou tipo não virgem, e/ou são associados com um estado não virgem e/ou tipo não virgem, em células T. Em certas concretizações, baixa expressão de um marcador associado com células não virgens ou tipo não virgens é ou inclui pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99% menos expressão do que a expressão do marcador em uma célula T efetora (T_{EFF}), uma célula T de memória, uma célula T de memória central (T_{CM}) e/ou uma célula T efetora de memória (T_{EM}).

[00202] Em algumas concretizações, marcadores que indicam que a célula é uma célula T não virgem e/ou tipo não virgem, e/ou são associadas a um estado não virgem e/ou tipo não virgem, nas células T

incluem uma ou mais citocinas. Por exemplo, em certas concretizações, células T não virgens ou tipo não virgens são negativas para a expressão e/ou para a produção de uma ou mais de IL-2, IFN- γ , IL-4, e IL-10. Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são secretadas. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são expressadas internamente pelas células T tipo não virgens, por exemplo, durante ou após o tratamento com um agente que previne, inibe ou reduz a secreção.

[00203] Em certas concretizações, uma célula T tipo virgem é positiva para a expressão, por exemplo, expressão superficial, de CD45RA e CCR7. Em concretizações particulares, uma célula T CD4 + tipo virgem é positiva para a expressão, por exemplo, expressão superficial, de CD45RA e CCR7. Em algumas concretizações, uma célula T CD8 + tipo virgem é positiva para a expressão, por exemplo, expressão de superfície, de CD45RA e CCR7. Em concretizações particulares, uma célula T tipo virgem é positiva para a expressão, por exemplo, expressão de superfície, de CD45RA, CD27, e CCR7 e é negativa para a expressão, por exemplo, expressão de superfície de CD45RO. Em concretizações particulares, uma célula T CD4 + tipo virgem é positiva para a expressão, por exemplo, expressão de superfície, de CD45RA, CD27, e CCR7 e é negativa para a expressão, por exemplo, expressão de superfície de CD45RO. Em algumas concretizações, uma célula T CD8 + tipo virgem é positiva para a expressão, por exemplo, expressão de superfície, de CD45RA, CD27, e CCR7 e é negativa para a expressão, por exemplo, expressão de superfície de CD45RO.

[00204] Em certas concretizações, as células T CD4+ e/ou CD8+ são células viáveis. Em certas concretizações, as células T CD4+ e/ou CD8+ são células virgens viáveis. A célula viável é positiva para a expressão de um marcador que indica que a célula sofre processos celulares funcionais normais e/ou não sofreu ou não está em processo de

sofrer necrose ou morte celular programada. Em algumas concretizações, a viabilidade pode ser avaliada pelo potencial redox da célula, pela integridade da membrana celular ou pela atividade ou função das mitocôndrias. Em algumas concretizações, viabilidade é a ausência de uma molécula específica associada à morte celular ou a ausência da indicação de morte celular em um ensaio.

[00205] Em certas concretizações, a viabilidade celular é avaliada com um ensaio que pode incluir, mas não está limitado a, ensaios de captação de corante (por exemplo, ensaios de calceína AM), ensaios de viabilidade celular XTT e ensaios de exclusão de corantes (por exemplo, ensaios de exclusão de corante azul de tripano, Eosina ou propídio). Em concretizações particulares, uma célula viável possui expressão negativa de um ou mais marcadores apoptóticos, por exemplo, anexina V ou Caspase ativa 3. Em algumas concretizações, a célula viável é negativa para a expressão de um ou mais marcadores de apoptose que podem incluir, mas não são limitados a, caspase, por exemplo, caspase 2, caspase 3, caspase 6, caspase 7, caspase 8, caspase 9 e caspase 10, membros da família Bcl-2, por exemplo, Bax, Bad e Bid, Anexina V, e/ou manchamento do TUNEL.

[00206] Em algumas concretizações, expressão é ou inclui uma quantidade, nível, concentração e/ou presença do marcador. Em concretizações particulares, o marcador é polipeptídeo. Em algumas concretizações, o marcador é um mRNA. Em algumas concretizações, a expressão é ou inclui uma quantidade, nível, concentração e/ou presença de um polipeptídeo, por exemplo, o polipeptídeo marcador. Em certas concretizações, uma quantidade, nível, concentração e/ou presença de um polinucleotídeo, por exemplo, um mRNA ou um cDNA derivado do mRNA, que codifica o marcador. Em certas concretizações, a expressão é ou inclui uma quantidade, nível, concentração e/ou presença do marcador na superfície celular ou exposta na mem-

brana celular ou dentro dela. Em certas concretizações, a expressão é ou inclui uma quantidade, nível, concentração e/ou presença do marcador sobre ou exposto na superfície celular ou dentro da membrana celular. Em concretizações particulares, a expressão é ou inclui expressão interna, por exemplo, uma quantidade, nível, concentração e/ou presença do marcador dentro da célula internamente, tal como dentro do citosol, núcleo, retículo endoplasmático, e/ou o aparelho de Golgi.

[00207] Em algumas concretizações, os marcadores são medidos, avaliados e/ou quantificados através da realização de um ensaio *in vitro*. Em alguns exemplos, o ensaio *in vitro* é um imunoensaio, um ensaio baseado em aptâmero, um ensaio histológico ou citológico ou um ensaio de nível de expressão de mRNA. Em alguns casos, o ensaio *in vitro* utilizado pode ser um ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), imunotransferência, imunoprecipitação, radioimunoensaio (RIA), imunomanchamento, teste de citometria de fluxo, ressonância plasmônica de superfície (SPR), ensaio de quimioluminescência, imunoensaio de fluxo lateral, ensaio de inibição ou ensaio de avides. Em algumas concretizações, a expressão dos marcadores é medida, avaliada e/ou quantificada por seq.-RNA. Em concretizações particulares, a expressão dos marcadores é medida, avaliada e/ou quantificada por técnicas de imunomanchamento. Em concretizações particulares, a expressão dos marcadores é medida, avaliada e/ou quantificada por análise por citometria de fluxo. Em algumas concretizações, a expressão dos marcadores é medida, avaliada e/ou quantificada por man- chamento interno de citocinas.

[00208] Em algumas concretizações, os marcadores são medidos, avaliados e/ou quantificados em células da composição de células T CD4 +. Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo me-

nos, ou cerca de 15%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 25%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 35%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 99% de células T CD4 + são células T CD4 + virgens. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 10% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 20% e a, ou cerca de 60%, entre, ou de cerca de 25% e a, ou cerca de 75%, entre, ou de cerca de 30% e a, ou cerca de 80%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 90%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 100%, entre, ou de cerca de 30% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 60%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 70%, entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 80%, entre, ou de cerca de 70% e a, ou cerca de 90%, entre, ou de cerca de 80% e a, ou cerca de 100%, entre, ou de cerca de 5% e a, ou cerca de 25%, entre, ou de cerca de 25% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 75%, ou entre, ou de cerca de 75% e a, ou cerca de 99% de células T CD4 + são células T CD4 + virgens. Em certas concretizações, as células T CD4 + tipo virgem são células T CD4 + tipo virgem viáveis.

[00209] Em certas concretizações, os marcadores são medidos, avaliados e/ou quantificados em células da composição de células T CD8 +. Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 15%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 25%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de

35%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 99% de células T CD8+ são células T CD8+ virgens. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 10% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 20% e a, ou cerca de 60%, entre, ou de cerca de 25% e a, ou cerca de 75%, entre, ou de cerca de 30% e a, ou cerca de 80%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 90%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 100%, entre, ou de cerca de 30% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 60%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 70%, entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 80%, entre, ou de cerca de 70% e a, ou cerca de 90%, entre, ou de cerca de 80% e a, ou cerca de 100%, entre, ou de cerca de 5% e a, ou cerca de 25%, entre, ou de cerca de 25% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 75%, ou entre, ou de cerca de 75% e a, ou cerca de 99% de células T CD8+ são células T CD4+ virgens. Em certas concretizações, as células T CD8+ virgens são células T CD8 + virgens viáveis.

[00210] Em algumas concretizações, células de uma composição de células T CD4 + são misturadas ou combinadas com células de uma composição de células T CD8 + em quantidades e/ou proporções suficientes para produzir uma composição de entrada com uma relação de células T do tipo CD4 + virgens para células T CD8 + virgens entre 10:1 a 0,05:1, entre 8:1 a 0,1:1, entre 5:1 a 0,2:1, entre 2,5:1 a 0,25:1, entre 2,2:1 a 0,8:1, entre 2:1 a 0,5:1, ou entre 1,5:1 a 1:1, inclusive. Em algumas concretizações, as células são misturadas em

quantidades e/ou proporções suficientes para uma relação de células T não virgens CD4+ para células T não virgens CD8+ entre 2,2:1 a 0,8:1, inclusive. Em certas concretizações, as células são misturadas ou combinadas para uma relação de células T não virgens CD4+ para células T não virgens CD8+ de, ou de cerca de, 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, ou 0,8:1. Em certas concretizações, as células são misturadas ou combinadas para uma relação de, ou de cerca de 1,1:1.

[00211] Em algumas concretizações, uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 , ou células viáveis T CD4 + totais são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$, ou 1×10^9 células T CD8 totais ou viáveis totais para produzir uma composição de entrada com uma relação definida de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens . Em certas concretizações, entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD4+ totais ou viáveis totais são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD8+ totais ou viáveis totais para produzir uma composição de entrada com uma relação definida de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens.

[00212] Em algumas concretizações, uma quantidade de, ou de

cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células T CD4 + virgens são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$, ou 1×10^9 células T CD8+ virgens pra produzir uma composição de entrada com uma relação definida de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens . Em certas concretizações, entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD4+ virgens são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD8+ virgens para produzir uma composição de entrada com uma relação definida de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens.

[00213] Em concretizações particulares, a relação de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens da composição de entrada foi ajustada, mudada e/ou alterada em comparação com a relação de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens de uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em concretizações particulares, a relação de células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens é de, ou é de cerca de ou é pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1 vez, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes, 100 vezes ajustada, mudada ou alterada a partir da amostra biológica. Em

certas concretizações, a amostra é a amostra de onde as células da composição de entrada foram derivadas, isoladas, selecionadas e/ou obtidas.

[00214] Em algumas concretizações, produzir, gerar, e/ou fazer uma composição de entrada inclui uma ou mais etapas de mistura ou combinação de células de uma composição de células T CD4+ com células de composições de células T CD8+ para produzir uma composição de entrada com uma relação entre 2,2:1 a 0,8:1 células T CD4+ virgens para células T CD8+ virgens. Em concretizações particulares, número, número por volume, número por peso, e/ou a quantidade, nível ou percentagem de células virgens são medidas, avaliadas e/ou quantificadas na composição de células T CD4+ e na composição de células T CD8+ antes da mistura ou combinação. Em algumas concretizações, a quantidade, nível, número, número por volume, número por peso e/ou percentagem de células virgens são medidas, avaliadas e/ou quantificadas pela detecção de células CD45RA+; células T CCR7+. Em concretizações particulares, a composição de entrada tem uma relação entre 2,2:1 a 0,8:1 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. Em algumas concretizações, a composição de entrada tem uma relação de, ou de cerca de 1,1:1 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[00215] Em certas concretizações, a composição da célula de entrada contém uma relação, por exemplo, uma relação definida, controlada e/ou fixa, de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. Em concretizações particulares, a relação de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ é entre 10:1 a 0,05:1, entre 8:1 a 0,1:1, entre 5:1 a 0,2:1, entre 2,5:1 a 0,25:1, entre 2,2:1 a 0,8:1, entre 2:1 a 0,5:1, ou entre 1,5:1 a 1:1, inclusive. Em concretizações particulares, a rela-

ção de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ é entre 2:1 a 0,8:1, entre 1,6:1 a 0,8:1, entre 1,4:1 a 0,8:1, entre 1,2:1 a 0,8:1, ou entre 1,2:1 a 0,8:1, inclusive. Em algumas concretizações, a relação é entre 2,2:1 a 0,8:1, inclusive. Em certas concretizações, a relação de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ é de, ou é de cerca de 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, ou 0,8:1. Em certas concretizações, a relação é de, ou é de cerca de 1,1:1.

[00216] Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células totais ou células viáveis totais. Em certas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células que expressam CD4 ou CD8. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ e CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[00217] Em concretizações particulares, a composição da célula de

entrada tem entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células totais ou células viáveis totais. Em certas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células que expressam CD4 ou CD8. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ e CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[00218] Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem ou contém pelo menos 1%, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou 100% ou cerca de 100% de células CD45RA+/CCR7+. Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada contém ou inclui não mais do que 100%, não mais do que 99%, não mais do que 98%, não mais do que 97%, não mais do que 96%, não mais do que 95%, não mais do que 90%, ou não mais do que 85% de células CD45RA+/CCR7+.

[00219] Em algumas concretizações, uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 , células T CD4+ totais ou viáveis são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$,

1,4 x 10⁸, 1,5 x 10⁸, 1,6 x 10⁸, 1,7 x 10⁸, 1,8 x 10⁸, 1,9 x 10⁸, 2,0 x 10⁸, 2,1 x 10⁸, 2,2 x 10⁸, 2,3 x 10⁸, 2,4 x 10⁸, 2,5 x 10⁸, 2,6 x 10⁸, 2,7 x 10⁸, 2,8 x 10⁸, 2,9 x 10⁸, 3,0 x 10⁸, 3,5 x 10⁸, 4,0 x 10⁸, 4,5 x 10⁸, 5 x 10⁸, 5,5 x 10⁸, ou 1 x 10⁹ células T CD8+ totais ou viáveis totais para produzir uma composição de células de entrada com uma relação definida de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. Em certas concretizações, entre 1 x 10⁶ e 1 x 10¹⁰, entre 1 x 10⁷ e 1 x 10⁹, entre 5 x 10⁷ e 5 x 10⁸, ou entre 1 x 10⁸ e 3 x 10⁸ células T CD4+ totais ou viáveis totais são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de entre 1 x 10⁶ e 1 x 10¹⁰, entre 1 x 10⁷ e 1 x 10⁹, entre 5 x 10⁷ e 5 x 10⁸, ou entre 1 x 10⁸ e 3 x 10⁸ células T CD8+ totais ou viáveis totais para produzir uma composição de células de entrada com uma relação definida de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[00220] Em concretizações particulares, a relação de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ da composição da célula de entrada tem sido ajustada, mudada, e/ou alterada em comparação com a relação de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para as células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ de uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em concretizações particulares, a relação de células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+ é de, ou é de cerca de ou é pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1 vez, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes, 100 vezes ajustada, mudada ou alterada a partir da amostra biológica. Em certas concretizações, a amostra é a amostra de onde as células da composição de células de entrada foram derivadas, isoladas, selecionadas e/ou obtidas.

[00221] Em certas concretizações, a composição da célula de entrada contém uma relação, por exemplo, uma relação definida, contro-

lada e/ou fixa, de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+. Em concretizações particulares, a relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+ é entre 10:1 a 0,05:1, entre 8:1 a 0,1:1, entre 5:1 a 0,2:1, entre 2,5:1 a 0,25:1, entre 2,2:1 a 0,8:1, entre 2:1 a 0,5:1, ou entre 2:1 a 1:1, inclusive. Em concretizações particulares, a relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+ é entre 2:1 a 0,8:1, entre 1,8:1 a 1:1, entre 1,8:1 a 1,2:1, entre 1,2:1 a 1,4:1, ou entre 1,8:1 a 1,6:1, inclusive. Em algumas concretizações, a relação é entre 1,8:1 a 1,6:1, inclusive. Em certas concretizações, a relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ a células T CD27+/CCR7+/CD8+ é de, ou é de cerca de 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,69:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, ou 1,3:1. Em certas concretizações, a relação é de, ou é de cerca de 1,69:1.

[00222] Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células totais ou células viáveis totais. Em certas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células que expressam CD4 ou CD8. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times$

10^8 , $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 células T CD27+/CCR7+/CD4+ e CD27+/CCR7+/CD8+.

[00223] Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada tem entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células totais ou células viáveis totais. Em certas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células que expressam CD4 ou CD8. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD27+/CCR7+/CD4+ e CD27+/CCR7+/CD8+.

[00224] Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem ou contém pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 96%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou 100% ou cerca de 100% de células CD27+/CCR7+. Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada contém ou inclui não mais do que, ou cerca de 100%, não mais do que, ou cerca de 99%, não mais do que, ou cerca de 98%, não mais do que, ou cerca de 97%, não mais do que, ou cerca

de 96%, não mais do que, ou cerca de 95%, não mais do que, ou cerca de 90%, ou não mais do que a, ou cerca de 85% de células CD27+/CCR7+.

[00225] Em algumas concretizações, uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 , células T CD4+ totais ou viáveis totais são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$, ou 1×10^9 células T CD8+ totais ou viáveis totais para produzir uma composição de células de entrada com uma relação definida de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+. Em certas concretizações, entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD4+ totais ou viáveis totais são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD8+ totais ou viáveis totais para produzir uma composição de células de entrada com uma relação definida de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+.

[00226] Em concretizações particulares, a relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para Células T CD27+/CCR7+/CD8+ da composição da célula de entrada foi ajustada, mudada, e/ou alterada em comparação com a relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+ de uma amostra, por exemplo, uma

amostra biológica. Em concretizações particulares, a relação de células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+ é de, ou é de cerca de ou é pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1 vez, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes, 100 vezes ajustada, mudada, ou alterada a partir da amostra biológica. Em certas concretizações, a amostra é a amostra de onde as células da composição da célula de entrada foram derivadas, isoladas, selecionadas e/ou obtidas.

[00227] Em certas concretizações, a composição da célula de entrada contém uma relação, por exemplo, uma relação definida, controlada e/ou fixa, de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+. Em concretizações particulares, a relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+ é entre 10:1 a 0,05:1, entre 8:1 a 0,1:1, entre 5:1 a 0,2:1, entre 2,5:1 a 0,25:1, entre 2,2:1 a 0,8:1, entre 2:1 a 0,5:1, ou entre 1,5:1 a 1:1, inclusive. Em concretizações particulares, a relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+ é entre 2:1 a 0,8:1, entre 1,6:1 a 0,8:1, entre 1,4:1 a 0,8:1, entre 1,2:1 a 0,8:1, ou entre 1,2:1 a 0,8:1, inclusive. Em algumas concretizações, a relação é entre 2,2:1 a 0,8:1, inclusive. Em certas concretizações, a relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ a células T CD62L-/CCR7+/CD8+ é de, ou é de cerca de 2,2:1, 2,1:1, 2,0:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1,0:1, 0,9:1, ou 0,8:1. Em certas concretizações, a relação é de, ou é de cerca de 1,1:1.

[00228] Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada tem entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células totais ou células viáveis totais. Em certas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} ,

entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células que expressam CD4 ou CD8. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD62L-/CCR7+/CD4+ e CD62L-/CCR7+/CD8+.

[00229] Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem ou contém pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 96%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou 100% ou cerca de 100% de células CD62L-/CCR7+. Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada contém ou inclui não mais do que, ou cerca de 100%, não mais do que, ou cerca de 99%, não mais do que, ou cerca de 98%, não mais do que, ou cerca de 97%, não mais do que, ou cerca de 96%, não mais do que, ou cerca de 95%, não mais do que, ou cerca de 90%, ou não mais do que a, ou cerca de 85% de células CD62L-/CCR7+.

[00230] Em algumas concretizações, uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 5×10^8 , ou 1×10^9 , células T CD4+ totais ou viáveis totais

são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1,0 \times 10^8$, $1,1 \times 10^8$, $1,2 \times 10^8$, $1,3 \times 10^8$, $1,4 \times 10^8$, $1,5 \times 10^8$, $1,6 \times 10^8$, $1,7 \times 10^8$, $1,8 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $2,0 \times 10^8$, $2,1 \times 10^8$, $2,2 \times 10^8$, $2,3 \times 10^8$, $2,4 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$, $2,6 \times 10^8$, $2,7 \times 10^8$, $2,8 \times 10^8$, $2,9 \times 10^8$, $3,0 \times 10^8$, $3,5 \times 10^8$, $4,0 \times 10^8$, $4,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $5,5 \times 10^8$, ou 1×10^9 células T CD8+ totais ou viáveis totais para produzir uma composição de células de entrada com uma relação definida de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+. Em certas concretizações, entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD4+ totais ou viáveis totais são misturadas ou combinadas com uma quantidade de, ou de cerca de entre 1×10^6 e 1×10^{10} , entre 1×10^7 e 1×10^9 , entre 5×10^7 e 5×10^8 , ou entre 1×10^8 e 3×10^8 células T CD8+ totais ou viáveis totais para produzir uma composição de células de entrada com uma relação definida de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+.

[00231] Em concretizações particulares, a relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+ da composição da célula de entrada foi ajustada, mudada, e/ou alterada em comparação com a relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+ de uma amostra, por exemplo, uma amostra biológica. Em concretizações particulares, a relação de células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+ é de, ou é de cerca de, ou é pelo menos que 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 1 vez, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes, 100 vezes ajustada, mudada, ou alterada a partir da amostra biológica. Em certas concretizações, a amostra é a amostra de onde as células da composição da célula de entrada foram derivadas, isoladas, selecionadas e/ou obtidas.

[00232] Em algumas concretizações, produzir, gerar e/ou fazer uma composição de células de entrada inclui uma ou mais etapas de misturar ou combinar células de uma composição de células T CD4+ com células de composições de células T CD8+ para produzir uma composição de células de entrada com uma relação entre 2,2:1 para 0,8:1 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para Células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. Em concretizações particulares, número, número por volume, número por peso, e/ou a quantidade, nível ou percentagem de células CD45RA+/CCR7+ são medidos, avaliados e/ou quantificados na Composição de células T CD4 + e composição de células T CD8 + antes da mistura ou combinação. Em algumas concretizações, a quantidade, nível, número, número por volume, número por peso, e/ou percentagem de células CD45RA+/CCR7+ são medidos, avaliados e/ou quantificados através da detecção de células T CD45RA+/CCR7+. Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada tem uma relação entre 2,2:1 a 0,8:1 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma relação de, ou de cerca de 1,1:1 células T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para células T CD45RA+/CCR7+/CD8+.

[00233] Em algumas concretizações, produzir, gerar e/ou fazer uma composição de células de entrada inclui uma ou mais etapas de misturar ou combinar células de uma composição de células T CD4+ com células de composições de células T CD8+ para produzir uma composição de células de entrada com uma relação entre 2,4:1 para 1:1 células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+. Em concretizações particulares, número, número por volume, número por peso, e/ou a quantidade, nível ou percentagem de células CD27+/CCR7+ são medidos, avaliados e/ou quantificados na composição de células T CD4 + e composição de células T CD8 + antes da

mistura ou combinação. Em algumas concretizações, a quantidade, nível, número, número por volume, número por peso, e/ou percentagem de células CD27+/CCR7+ são medidos, avaliados e/ou quantificados através da detecção de células T CD45RA+;CCR7+. Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada tem uma relação entre 2,4:1 a 1:1 células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma relação de, ou de cerca de 1,69:1 células T CD27+/CCR7+/CD4+ para células T CD27+/CCR7+/CD8+.

[00234] Em algumas concretizações, produzir, gerar e/ou fazer uma composição de células de entrada inclui uma ou mais etapas de misturar ou combinar células de uma composição de células T CD4+ com células de composições de células T CD8+ para produzir uma composição de células de entrada com uma relação entre 2,2:1 a 0,8:1 células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+. Em concretizações particulares, número, número por volume, número por peso, e/ou a quantidade, nível ou percentagem de células CD62L-/CCR7+ são medidos, avaliados e/ou quantificados na composição de células T CD4+ e composição de células T CD8+ antes da mistura ou combinação. Em algumas concretizações, a quantidade, nível, número, número por volume, número por peso, e/ou percentagem de células CD62L-/CCR7+ são medidos, avaliados e/ou quantificados através da detecção de células T CD62L-/CCR7+. Em concretizações particulares, a composição da célula de entrada tem uma relação entre 2,2:1 a 0,8:1 células T CD62L-/CCR7+/CD4+ para células T CD62L-/CCR7+/CD8+. Em algumas concretizações, a composição da célula de entrada tem uma relação de, ou de cerca de 1,1:1 de células T CD62L-/CCR7/CD4+ para células T CD62L-/CCR7/CD8+.

B. Ativação e Estimulação

[00235] Em algumas concretizações, os métodos fornecidos são

utilizados em conexão com células de incubação sob condições de estimulação. Em algumas concretizações, as condições de estimulação incluem condições que ativam ou estimulam, e/ou são capazes de ativar ou estimular um sinal na célula, por exemplo, uma célula T CD4+, tal como um sinal gerado a partir de um TCR e/ou um correceptor. Em algumas concretizações, as condições de estimulação incluem uma ou mais etapas de cultura, cultivo, incubação, ativação, propagação das células com e/ou na presença de um reagente estimulatório, por exemplo, um reagente que ativa ou estimula, e/ou é capaz de ativar ou estimular um sinal na célula. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório estimula e/ou ativa um TCR e/ou um correceptor. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é um reagente fornecido aqui, por exemplo, conforme descrito na Seção I-B-1.

[00236] Em certas concretizações, uma ou mais composições de células T enriquecidas são incubadas sob condições de estimulação antes da engenharia genética das células, por exemplo, transfectando e/ou transduzindo as células, tal como por um método ou técnica aqui fornecida, por exemplo, um método ou técnica descrita na Seção I-C. Em concretizações particulares, a composição de células T enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação é uma composição de entrada. Em certas concretizações, as células das composições de entrada foram previamente isoladas, selecionadas, enriquecidas ou obtidas de uma amostra biológica. Em concretizações particulares, as células da composição de entrada foram congeladas e armazenadas previamente e são descongeladas antes da incubação.

[00237] Em algumas concretizações, os métodos fornecidos são usados em conexão com uma ou mais etapas de processamento que incluem uma etapa de células estimulantes, tal como células da composição de entradas. Em certas concretizações, a incubação pode ser anterior ou em conexão com a engenharia genética, tal como a enge-

nharia genética resultante das concretizações da transdução aqui descrita, por exemplo, métodos descritos na Seção I-C. Em algumas concretizações, a estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células, por exemplo, antes da engenharia, por exemplo, transdução.

[00238] Em algumas concretizações, as etapas de processamento incluem incubações de células, tal como células de entrada e/ou da composição de entrada, nas quais as etapas de incubação podem incluir cultura, cultivo, estimulação, ativação e/ou propagação de células. Em algumas concretizações, as composições ou células são incubadas na presença de condições estimulantes ou de um agente estimulador. Tais condições incluem aquelas planejadas para induzir proliferação, expansão, ativação e/ou sobrevivência de células na população, para imitar a exposição a antígenos, e/ou como células primárias para engenharia genética, como para a introdução de um receptor de antígeno recombinante.

[00239] Em certas concretizações, as células, por exemplo, células da composição de entrada, são incubadas, por exemplo, sob condições de estimulação tal como na presença de um reagente estimulatório, em uma densidade menor que, ou de cerca de 5×10^7 células/mL, 4×10^7 células/mL, 3×10^7 células/mL, 2×10^7 células/mL, 1×10^7 células/mL, 9×10^6 células/mL, 8×10^6 células/mL, 7×10^6 células/mL, 6×10^6 células/mL, 5×10^6 células/mL, 4×10^6 células/mL, ou 3×10^6 células/mL. Em concretizações particulares, as células são incubadas em uma densidade menor que 5×10^6 células/mL. Em algumas concretizações, as células são incubadas em uma densidade entre 1×10^3 células/mL e 1×10^9 células/mL, 1×10^4 células/mL e 1×10^8 células/mL, 1×10^5 células/mL e 1×10^7 células/mL, 5×10^5 células/mL e 1×10^7 células/mL, 1×10^6 células/mL e 5×10^6 células/mL, ou 3×10^6 células/mL e 5×10^6 células/mL. Em concretizações particulares, as células são incubadas em uma densidade de, ou de cerca de, 1×10^6

células/mL, $1,5 \times 10^6$ células/mL, 2×10^6 células/mL, $2,5 \times 10^6$ células/mL, 3×10^6 células/mL, $3,5 \times 10^6$ células/mL, 4×10^6 células/mL, $4,5 \times 10^6$ células/mL, ou 5×10^6 células/mL. Em concretizações particulares, as células são incubadas em uma densidade de, ou de cerca de, 3×10^6 células/mL. Em algumas concretizações, as células são células viáveis. Em certas concretizações, as células são negativas para um marcador apoptótico, por exemplo, Anexina V ou caspase ativa 3. Em concretizações particulares, as células são ou incluem células T CD4+ e células T CD8+.

[00240] Em concretizações particulares, indicadores de viabilidade incluem, mas não estão limitados a, indicadores de replicação celular, função mitocondrial, balanço energético, integridade da membrana e mortalidade celular. Em certas concretizações, os indicadores de viabilidade incluem ainda indicadores de estresse oxidativo, ativação metabólica, estabilidade metabólica, indução enzimática, inibição enzimática e interação com transportadores de membrana celular. Em algumas concretizações, as células viáveis incluem células submetidas a processos celulares funcionais normais e/ou células que não foram submetidas ou não estão sob o processo de sofrer necrose ou morte celular programada. Em algumas concretizações, a viabilidade pode ser avaliada pelo potencial redox da célula, pela integridade da membrana celular ou pela atividade ou função das mitocôndrias. Em algumas concretizações, viabilidade é a ausência de uma molécula específica associada à morte celular, ou a ausência da indicação de morte celular em um ensaio. Em certas concretizações, a viabilidade das células pode ser detectada, medida e/ou avaliada por vários meios de rotina. Exemplos não limitativos de tais ensaios de viabilidade incluem, entre outros, ensaios de captação de corante (por exemplo, ensaios de calcéina AM), ensaios de viabilidade celular XTT e ensaios de exclusão de corante (por exemplo, ensaios de exclusão de corante azul de tri-

pano, Eosina ou propídio). Os ensaios de viabilidade são úteis para determinar o número ou percentagem (por exemplo, frequência) de células viáveis em uma dose de célula, composição de célula e/ou amostra de célula.

[00241] Em concretizações particulares, o marcador apoptótico pode incluir qualquer marcador conhecido associado à apoptose e pode incluir a expressão de genes, proteínas ou formas ativas de proteínas, ou o aparecimento de características associadas à apoptose, como formação de vesículas e/ou colapso nuclear. Em certas concretizações, o marcador apoptótico é um marcador associado à apoptose que pode incluir, mas não está limitado a, fatores pró-apoptóticos conhecidos por iniciar a apoptose, membros da via do receptor da morte, membros ativados da via mitocondrial (intrínseca), membros da família Bcl-2 tal como Bax, Bad e Bid, Fas, FADD, presença de encolhimento nuclear (por exemplo, monitorado por microscópio), presença de fragmentação cromossômica do DNA (por exemplo, presença de escada de DNA cromossômico), ou marcadores associados a ensaios de apoptose, por exemplo, manchamento do TUNEL, e manchamento com Anexina V. Em algumas concretizações, o marcador de apoptose é expressão de caspase, por exemplo, expressão das formas ativas de caspase-1, caspase-2, caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9, caspase-10 e/ou caspase-13. Em algumas concretizações, o marcador apoptótico é a Anexina V. Em certas concretizações, o marcador apoptótico é a caspase-3 ativa.

[00242] Em algumas concretizações, entre, ou de cerca de 1×10^5 e a, ou cerca de 500.000×10^6 células, entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 50.000×10^6 células, entre, ou de cerca de 10×10^6 e a, ou cerca de 5.000×10^6 células, entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 1.000×10^6 células, entre, ou de cerca de 50×10^6 e a, ou cerca de 5.000×10^6 células, entre, ou de cerca de 10×10^6 e a, ou

cerca de 1.000×10^6 células, entre, ou de cerca de 100×10^6 e a, ou cerca de 2.500×10^6 células, por exemplo, células da composição de entrada, são incubadas, por exemplo, sob condições de estimulação tal como na presença de um reagente estimulatório. Em concretizações particulares, pelo menos, em, ou em cerca de 50×10^6 células, 100×10^6 células, 150×10^6 células, 200×10^6 células, 250×10^6 células, 300×10^6 células, 350×10^6 células, 400×10^6 células, 450×10^6 células, ou 500×10^6 células são incubadas, por exemplo, sob condições de estimulação. Em algumas concretizações, as células são células viáveis. Em certas concretizações, as células são negativas para um marcador de apoptose, por exemplo, Anexina V ou caspase ativa 3. Em concretizações particulares, as células são ou incluem células T CD4+ e células T CD8+.

[00243] Em algumas concretizações, entre, ou de cerca de 1×10^5 e a, ou cerca de 25.000×10^6 , entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 25.000×10^6 , entre, ou de cerca de 10×10^6 e a, ou cerca de 2.500×10^6 , entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 500×10^6 , entre, ou de cerca de 50×10^6 e a, ou cerca de 2.500×10^6 , entre, ou de cerca de 10×10^6 e a, ou cerca de 500×10^6 , entre, ou de cerca de 50×10^6 e a, ou cerca de 300×10^6 células T CD4+, por exemplo, células T CD4+ T da composição de entrada, são incubados por exemplo, sob condições de estimulação tal como na presença de um reagente estimulatório. Em concretizações particulares, pelo menos, em, ou em cerca de 25×10^6 , 50×10^6 , 75×10^6 , 100×10^6 , 125×10^6 , 150×10^6 , 175×10^6 , 200×10^6 , 225×10^6 , ou 250×10^6 células T CD4+ são incubadas, por exemplo, sob condições de estimulação. Em algumas concretizações, as células T CD4+ são células T CD4+ viáveis. Em certas concretizações, as células T CD4+ são negativas para um marcador de apoptose, por exemplo, Anexina V ou caspase ativa 3.

[00244] Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 1×10^5 e

a, ou cerca de 25.000×10^6 , entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 25.000×10^6 , entre, ou de cerca de 10×10^6 e a, ou cerca de 2.500×10^6 , entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 500×10^6 , entre, ou de cerca de 50×10^6 e a, ou cerca de 2.500×10^6 , entre, ou de cerca de 10×10^6 e a, ou cerca de 500×10^6 , entre, ou de cerca de 50×10^6 e a, ou cerca de 300×10^6 células T CD8+, por exemplo, células T CD8+ da composição de entrada, são incubadas por exemplo, sob condições de estimulação tal como na presença de um reagente estimulatório. Em algumas concretizações, pelo menos, em, ou em cerca de 25×10^6 , 50×10^6 , 75×10^6 , 100×10^6 , 125×10^6 , 150×10^6 , 175×10^6 , 200×10^6 , 225×10^6 , ou 250×10^6 células T CD8+ são incubadas, por exemplo, sob condições de estimulação. Em algumas concretizações, as células T CD8+ são células viáveis T CD8+. Em certas concretizações, as células T CD8+ são negativas para um marcador de apoptose, por exemplo, Anexina V ou caspase ativa 3.

[00245] Em algumas concretizações, as condições para a estimulação e/ou a ativação podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, conteúdo de oxigênio, conteúdo de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons, e/ou fatores estimuladores, tal como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[00246] Em algumas concretizações, as condições de estimulação ou reagentes estimuladores incluem um ou mais reagentes, por exemplo, ligante, que é capaz de estimular ou ativar um domínio de sinalização intracelular de um complexo de TCR. Em alguns aspectos, o agente ativa ou inicia a cascata de sinalização intracelular do TCR/CD3 em uma célula T, tal como agentes adequados para fornecer um sinal primário, por exemplo, para iniciar a ativação de um sinal induzido por ITAM, como aqueles específicos para um componente

TCR, por exemplo, anti-CD3, e/ou um agente que promove um sinal coestimulatório, tal como um específico para um receptor coestimulador de células T, por exemplo, anti-CD28 ou anti-4-1BB, por exemplo, ligado ao suporte sólido tal como uma conta, e/ou uma ou mais citocinas. Entre os reagentes estimuladores estão as contas anti-CD3/anti-CD28 (por exemplo, DYNABEADS® M-450 expensor de células T CD3/CD28, e/ou contas ExpACT®). Opcionalmente, o método de expansão também pode compreender a etapa de adição de anticorpo anti-CD3 e/ou anti CD28 ao meio de cultura. Em algumas concretizações, os agentes estimulantes incluem citocinas.

[00247] Em concretizações particulares, as condições de estimulação incluem incubação, cultura e/ou cultivo das células com um reagente estimulatório. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é um reagente fornecido aqui, por exemplo, um reagente descrito na Seção I-B-1. Em certas concretizações, o reagente estimulatório contém ou inclui uma conta. Em certas concretizações, o início e/ou início das células de incubação, cultura e/ou cultivo sob condições de estimulação ocorre quando as células entram em contato com e/ou são incubadas com o reagente estimulatório. Em concretizações particulares, as células são incubadas antes, durante e/ou subsequente a engenharia genética das células, por exemplo, introduzindo um polinucleotídeo recombinante na célula tal como por transdução ou transfecção.

[00248] Em algumas concretizações, a composição das células T enriquecidas são incubadas em uma relação de reagente estimulatório e/ou contas para células em ou em cerca de 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1, ou 0,2:1. Em concretizações particulares, a relação de reagente estimulatório e/ou contas para células está entre 2,5:1 e 0,2:1, entre 2:1 e 0,5:1, entre 1,5:1 e 0,75:1, entre 1,25:1 e 0,8:1, entre 1,1:1 e 0,9:1.

Em concretizações particulares, a relação de reagente estimulatório para células é de cerca de 1:1 ou é 1:1.

[00249] Em concretizações particulares, as condições de estimulação incluem incubação, cultura, e/ou cultivo das Células, por exemplo, células de uma composição de entrada, com e/ou na presença de uma ou mais citocinas. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes. Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes humanas. Em certas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas ligam-se a e/ou são capazes de se ligar a receptores que são expressos por e/ou são endógenos a células T. Em concretizações particulares, as referidas uma ou citocinas são ou incluem um membro da família do feixe 4-alfa-helix de citocinas. Em algumas concretizações, os membros da família do feixe 4-alfa-hélice de citocinas incluem, entre outros, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-15. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-7. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-2.

[00250] Em certas concretizações, a quantidade ou concentração das referidas uma ou mais citocinas são medidas e/ou quantificadas com Unidades internacionais (IU). Unidades internacionais podem ser usadas para quantificar vitaminas, hormônios, citocinas, vacinas, produtos sanguíneos e substâncias biologicamente ativas similares. Em algumas concretizações, IU são ou incluem unidades de medida da potência de preparações biológicas em comparação com um padrão internacional de referência de um peso e força específicos, por exem-

plo, WHO 1st International Standard for Human IL-2, 86/504. Unidades Internacionais é o único método reconhecido e padronizado para relatar unidades de atividade biológica publicadas e derivadas de um esforço internacional de pesquisa colaborativa. Em concretizações particulares, as IU para composição, amostra ou fonte de uma citocina podem ser obtidas através de testes de comparação de produtos com um produto padrão OMS (WHO) análogo. Por exemplo, em algumas concretizações, a IU/mg de uma composição, amostra ou fonte de IL-2 recombinante humana, IL-7 ou IL-15 é comparada ao produto IL-2 padrão da OMS (código NIBSC: 86/500), o produto IL-17 padrão da OMS (código NIBSC: 90/530) e o produto IL-15 padrão da OMS (código NIBSC: 95/554), respectivamente.

[00251] Em algumas concretizações, a atividade biológica em IU/mg é equivalente a $(ED_{50} \text{ em ng/mL})^{-1} \times 10^6$. Em concretizações particulares, a ED_{50} de IL-2 ou IL-15 humana recombinante é equivalente à concentração necessária para a estimulação semi-máxima da proliferação celular (clivagem por XTT) com células CTLL-2. Em certas concretizações, a ED_{50} da IL-7 humana recombinante é equivalente à concentração necessária para a estimulação semi-máxima para proliferação de linfócitos do sangue periférico humano ativados por PHA. Detalhes relacionados a ensaios e cálculos de IU para IL-2 são discutidos em Wadhwa et al., *Journal of Immunological Methods* (2013), 379 (1-2): 1-7; e Gearing e Thorpe, *Journal of Immunological Methods* (1988), 114 (1-2): 3-9; detalhes relacionados a ensaios e cálculos de IU para IL-15 são discutidos em Soman et al. *Journal of Immunological Methods* (2009) 348 (1-2): 83-94.

[00252] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas com uma citocina, por exemplo, uma citocina humana recombinante, em uma concentração entre, ou de cerca de 1 IU/mL e a, ou cerca de 1.000 IU/mL, entre, ou de cerca

de 10 IU/mL e a, ou cerca de 50 IU/mL, entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 100 IU/mL, entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/mL, entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/mL, entre, ou de cerca de 250 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/mL, ou entre, ou de cerca de 500 IU/mL e a, ou cerca de 1.000 IU/mL.

[00253] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas com IL-2, por exemplo, IL-2 recombinante humano, em uma concentração entre, ou de cerca de 1 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/mL, entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 250 IU/mL, entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/mL, entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 150 IU/mL, entre, ou de cerca de 75 IU/mL e a, ou cerca de 125 IU/mL, entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/mL, ou entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 100 IU/mL, por exemplo, em um meio livre de soro. Em concretizações particulares, células, por exemplo, células da composição de entrada, são incubadas com IL-2 recombinante em uma concentração a ou a cerca de 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, ou 100 IU/mL. Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas na presença de, ou de cerca de 100 IU/mL de IL-2 recombinante, por exemplo, IL-2 recombinante humano.

[00254] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas com IL-7 recombinante, por exemplo, IL-7 recombinante humano, em uma concentração entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 2.000 IU/mL, entre, ou de cerca de 500 IU/mL e a, ou cerca de 1.000 IU/mL, entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/mL, entre, ou de cerca de 500 IU/mL e

a, ou cerca de 750 IU/mL, entre, ou de cerca de 750 IU/mL e a, ou cerca de 1.000 IU/mL, ou entre, ou de cerca de 550 IU/mL e a, ou cerca de 650 IU/mL, por exemplo, em um meio livre de soro. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas com IL-7 em uma concentração a ou a cerca de 50 IU/mL, 100 IU/mL, 150 IU/mL, 200 IU/mL, 250 IU/mL, 300 IU/mL, 350 IU/mL, 400 IU/mL, 450 IU/mL, 500 IU/mL, 550 IU/mL, 600 IU/mL, 650 IU/mL, 700 IU/mL, 750 IU/mL, 800 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, ou 1.000 IU/mL. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas na presença de, ou de cerca de 600 IU/mL de IL-7, por exemplo, IL-7 recombinante humano.

[00255] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas com IL-15 recombinante, por exemplo, IL-15 recombinante humano, em uma concentração entre, ou de cerca de 1 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/mL, entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 250 IU/mL, entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/mL, entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 150 IU/mL, entre, ou de cerca de 75 IU/mL e a, ou cerca de 125 IU/mL, entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/mL, ou entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 100 IU/mL, por exemplo, em um meio livre de soro. Em concretizações particulares, células, por exemplo, uma célula da composição de entrada, são incubadas com IL-15 recombinante em uma concentração a ou a cerca de 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, ou 200 IU/mL. Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células de entrada, são incubadas na presença de, ou de cerca de 100 IU/mL de IL-15 recombinante, por exemplo, IL-15 recombinante humano.

[00256] Em concretizações particulares, as células, por exemplo,

células da composição de entrada, são incubadas sob condições de estimulação na presença de IL-2, IL-7, e/ou IL-15, por exemplo, em um meio livre de soro. Em algumas concretizações, os IL-2, IL-7, e/ou IL-15 são recombinantes. Em certas concretizações, os IL-2, IL-7, e/ou IL-15 são humanos. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-2 recombinante humano, IL-7, e/ou IL-15. Em certas concretizações, as células são incubadas sob condições de estimulação na presença de IL-2 recombinante, IL-7, e IL-15, por exemplo, em um meio livre de soro.

[00257] As condições podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, conteúdo de oxigênio, conteúdo de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons, e/ou fatores estimulatórios, tal como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[00258] Em alguns aspectos, a incubação é realizada de acordo com as técnicas descritas na Patente Norte-americana No. 6.040.1 77 em Riddell et al., Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651–660, Terakura et al. (2012) Blood,1:72–82, e/ou Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

[00259] Em algumas concretizações, a incubação é realizada em meio livre de soro. Em algumas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura de células definido e/ou bem definido. Em certas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura controlado que foi processado, por exemplo, filtrado para remover inibidores e/ou fatores de crescimento. Em algumas concretizações, o meio livre de soro contém proteínas. Em certas concretizações, o meio livre de soro pode conter albumina sérica, hidrolisados, fatores de crescimento, hormônios, proteínas carreadoras e/ou fatores de ligação.

[00260] Em algumas concretizações, pelo menos uma porção da incubação na presença de uma ou mais condições estimulantes ou um reagente estimulatório são realizados na cavidade interna de uma câmara centrífuga, por exemplo, sob rotação centrífuga, tal como descrito em Número de Publicação Internacional WO2016/073602. Em algumas concretizações, pelo menos uma porção de uma incubação realizada em uma câmara centrífuga inclui mistura com um reagente ou reagentes para induzir estimulação e/ou ativação. Em algumas concretizações, células, tal como células selecionadas, As condições podem incluir um ou mais meios específicos, temperatura, conteúdo de oxigênio, conteúdo de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons, e/ou fatores estimulatórios, tais como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[00261] Em algumas concretizações, o agente estimulador é adicionado às células na cavidade da câmara em uma quantidade substancialmente menor que (por exemplo, não é mais do que 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80% da quantidade) em comparação com a quantidade do agente estimulante que é tipicamente usada ou seria necessária para obter aproximadamente a mesma ou similar eficiência de seleção do mesmo número de células ou o mesmo volume de células quando a seleção é realizada sem mistura em uma câmara centrífuga, por exemplo, em um tubo ou bolsa com agitação ou rotação periódica. Em algumas concretizações, a incubação é realizada com a adição de um tampão de incubação ao agente estimulante de células e para atingir um volume alvo com a incubação do reagente de, por exemplo, 10 mL a 200 mL, tal como pelo menos ou pelo menos cerca de ou cerca de ou 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL ou 200 mL. Em algumas con-

cretizações, o tampão de incubação e o agente estimulante são pré-misturados antes da adição às células. Em algumas concretizações, o tampão de incubação e o agente estimulante são separadamente adicionados às células. Em algumas concretizações, a incubação estimulante é realizada com condições periódicas de mistura suave, que podem auxiliar na promoção de interações energeticamente favorecidas e, desse modo, permitem o uso de menos agente estimulante geral, ao mesmo tempo em que estimulam e ativam células.

[00262] Em algumas concretizações, a incubação geralmente é realizada em condições de mistura, como na presença de centrifugação, geralmente em força ou velocidade relativamente baixa, velocidade abaixo da usada para granular as células, tal como a partir de ou de cerca de 600 rpm até cerca de 1700 rpm (por exemplo a, ou cerca de ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm, ou 1500 rpm ou 1700 rpm), como em um RCF na amostra ou parede da câmara ou outro recipiente de ou de cerca de 80g a 100g (por exemplo a, ou cerca de ou pelo menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, ou 100 g). Em algumas concretizações, o giro é realizado usando intervalos repetidos de giro a uma velocidade tão baixa seguida de um período de descanso, tal como um giro e/ou descanso por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 segundos, girando aproximadamente 1 ou 2 segundos, seguido de um descanso por aproximadamente 5, 6, 7 ou 8 segundos.

[00263] Em algumas concretizações, a duração total da incubação sob condições de estimulação, por exemplo, com o reagente estimulatório, é entre ou entre cerca de 1 hora e 96 horas, 1 hora e 72 horas, 1 hora e 48 horas, 4 horas e 36 horas, 8 horas e 30 horas, 12 horas e 24 horas, 18 horas e 30 horas, tal como pelo menos ou pelo menos cerca de 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas ou 72 horas. Em algumas concretizações, a duração total da incubação, por exemplo, com o reagente estimulatório, está entre ou entre cerca de 18 horas e

cerca de 30 horas.

[00264] Em algumas concretizações, as células passam por cultura, cultivo e/ou incubação sob condições de estimulação antes de e ou durante uma etapa para a introdução de um polinucleotídeo, por exemplo, um polinucleotídeo codificando um receptor recombinante, às células, por exemplo, por transdução e/ou transfecção, tal como descrito na Seção I-C. Em certas concretizações, as células passam por cultura, cultivo e/ou incubação sob condições de estimulação por um período de tempo entre 30 minutos e 2 horas, entre 1 hora e 8 horas, entre 6 horas e 12 horas, entre 12 horas e 18 horas, entre 16 horas e 24 horas, entre 18 horas e 30 horas, entre 24 horas e 48 horas, entre 24 horas e 72 horas, entre 42 horas e 54 horas, entre 60 horas e 120 horas entre 96 horas e 120 horas, entre 90 horas e entre 1 dia e 7 dias, entre 3 dias e 8 dias, entre 1 dia e 3 dias, entre 4 dias e 6 dias, ou entre 4 dias e 5 dias antes da engenharia genética. Em algumas concretizações, as células são incubadas sob condições de estimulação por ou por cerca de entre 18 horas e 30 horas. Em concretizações particulares, as células são incubadas sob condições de estimulação durante, ou durante cerca de, 24 horas.

[00265] Em algumas concretizações, incubação das células sob condições de estimulação inclui a incubação das células com um reagente estimulatório descrito na Seção I-B-1. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório contém ou inclui uma conta, tal como uma conta paramagnética, e as células são incubadas com reagente estimulatório em uma relação de menos que 3:1 (contas:células), tal como uma relação de 1:1. Em concretizações particulares, as células são incubadas com o reagente estimulatório na presença de uma ou mais citocinas. Em algumas concretizações, as células são incubadas com o reagente estimulatório em uma relação de 1:1 (contas:células) na presença de IL-2 recombinante, IL-7, e IL-15.

[00266] Em concretizações particulares, uma composição de entrada de células contendo células T CD4+ e CD8+ são incubadas sob condições de estimulação. Em certas concretizações, as células são incubadas em meio livre de soro. Em concretizações particulares, a composição de entrada contém uma relação de células T células T CD4+ para CD8+ de, ou de cerca de, 1:1. Em certas concretizações pelo menos a, ou cerca de, 100×10^6 células, por exemplo, células da composição de entrada, são incubadas, tal como em uma densidade menos que, ou cerca de 5×10^6 células/mL, sob condições de estimulação. Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de 50×10^6 células T CD4+ e pelo menos, ou cerca de 50×10^6 células T CD8+ são incubadas sob condições de estimulação. Em algumas concretizações, as células são incubadas por entre 18 horas e 30 horas. Em concretizações particulares, incubar as células sob condições de estimulação inclui incubar as células com um reagente estimulatório na presença de IL-2, IL-7, e/ou IL-15. Em certas concretizações, como as células são incubadas com o reagente estimulatório em uma relação de menos do que 3:1 de reagente estimulante para células. Em algumas concretizações, as células são incubadas com entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/mL IL-2, entre, ou de cerca de 400 e a, ou cerca de 1.000 IU/mL IL-7, e/ou entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/mL de IL-15.

[00267] Em certas concretizações, as entre 100×10^6 e 500×10^6 células de uma composição de entrada contendo CD4+ e CD8+ T em uma relação de, ou de cerca de 1:1, são incubadas sob condições de estimulação. Em certas concretizações, as células são células viáveis e/ou são negativos para um marcador apoptótico. Em algumas concretizações, a, ou cerca de 300×10^6 células da composição de entrada são incubadas. Em concretizações particulares, as células são incubadas em meio livre de soro. Em concretizações particulares as células

são incubadas em uma densidade de, ou de cerca de, 3×10^6 células/mL. Em algumas concretizações, a, ou cerca de 150×10^6 células T CD4+ e a, ou cerca de 150×10^6 células T CD8+ são incubadas. Em concretizações particulares, as células são incubadas com um reagente estimulatório em uma relação de, ou de cerca de 1:1 reagente estimulatório para células. Em certas concretizações, as células são incubadas na presença de, ou de cerca de 100 IU/mL IL-2, de, ou de cerca de, 600 IU/mL IL-7, e entre 50 IU/mL e/ou de, ou de cerca de, 200 IU/mL de IL-15.

1. Reagentes Estimulatórios

[00268] Em algumas concretizações, incubar uma composição de células enriquecidas sob condições de estimulação é ou inclui incubar e/ou entrar em contato com uma composição de células enriquecidas com um reagente estimulatório capaz de ativar e/ou expandir células T. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é capaz de estimular e/ou ativar um ou mais sinais nas células. Em algumas concretizações, os um ou mais sinais são mediados por um receptor. Em concretizações particulares, os um ou mais sinais são ou estão associados a uma alteração na transdução de sinal e/ou um nível ou quantidade de mensageiros secundários, por exemplo, cAMP e/ou cálcio intracelular, uma alteração na quantidade, localização celular, confirmação, fosforilação, ubiquitinação, e/ou truncamento de uma ou mais proteínas celulares, e/ou alteração de uma atividade celular, por exemplo, transcrição, tradução, degradação de proteínas, morfologia celular, estado de ativação, e/ou divisão celular. Em concretizações particulares, as condições de estimulação incluem incubação, cultura e/ou cultivo das células com um reagente estimulatório. Em certas concretizações, o reagente estimulatório contém ou inclui uma conta. Em certas concretizações, o início da estimulação ocorre quando as células são incubadas ou contactadas com o reagente estimulatório.

Em concretizações particulares, o reagente estimulatório contém ou inclui um reagente oligomérico, por exemplo, um oligômero de muféina de estreptavidina. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório ativa e/ou é capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias.

[00269] Em algumas concretizações, as condições de estimulação ou reagentes estimulatórios incluem um ou mais agentes, por exemplo, ligante, que é capaz de ativar um domínio de sinalização intracelular de um complexo TCR. Em algumas concretizações, um agente como aqui contemplado pode incluir, mas não está limitado a, RNA, DNA, proteínas (por exemplo, enzimas), antígenos, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos, carboidratos, lectinas lipídicas ou qualquer outra biomolécula com uma afinidade para um alvo desejado. Em algumas concretizações, o alvo desejado é um receptor de células T e/ou um componente de um receptor de células T. Em certas concretizações, o alvo desejado é CD3. Em certa concretização, o alvo desejado é uma molécula coestimulatória de células T, por exemplo, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, ou ICOS. O um ou mais agentes podem ser ligados direta ou indiretamente à conta por uma variedade de métodos conhecidos e disponíveis na técnica. Uma ligação pode ser covalente, não covalente, eletrostática ou hidrofóbica e pode ser realizada por vários meios de ligação, incluindo, por exemplo, um meio químico, um meio mecânico ou um meio enzimático. Em algumas concretizações, o agente é um anticorpo ou fragmento de ligação a um antígeno do mesmo, tal como um Fab. Em algumas concretizações, uma biomolécula (por exemplo, um anticorpo anti-CD3 biotinizado) pode ser anexada indiretamente à conta através de outra biomolécula (por exemplo, anticorpo antibiotina) que é diretamente

anexada à conta.

[00270] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório contém um ou mais agentes (por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tal como um Fab) que especificamente se liga a uma ou mais das seguintes macromoléculas em uma célula (por exemplo, uma célula T): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-gamaR, TNF-alfaR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-selectina), CD29/CD49d (VLA-4), ligante *Notch* (por exemplo tipo Delta 1/4, Jagged 1/2, etc.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, e CXCR3 ou fragmento do mesmo incluindo os ligantes correspondentes a essas macromoléculas ou fragmentos do mesmo. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório contém um ou mais agentes (por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tal como um Fab) que se ligam a uma ou mais das seguintes macromoléculas em uma célula (por exemplo, um célula T): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, e/ou CD45RO. Em algumas concretizações, o um ou mais agentes é ou é capaz de ser anexado a uma conta (por exemplo, uma conta paramagnética). Em algumas concretizações, o um ou mais agentes é ou é capaz de ser ligado (por exemplo, ligado reversivelmente) a um reagente oligomérico, por exemplo, um oligômero de muteína de estreptavidina.

[00271] Em algumas concretizações, o um ou mais agentes compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tal como um Fab. O anticorpo pode incluir um anticorpo policlonal, anticorpo monoclonal (incluindo anticorpos completos que possuem uma região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpos com especi-

ficidade poliepitópica, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos, diabéticos e moléculas de cadeia única, bem como fragmentos de anticorpos (por exemplo, Fab, F(ab')₂, e Fv). Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é ou compreende um fragmento de anticorpo (incluindo fragmento de ligação ao antígeno), por exemplo, um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, ou (Fab')₂. Será apreciado que regiões constantes de qualquer isótipo podem ser usadas para os anticorpos aqui contemplados, incluindo regiões constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, e que essas regiões constantes podem ser obtidas de qualquer espécie humana ou animal (por exemplo, espécies murinas). Em algumas concretizações, o agente é um anticorpo que se liga a e/ou reconhece um ou mais componentes de um receptor de célula T. Em concretizações particulares, o agente é ou compreende um anticorpo anti-CD3. Em certas concretizações, o agente é ou compreende um anticorpo que se liga a e/ou reconhece um correceptor. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é ou compreende um anticorpo anti-CD28.

[00272] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células da população de entrada, são estimuladas na presença de uma relação de reagente estimulatório para células a ou a cerca de 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,5:1, 1,25:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 0,9:1, 0,8:1, 0,75:1, 0,67:1, 0,5:1, 0,3:1, ou 0,2:1. Em concretizações particulares, a relação de reagente estimulatório para células é entre 2,5:1 e 0,2:1, entre 2:1 e 0,5:1, entre 1,5:1 e 0,75:1, entre 1,25:1 e 0,8:1, entre 1,1:1 e 0,9:1. Em concretizações particulares, a relação de reagente estimulatório para células é de cerca de 1:1 ou é 1:1.

[00273] Em algumas concretizações, as células são estimuladas na presença de cerca de, ou de pelo menos 0,01 µg, 0,02 µg, 0,03 µg, 0,04 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,4 µg, 0,5 µg, 0,75 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, ou 10 µg do reagente esti-

mulatório por 10^6 células. Em algumas concretizações, as células são estimuladas na presença de, ou de cerca de $4 \mu\text{g}$ por 10^6 células. Em concretizações particulares, as células são estimuladas na presença de, ou de cerca de $0,8 \mu\text{g}$ por 10^6 células. Em várias concretizações, as células são estimuladas na presença de, ou de cerca de $0,8 \mu\text{g}$ por 10^6 células.

a. Reagentes de conta

[00274] Em certas concretizações, o reagente estimulatório contém uma partícula, por exemplo, uma conta, que é conjugada ou ligada a um ou mais agentes, por exemplo, biomoléculas, que são capazes de ativar e/ou expandir células, por exemplo, células T. Em algumas concretizações, um ou mais agentes são ligados a uma conta. Em algumas concretizações, a conta é biocompatível, isto é, composta de um material que é adequado para uso biológico. Em algumas concretizações, as contas são não tóxicas para células cultivadas, por exemplo, células T cultivadas. Em algumas concretizações, as contas podem ser quaisquer partículas que são capazes de ligar agentes de uma maneira que permita uma interação entre o agente e uma célula.

[00275] Em algumas concretizações, um reagente estimulatório contém um ou mais agentes que são capazes de ativar e/ou expandir células, por exemplo, células T, que são ligadas a ou de outro modo ligadas a uma conta, por exemplo, à superfície da conta. Em certas concretizações, a conta é uma partícula não celular. Em concretizações particulares, a conta pode incluir uma partícula coloidal, uma microesfera, nanopartícula, uma conta magnética, ou similares. Em algumas concretizações as contas são contas de agarose. Em certas concretizações, as contas são contas de sefarose.

[00276] Em concretizações particulares, o reagente estimulatório contém contas que são monodispersas. Em certas concretizações, contas que são monodispersas compreendem dispersões de tamanho

tendo um desvio padrão de diâmetro de menos do que 5% de cada um.

[00277] Em algumas concretizações, a conta contém um ou mais agentes, tais como um agente que acoplado, conjugado, ou ligado (diretamente ou indiretamente) à superfície da conta. Em algumas concretizações, um agente como contemplado aqui pode incluir, mas não é limitado a, RNA, DNA, proteínas (por exemplo, enzimas), antígenos, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpo, carboidratos, lipídeos lecitinas, ou qualquer outra biomolécula com uma afinidade para um alvo desejado. Em algumas concretizações, o alvo desejado é um receptor de célula T e/ou um componente de um receptor de célula T. Em certas concretizações, o alvo desejado é CD3. Em certas concretizações, o alvo desejado é uma molécula coestimulatória de célula T, por exemplo, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, ou ICOS. Um ou mais agentes podem ser ligados diretamente ou indiretamente à conta por uma variedade de métodos conhecidos e disponíveis na técnica. A ligação pode ser covalente, não covalente, eletrostática, ou hidrofóbica e pode ser realizada por vários meios de ligação, incluindo por exemplo, um meio químico, um meio mecânico, ou um meio enzimático. Em algumas concretizações, uma biomolécula (por exemplo, um anticorpo anti-CD3 biotilado) pode ser ligada indiretamente à conta por meio de outra biomolécula (por exemplo, anticorpo anti-biotina) que é diretamente ligada à conta.

[00278] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório contém uma conta e um ou mais agentes que diretamente interagem com um macromolécula na superfície de uma célula. Em certas concretizações, a conta (por exemplo, uma conta paramagnética) interage com uma célula por meio de um ou mais agentes (por exemplo, um anticorpo) específicos para uma ou mais macromoléculas na célula (por exemplo, uma ou mais proteínas de superfície celular). Em certas con-

cretizações, a conta (por exemplo, uma conta paramagnética) é marcada com um primeiro agente descrito aqui, tal como um anticorpo primário (por exemplo, um anticorpo anti-biotina) ou outra biomolécula, e em seguida, um segundo agente, tal como um anticorpo secundário (por exemplo, um anticorpo anti-CD3 biotinilado) ou outra segunda biomolécula (por exemplo, estreptavidina), é adicionado, através do qual o segundo anticorpo secundário ou outra segunda biomolécula especificamente se liga a tais anticorpos primários ou outra biomolécula na partícula.

[00279] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório contém um ou mais agentes (por exemplo, anticorpo) que é ligado a uma conta (por exemplo, uma conta paramagnética) e especificamente se liga a uma ou mais das seguintes macromoléculas em uma célula (por exemplo, uma célula T): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-gammaR, TNF-alfaR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$), CD62L (L-selectina), CD29/CD49d (VLA-4), ligante Notch (por exemplo, tipo Delta 1/4, Jagged 1/2, etc.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, e CXCR3 ou fragmento do mesmo incluindo os ligantes correspondentes a estas macromoléculas ou fragmentos dos mesmos. Em algumas concretizações, um agente (por exemplo, anticorpo) ligado à conta especificamente se liga a uma ou mais das seguintes macromoléculas em uma célula (por exemplo, uma célula T): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, e/ou CD45RO.

[00280] Em algumas concretizações, um ou mais dos agentes ligados à conta é um anticorpo. O anticorpo pode incluir um anticorpo policlonal, anticorpo monoclonal (incluindo anticorpos de tamanho natural

que têm uma região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpo com especificidade poliepitópica, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos, diacorpos, e moléculas de cadeia única, bem como fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab, F(ab')₂, e Fv). Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é um fragmento de anticorpo (incluindo fragmento de ligação ao antígeno), por exemplo, um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, ou (Fab')₂. Deve ser apreciado que regiões constantes de qualquer isotipo podem ser usadas para os anticorpos contemplados aqui, incluindo regiões constantes IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que tais regiões constantes podem ser obtidas de qualquer humano ou espécie de animal (por exemplo, espécie de murinos). Em algumas concretizações, o agente é um anticorpo que se liga a e/ou reconhece um ou mais componentes de um receptor de célula T. Em concretizações particulares, o agente é um anticorpo anti-CD3. Em certas concretizações, o agente é um anticorpo que se liga a e/ou reconhece um co-receptor. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório compreende um anticorpo anti-CD28. Em algumas concretizações, a conta tem um diâmetro de mais que, ou cerca de 0,001 µm, mais que, ou cerca de 0,01 µm, mais que, ou cerca de 0,1 µm, mais que, ou cerca de 1,0 µm, mais que, ou cerca de 10 µm, mais que, ou cerca de 50 µm, mais que, ou cerca de 100 µm ou mais que, ou cerca de 1000 µm e não mais do que, ou cerca de 1500 µm. Em algumas concretizações, a conta tem um diâmetro de, ou cerca de 1,0 µm, ou cerca de 500 µm, ou cerca de 1,0 µm, ou cerca de 150 µm, ou cerca de 1,0 µm, ou cerca de 30 µm, ou cerca de 1,0 µm, ou cerca de 10 µm, ou cerca de 1,0 µm, ou cerca de 5,0 µm, ou cerca de 2,0 µm, ou cerca de 5,0 µm, ou a cerca de 3,0 µm, ou cerca de 5,0 µm. Em algumas concretizações, a conta tem um diâmetro de, ou cerca de 3 µm, ou cerca de 5 µm. Em algumas concretizações, a conta tem um diâmetro de pelo menos ou pelo menos cerca de ou cer-

ca de 0,001 μm , 0,01 μm , 0,1 μm , 0,5 μm , 1,0 μm , 1,5 μm , 2,0 μm , 2,5 μm , 3,0 μm , 3,5 μm , 4,0 μm , 4,5 μm , 5,0 μm , 5,5 μm , 6,0 μm , 6,5 μm , 7,0 μm , 7,5 μm , 8,0 μm , 8,5 μm , 9,0 μm , 9,5 μm , 10 μm , 12 μm , 14 μm , 16 μm , 18 μm ou 20 μm . Em certas concretizações, a conta tem um diâmetro de ou cerca de 4,5 μm . Em certas concretizações, a conta tem um diâmetro de ou cerca de 2,8 μm .

[00281] Em algumas concretizações, as contas têm uma densidade de mais que, ou cerca de 0,001 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,01 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,05 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,1 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,5 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,6 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,7 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,8 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 0,9 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 1 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 1,1 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 1,2 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 1,3 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 1,4 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 1,5 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 2 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 3 g / cm^3 , mais que, ou cerca de 4 g / cm^3 , ou mais que, ou cerca de 5 g / cm^3 . Em algumas concretizações, as contas têm uma densidade entre, ou cerca de 0,001 g / cm^3 e ou cerca de 100 g / cm^3 , ou cerca de 0,01 g / cm^3 e, ou cerca de 50 g / cm^3 , ou cerca de 0,1 g / cm^3 e, ou cerca de 10 g / cm^3 , ou cerca de 0,1 g / cm^3 e ou cerca de 0,5 g / cm^3 , ou cerca de 0,5 g / cm^3 e, ou cerca de 1 g / cm^3 , ou cerca de 0,5 g / cm^3 e ou cerca de 1,5 g / cm^3 , ou cerca de 1 g / cm^3 e, ou cerca de 1,5 g / cm^3 , ou cerca de 1 g / cm^3 e, ou cerca de 2 g / cm^3 , ou cerca de 1 g / cm^3 e, ou cerca de 5 g / cm^3 . Em algumas concretizações, as contas têm uma densidade de, ou cerca de 0,5 g / cm^3 , ou cerca de 0,5 g / cm^3 , ou cerca de 0,6 g / cm^3 , ou cerca de 0,7 g / cm^3 , ou cerca de 0,8 g / cm^3 , ou cerca de 0,9 g / cm^3 , ou cerca de 1,0 g / cm^3 , ou cerca de 1,1 g / cm^3 , ou cerca de 1,2 g / cm^3 , ou cerca de 1,3 g / cm^3 , ou cerca de 1,4 g / cm^3 , ou cerca de 1,5 g / cm^3 , ou cerca de 1,6 g / cm^3 , ou cerca de 1,7 g / cm^3 , ou cerca de 1,8 g / cm^3 , ou cer-

ca de $1,9 \text{ g / cm}^3$, ou cerca de $2,0 \text{ g / cm}^3$. Em certas concretizações, as contas têm uma densidade de, ou cerca de $1,6 \text{ g / cm}^3$. Em concretizações particulares, as contas ou partículas têm uma densidade de, ou cerca de $1,5 \text{ g / cm}^3$. Em certas concretizações, as partículas têm uma densidade de, ou cerca de $1,3 \text{ g / cm}^3$.

[00282] Em certas concretizações, uma pluralidade das contas tem uma densidade uniforme. Em certas concretizações, uma densidade uniforme compreende um desvio padrão de densidade de menos do que, ou cerca de 10%, menos do que, ou cerca de 5%, ou menos do que, ou cerca de 1% da densidade média da conta.

[00283] Em algumas concretizações, as contas têm uma área de superfície entre, ou cerca de $0,001 \text{ m}^2$ por cada grama de partículas (m^2 / g) a, ou cerca de $1,000 \text{ m}^2 / \text{g}$, a ou cerca de $,010 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $100 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $0,1 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $10 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $0,1 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $1 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $1 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $10 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $10 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $100 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $0,5 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $20 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $0,5 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $5 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou a cerca de $1 \text{ m}^2 / \text{g}$ ou cerca de $4 \text{ m}^2 / \text{g}$. Em algumas concretizações, as partículas ou contas têm uma área de superfície cerca de $1 \text{ m}^2 / \text{g}$, ou cerca de $4 \text{ m}^2 / \text{g}$.

[00284] Em algumas concretizações, a conta contém pelo menos um material na ou próximo à superfície da conta que pode ser acoplado, ligado, ou conjugado a um agente. Em algumas concretizações, a conta tem superfície funcionalizada, por exemplo, compreende grupos funcionais que são capazes de formar uma ligação covalente com uma molécula de ligação, por exemplo, um polinucleotídeo ou um polipeptídeo. Em concretizações particulares, a conta compreende grupos carboxila expostos à superfície, amino, hidroxila, tosila, epóxi, e/ou clorometila. Em concretizações particulares, as contas compreendem agarose e/ou sefarose expostos à superfície. Em certas concretizações, a

superfície da conta compreende reagentes estimulatórios ligados que podem se ligar a ou ligar moléculas de ligação. Em concretizações particulares, as biomoléculas são polipeptídeos. Em algumas concretizações, as contas compreendem proteína A, proteína G, ou biotina expostos à superfície.

[00285] Em algumas concretizações, a conta reage em um campo magnético. Em algumas concretizações, a conta é uma conta magnética. Em algumas concretizações, a conta magnética é paramagnética. Em concretizações particulares, a conta magnética é superparamagnética. Em certas concretizações, as contas não exibem quaisquer propriedades magnéticas a menos que elas sejam expostas a um campo magnético.

[00286] Em concretizações particulares, a conta compreende um núcleo magnético, um núcleo paramagnético, ou um núcleo superparamagnético. Em algumas concretizações, o núcleo magnético contém um metal. Em algumas concretizações, o metal pode ser, mas não é limitado a, ferro, níquel, cobre, cobalto, gadolínio, manganês, tântalo, zinco, zircônio ou qualquer combinação dos mesmos. Em certas concretizações, o núcleo magnético compreende óxidos metálicos (por exemplo, óxidos de ferro), ferrites (por exemplo, ferrites de manganês, ferrites de cobalto, ferrites de níquel, etc.), hematita e ligas de metal (por exemplo, CoTaZn). Em algumas concretizações, o núcleo magnético compreende uma ou mais de um ferrite, um metal, uma liga de metal, um óxido de ferro, ou dióxido de crômio. Em algumas concretizações, o núcleo magnético compreende ferro elementar ou um composto do mesmo. Em algumas concretizações, o núcleo magnético compreende uma ou mais de magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), ou greigita (Fe_3S_4). Em algumas concretizações, o núcleo interno compreende um óxido de ferro (por exemplo, Fe_3O_4).

[00287] Em certas concretizações, a conta contém um núcleo mag-

nética, paramagnética, e/ou superparamagnética que é coberto por uma superfície funcionalizada é coberto por um revestimento ou revestimento funcionalizado de superfície. Em algumas concretizações, o revestimento pode conter um material que pode incluir, mas não é limitado a, um polímero, um polissacarídeo, uma sílica, um ácido graxo, uma proteína, um carbono, agarose, sefarose, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas concretizações, o polímero pode ser um polietileno glicol, poli (ácido láctico-co-glicólico), poliglutaraldeído, poliuretano, poliestireno, ou um álcool polivinílico. Em certas concretizações, o revestimento externo ou revestimento compreende poliestireno. Em concretizações particulares, o revestimento tem superfície funcionalizada.

[00288] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório compreende uma conta que contém um núcleo de óxido metálico (por exemplo, um núcleo de óxido de ferro) e um revestimento, em que o núcleo de óxido metálico compreende pelo menos um polissacarídeo (por exemplo, dextran), e em que o revestimento compreende pelo menos um polissacarídeo (por exemplo, amino dextran), pelo menos um polímero (por exemplo, poliuretano) e sílica. Em algumas concretizações, o núcleo de óxido metálico é um núcleo de óxido de ferro coloidal. Em certas concretizações, um ou mais agentes incluem um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. Em concretizações particulares, um ou mais agentes incluem um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório compreende um anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD28, e um anticorpo anti-biotina. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório compreende um anticorpo anti-biotina. Em algumas concretizações, a conta tem um diâmetro de cerca de 3 μm a cerca de 10 μm . Em algumas concretizações, a conta tem um diâmetro de cerca de 3 μm a cerca de 5 μm . Em certas concretizações, a conta tem

um diâmetro de cerca de 3,5 μm .

[00289] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório compreende um ou mais agentes que são ligados a uma conta compreendendo um núcleo de óxido metálico (por exemplo, um núcleo interno de óxido de ferro) e um revestimento (por exemplo, um revestimento protetivo), em que o revestimento compreende poliestireno. Em certas concretizações, as contas são contas monodispersas, paramagnéticas (por exemplo, superparamagnéticas) compreendendo um núcleo interno paramagnético (por exemplo, superparamagnético), por exemplo, um núcleo compreendendo magnetita (Fe_3O_4) e/ou maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) e um revestimento de poliestireno ou um revestimento. Em algumas concretizações, a conta é não porosa. Em algumas concretizações, as contas contêm uma superfície funcionalizada a qual um ou mais agentes são ligados. Em certas concretizações, um ou mais agentes são covalentemente ligados às contas na superfície. Em algumas concretizações, um ou mais agentes incluem um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em algumas concretizações, um ou mais agentes incluem um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Em algumas concretizações, um ou mais agentes incluem um anticorpo anti-CD3 e/ou um anticorpo anti-CD28, e um anticorpo ou fragmento de antígeno do mesmo capaz de ligação a um anticorpo marcado (por exemplo, anticorpo biotinilado), tal como um anticorpo anti-CD3 ou anti-CD28 marcado. Em certas concretizações, as contas têm uma densidade de cerca de 1,5 g / cm^3 e uma área de superfície de cerca de 1 m^2 / g a cerca de 4 m^2 / g. Em concretizações particulares; as contas são contas superparamagnéticas monodispersas que têm um diâmetro de cerca de 4,5 μm e uma densidade de cerca de 1,5 g / cm^3 . Em algumas concretizações, as contas são contas superparamagnéticas monodispersas que têm um diâmetro médio de cerca de 2,8 μm e uma densidade de cerca de 1,3 g / cm^3 .

[00290] Em algumas concretizações, a composição de células T enriquecidas é incubada com reagente estimulatório, uma relação de contas para células em ou em cerca de 3 : 1, 2,5 : 1, 2 : 1, 1,5 : 1, 1,25 : 1, 1,2 : 1, 1,1 : 1, 1 : 1, 0,9 : 1, 0,8 : 1, 0,75 : 1, 0,67 : 1, 0,5 : 1, 0,3 : 1, ou 0,2 : 1. Em concretizações particulares, a relação de contas para células está entre 2,5 : 1 e 0,2 : 1, entre 2 : 1 e 0,5 : 1, entre 1,5 : 1 e 0,75 : 1, entre 1,25 : 1 e 0,8 : 1, entre 1,1 : 1 e 0,9 : 1. Em concretizações particulares, a relação de contas para células é cerca de 1 : 1 ou é 1:1.

b. Reagentes Oligoméricos

[00291] Em concretizações particulares, o reagente estimulatório contém um reagente oligomérico, por exemplo, um reagente de muteína de estreptavidina, que é conjugado, ligado (linked) ou ligado (attached) a um ou mais agentes, por exemplo, ligante, que é capaz de ativar um domínio de sinalização intracelular de um complexo TCR. Em algumas concretizações, um ou mais agentes tem um domínio de ligação ligado ou parceiro de ligação (por exemplo, um parceiro de ligação C) que é capaz de ligação ao reagente oligomérico em sítios de ligação particulares (por exemplo, sítio de ligação Z). Em algumas concretizações, uma pluralidade do agente é reversivelmente ligado ao reagente oligomérico. Em várias concretizações, o reagente oligomérico tem uma pluralidade dos sítios de ligação particulares que, em certas concretizações, são reversivelmente ligados a uma pluralidade de agentes no domínio de ligação (por exemplo, parceiro de ligação C). Em algumas concretizações, a quantidade de agentes de ligação é reduzida ou diminuída na presença de um reagente de competição, por exemplo, um reagente que também é capaz de se ligar aos sítios de ligação particulares (por exemplo, sítio de ligação Z). Dentre os reagentes estimulatórios oligoméricos, incluindo reagente de muteína de estreptavidina oligomérica anti-D3 / anti-CD28, são descritos em Publi-

cação PCT Internacional NO. WO2018/197949.

[00292] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é ou inclui sistemas reversíveis em que pelo menos um agente (por exemplo, um agente que é capaz de produzir um sinal em uma célula tal como uma célula T) é associado, por exemplo, reversivelmente associado, com o reagente oligomérico. Em algumas concretizações, o reagente contém uma pluralidade de sítios de ligação capazes de se ligar, por exemplo, reversivelmente se ligar, ao agente. Em alguns casos, o reagente é um reagente de partícula oligomérica tendo pelo menos um agente ligado capaz de produzir um sinal em uma célula, tal como uma célula T. Em algumas concretizações, o agente contém pelo menos um sítio de ligação, por exemplo, um sítio de ligação B, que pode especificamente se ligar a um epítipo ou região da molécula e também contém um parceiro de ligação, também referido aqui como um parceiro de ligação C, que especificamente se liga a pelo menos um sítio de ligação do reagente, por exemplo, sítio de ligação Z do reagente. Em algumas concretizações, a interação de ligação entre o parceiro de ligação C e pelo menos um sítio de ligação Z é uma interação não covalente. Em alguns casos, a interação de ligação entre o parceiro de ligação C e pelo menos um sítio de ligação Z é uma interação covalente. Em algumas concretizações, a interação de ligação, tal como interação não covalente, entre o parceiro de ligação C e pelo menos um sítio de ligação Z é reversível.

[00293] Substâncias que podem ser usadas como reagentes oligoméricos em tais sistemas reversíveis são conhecidas, veja, por exemplo, Patente Norte-americana Nos. 5,168,049; 5,506,121; 6,103,493; 7,776,562; 7,981,632; 8,298,782; 8,735,540; 9,023,604; e Pedido PCT publicado Internacional Nos. WO2013/124474 e WO2014/076277. Exemplos não limitantes de reagentes e parceiros de ligação capazes de formar uma interação reversível, bem como substâncias (por

exemplo, reagentes de competição) capazes de reversão, tal como ligação, são descritos abaixo.

[00294] Em algumas concretizações, o reagente oligomérico é um oligômero de estreptavidina, muteína de estreptavidina ou análogo, avidina, uma muteína de avidina ou análogo (tal como, neutravidina) ou uma mistura dos mesmos, na qual tal reagente oligomérico contém um ou mais sítios de ligação para associação reversível com o domínio de ligação do agente (por exemplo, um parceiro de ligação C). Em algumas concretizações, o domínio de ligação do agente pode ser uma biotina, um derivado de biotina ou análogo, ou um peptídeo de ligação à estreptavidina ou outra molécula que é capaz de se ligar especificamente a estreptavidina, uma muteína de estreptavidina ou análogo, avidina ou uma muteína de avidina ou análogo.

[00295] Em certas concretizações, um ou mais agentes (por exemplo, agentes que são capazes de produzir um sinal em uma célula, tal como uma célula T) associados com, tais como são reversivelmente ligados ao reagente oligomérico, tal como por meio da pluralidade dos sítios de ligação particulares (por exemplo, sítios de ligação Z) presentes no reagente oligomérico. Em alguns casos, estes resultados nos agentes sendo estreitamente dispostos um ao outro de modo que um efeito de avidéz possa ocorrer se uma célula alvo tendo (pelo menos duas cópias de) uma molécula de superfície celular que é ligada ou reconhecida pelo agente for colocada em contato com o agente.

[00296] Em algumas concretizações, o reagente oligomérico é um oligômero de estreptavidina, um oligômero de muteína de estreptavidina, um oligômero de análogo à estreptavidina, um oligômero de avidina, um oligômero composto de muteína de avidina ou análogo de avidina (tal como, neutravidina) ou uma mistura dos mesmos. Em concretizações particulares, os reagentes oligoméricos contém sítios de ligação particulares que são capazes de se ligar a um domínio de ligação

(por exemplo, o parceiro de ligação C) de um agente. Em algumas concretizações, o domínio de ligação pode ser uma biotina, um derivado de biotina ou análogo, ou um peptídeo de ligação à estreptavidina ou outra molécula que é capaz de se ligar especificamente a estreptavidina, uma muteína de estreptavidina ou análogo, avidina ou uma muteína de avidina ou análogo.

[00297] Em algumas concretizações, a estreptavidina pode ser estreptavidina tipo selvagem, muteínas de estreptavidina ou análogos, tais como polipeptídeos tipo estreptavidina. Da mesma forma, avidina, em alguns aspectos, inclui avidina tipo selvagem ou muteínas ou análogos de avidina tal como neutravidina, um avidina desglicosada com argininas modificadas que tipicamente exhibe um pi mais neutro e está disponível como uma alternativa a avidina nativa. Geralmente, formas desglicosadas, neutras de avidina incluem aquelas formas comercialmente disponíveis, tais como "Extravidina" disponível por meio de Sigma Aldrich, ou "NeutrAvidin" disponível de Thermo Scientific ou Invitrogen, por exemplo.

[00298] Em algumas concretizações, o reagente é uma estreptavidina ou uma muteína de estreptavidina ou análogo. Em algumas concretizações, estreptavidina tipo selvagem (wt-estreptavidina) tem a sequência de aminoácido divulgada por Argarana et al, Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO: 72). Em geral, estreptavidina naturalmente ocorre como um tetrâmero de quatro subunidades idênticas, por exemplo, ela é um homo-tetrâmero, onde cada subunidade contém um sítio de ligação único para biotina, um derivados de biotina ou análogo ou um imitador de biotina. Uma sequência exemplar de uma subunidade de estreptavidina é a sequência de aminoácidos fornecida em SEQ ID NO: 72, porém tal sequência também pode incluir uma sequência presente em homólogos do mesmo de outras espécies *Streptomyces*. Em particular, cada subunidade de estreptavidina pode

exibir uma afinidade de ligação forte para biotina com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) na ordem de, ou cerca de 10^{-14} M. Em alguns casos, estreptavidina pode existir como um tetrâmero monovalente no qual apenas um dos quatro sítios de ligação é funcional (Howarth et al. (2006) Nat. Methods, 3:267-73; Zhang et al. (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 463:1059-63)), um tetrâmero divalente no qual dois dos quatro sítios de ligação são funcionais (Fairhead et al. (2013) J. Mol. Biol., 426:199-214), ou podem estar presentes na forma monomérica ou dimérica (Wu et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:23225-31; Lim et al. (2010) Biochemistry, 50:8682-91).

[00299] Em algumas concretizações, estreptavidina pode estar em qualquer forma, tal como estreptavidina tipo selvagem ou não modificada, tal como uma estreptavidina de uma espécie de *Streptomyces* ou um fragmento funcionalmente ativo do mesmo que inclui pelo menos uma subunidade funcional contendo um sítio de ligação para biotina, um derivado de biotina ou análogo ou um imitador de biotina, tal como geralmente contém pelo menos uma subunidade funcional de uma estreptavidina tipo selvagem de *Streptomyces avidinii* fornecida SEQ ID NO: 72 ou um fragmento funcionalmente ativo da mesma. Por exemplo, em algumas concretizações, estreptavidina pode incluir um fragmento de estreptavidina tipo selvagem, que é encurtado na terminação N e/ou C. Tais estreptavidinas mínimas incluem qualquer uma que inicie na terminação N na região de posições de aminoácido 10 a 16 de SEQ ID NO: 72 e termine na terminação C na região de posições de aminoácido 133 a 142 de SEQ ID NO: 72. Em algumas concretizações, um fragmento funcionalmente ativo de estreptavidina contém a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 73. Em algumas concretizações, estreptavidina, tal como fornecida na SEQ ID NO: 73, pode também conter uma metionina de terminação N em uma posição correspondente a Ala13 com numeração fornecida na SEQ ID

NO: 72. Referência à posição de resíduos na estreptavidina ou muteínas de estreptavidina é com referência à numeração de resíduos na SEQ ID NO: 72.

[00300] Exemplos de estreptavidinas ou muteínas de estreptavidina são mencionados, por exemplo, em WO 86/02077, DE 19641876 AI, US 6,022,951, WO 98/40396 ou WO 96/24606. Exemplos de muteínas de estreptavidina são conhecidos na técnica, ver, por exemplo, Patente Norte-americana No. 5,168,049; 5,506,121; 6,022,951; 6,156,493; 6,165,750; 6,103,493; ou 6,368,813; ou Pedido PCT publicado Internacional No. WO2014/076277.

[00301] Em algumas concretizações, uma muteína de estreptavidina pode conter aminoácidos que não são parte de uma estreptavidina não modificada ou tipo selvagem ou podem incluir apenas uma parte de uma estreptavidina não modificada ou tipo selvagem. Em algumas concretizações, uma muteína de estreptavidina contém pelo menos uma subunidade que pode ter uma ou mais substituições de aminoácido (substituições) comparada com uma subunidade de uma estreptavidina não modificada ou tipo selvagem, tal como comparada à subunidade de estreptavidina tipo selvagem fornecida na SEQ ID NO: 72 ou um fragmento funcionalmente ativo da mesma, por exemplo, fornecido na SEQ ID NO: 73 ou SEQ ID NO: 94.

[00302] Em algumas concretizações, a afinidade de ligação, tal como constante de dissociação (K_d), de estreptavidina ou uma muteína de estreptavidina para um domínio de ligação é menor do que, ou cerca de 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M ou 1×10^{-7} M, porém geralmente maior que 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M ou 1×10^{-11} M. Por exemplo, sequências de peptídeos (Strep-tags), tal como divulgadas na Patente Norte-americana No. 5,506,121, podem agir com imitadores de biotina e demonstram uma afinidade de ligação para estreptavidina, por exemplo, com um K_D de aproximadamente

entre 10^{-4} e 10^{-5} M. Em alguns casos, a afinidade de ligação pode também ser melhorada fazendo uma mutação dentro da molécula de estreptavidina, veja, por exemplo, Patente Norte-americana No. 6,103,493 ou Pedido PCT publicado internacional No. WO2014/076277. Em algumas concretizações, afinidade de ligação pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica, tais como qualquer um descrito aqui.

[00303] Em algumas concretizações, o reagente, tal como uma estreptavidina ou muteína de estreptavidina, exibe afinidade de ligação por um parceiro de ligação de ligante de peptídeo, cujo parceiro de ligação de ligante de peptídeo pode ser o parceiro de ligação C presente no agente (por exemplo, agente de ligação ao receptor ou agente de seleção). Em algumas concretizações, a sequência de peptídeo contém uma sequência com a fórmula geral His-Pro-Xaa, onde Xaa é glutamina, asparagina, ou metionina, tal como contém a sequência fornecida em SEQ ID NO: 89. Em algumas concretizações, a sequência de peptídeo tem a fórmula geral fornecida na SEQ ID NO: 90, tal como fornecida em SEQ ID NO: 80. Em um exemplo, a sequência de peptídeo é Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (também chamada Strep-tag®, fornecida em SEQ ID NO: 81). Em um exemplo, a sequência de peptídeo é Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (também chamada Strep-tag® II, fornecida em SEQ ID NO: 75). Em algumas concretizações, o ligante de peptídeo contém um arranjo sequencial de pelo menos dois módulos de ligação à estreptavidina, em que a distância entre os dois módulos é pelo menos 0 e não mais que 50 aminoácidos, em que uma molécula de ligação tem 3 a 8 aminoácidos e contém pelo menos uma sequência His-Pro-Xaa, onde Xaa é glutamina, asparagina, ou metionina, e em que o módulo de ligação tem o mesmo ou diferentes ligantes de peptídeo de estreptavidina, tal como fornecidos SEQ ID NO: 90 (ver, por exemplo, Pedido PCT Publicado Internacional No.

WO02/077018; Patente Norte-americana No. 7,981,632). Em algumas concretizações, o ligante de peptídeo contém uma sequência tendo a fórmula fornecida em qualquer um de SEQ ID NO: 82 ou 83. Em algumas concretizações, o ligante de peptídeo tem a sequência de aminoácidos fornecida em qualquer uma de SEQ ID NOS: 76 a 78 e 84 a 85. Na maioria dos casos, todos esses peptídeos de ligação à estreptavidina se ligam ao mesmo sítio de ligação, ou seja, o sítio de ligação à biotina de estreptavidina. Se um ou mais de tais peptídeos de ligação à estreptavidina é usado como parceiros de ligação C, por exemplo, C1 e C2, o reagente de multimerização e/ou reagentes de partícula oligomérica ligados aos um ou mais agentes por meio do parceiro de ligação C é tipicamente composto de uma ou mais muteínas de estreptavidina.

[00304] Em algumas concretizações, a muteína de estreptavidina é um mutante como descrito em Patente Norte-americana No. 6.103.493. Em algumas concretizações, a muteína de estreptavidina contém pelo menos uma mutação dentro da região de posições de aminoácido 44 a 53, com base na sequência de aminoácido de estreptavidina tipo selvagem, tal como fornecida na SEQ ID NO: 72. Em algumas concretizações, a muteína de estreptavidina contém uma mutação em um ou mais resíduos 44, 45, 46, e/ou 47. Em algumas concretizações, a muteína de estreptavidina contém uma substituição de Glu na posição 44 de estreptavidina tipo selvagem com um aminoácido alifático hidrofóbico, por exemplo, Val, Ala, Ile ou Leu, qualquer aminoácido na posição 45, um aminoácido alifático, tal como um aminoácido alifático hidrofóbico na posição 46 e/ou uma substituição de Val na posição 47 com um aminoácido básico, por exemplo, Arg ou Lys, tal como geralmente Arg. Em algumas concretizações, Ala está na posição 46 e/ou Arg está na posição 47 e/ou al ou Ile estão na posição 44. Em algumas concretizações, o mutante de estreptavidina

contém resíduos Val44-Thr45-Ala46-Arg47, tal como fornecidos em muteínas de estreptavidina exemplares contendo a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 86 ou SEQ ID NO: 87 ou 88 (também conhecida como mutante de estreptavidina 1, SAM1). Em algumas concretizações, a muteína de estreptavidina contém resíduos Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, tais como fornecidos em muteínas de estreptavidina exemplares contendo a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 91, 74, ou 79 (também conhecida como SAM2). Em alguns casos, tal muteína de estreptavidina é descrita, por exemplo, na Patente Norte-americana 6,103,493, e está comercialmente disponível sob a marca registrada Strep-Tactin®. Em algumas concretizações, a muteína de estreptavidina contém a sequência de aminoácidos fornecida em SEQ ID NO: 92 ou SEQ ID NO: 93. Em concretizações particulares, a molécula é um tetrâmero de estreptavidina ou uma muteína de estreptavidina compreendendo uma sequência fornecida em qualquer uma das SEQ ID NOS: 73, 87, 74, 92, 94, 88, ou 79, que, como um tetrâmero, é uma molécula que contém 20 aminas primárias, incluindo 1 amina de terminação N e 4 lisinas por monômero.

[00305] Em algumas concretizações, muteína de estreptavidina exibe uma afinidade de ligação caracterizada por uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) que é ou é menor que, ou cerca de $3,7 \times 10^{-5}$ M para o ligante de peptídeo (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; também chamado Strep-tag®, fornecido em SEQ ID NO: 81) e/ou que é menor que, ou cerca de $7,1 \times 10^{-5}$ M para o ligante de peptídeo (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; também chamado Strep-tag® II, fornecido em SEQ ID NO: 75) e/ou que é ou é menor que, ou cerca de $7,0 \times 10^{-5}$ M, $5,0 \times 10^{-5}$ M, $1,0 \times 10^{-5}$ M, $5,0 \times 10^{-6}$ M, $1,0 \times 10^{-6}$ M, $5,0 \times 10^{-7}$ M, ou $1,0 \times 10^{-7}$ M, porém geralmente maior que, ou cerca de 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M ou 1×10^{-11} M para qualquer um dos ligantes de peptídeo fornecidos em qualquer uma das SEQ ID NOS: 75, 82 a 85, 76 a

78, 80, 81, 89, e 90.

[00306] Em algumas concretizações, a muteína de estreptavidina resultante exibe uma afinidade de ligação caracterizada por uma constante de associação de equilíbrio (K_A) que é ou é maior que, ou cerca de $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para o ligante de peptídeo (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; também chamado de Strep-tag®, fornecido na SEQ ID NO: 81) e/ou que é ou é maior que, ou cerca de $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para o ligante de peptídeo (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; também chamado Strep-tag® II, fornecido na SEQ ID NO: 75) e/ou que é ou é maior que, ou cerca de $1,43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,11 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,43 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,11 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,43 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, porém geralmente menor que $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ ou $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ para qualquer um dos ligantes de peptídeo fornecidos em qualquer uma das SEQ ID NOS: 75, 82 a 85, 76 a 78, 80, 81, 89, e 90.

[00307] Em concretizações particulares, é fornecido aqui um reagente de partícula oligomérica que é composto de e/ou contém uma pluralidade de estreptavidina ou tetrâmeros de muteína de estreptavidina. Em certas concretizações, o reagente de partícula oligomérica fornecido aqui contém uma pluralidade de sítios de ligação que ligam reversivelmente ou são capazes de se ligarem reversivelmente a um ou mais agentes, por exemplo, um agente estimulatório e/ou um agente de seleção. Em algumas concretizações, a partícula oligomérica tem um raio, por exemplo, um rádio médio ou significativo, entre, ou cerca de 70 nm ou cerca de 125 nm, inclusive; um peso molecular entre, ou cerca de $1 \times 10^7 \text{ g/mol}$, ou cerca de $1 \times 10^9 \text{ g/mol}$, inclusive; e/ou entre, ou de cerca de 1,000 e, ou cerca de 5,000 de estreptavidina ou tetrâmeros de muteína de estreptavidina, inclusive. Em algumas con-

cretizações, o reagente de partícula oligomérica é ligado, por exemplo, reversivelmente ligado, a um ou mais agentes tal como um agente que se liga a um molécula, por exemplo, receptor, na superfície de uma célula. Em certas concretizações, um ou mais agentes são ou compreendem um anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo, tais como um Fab. Em algumas concretizações, um ou mais agentes especificamente se ligam a uma ou mais das seguintes macromoléculas em uma célula (por exemplo, uma célula T): CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-gammaR, TNF-alfaR, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-selectina), CD29/CD49d (VLA-4), ligante Notch (por exemplo, tipo Delta 1/4, Jagged 1/2, etc.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, e CXCR3 ou fragmento do mesmo incluindo os ligantes correspondentes àquelas macromoléculas ou fragmentos dos mesmos. Em algumas concretizações, um ou mais agentes especificamente se ligam a uma ou mais das seguintes macromoléculas em uma célula (por exemplo, uma célula T): CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, e/ou CD45RO. Em algumas concretizações, um ou mais agentes compreendem um anticorpo ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, tais como um Fab, e o anticorpo pode incluir um anticorpo policlonal, anticorpo monoclonal (incluindo anticorpos de tamanho natural que têm um região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpo com especificidade poliepitópica, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos, diacorpos, e moléculas de cadeia única, bem como fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab, F(ab')₂, e Fv). Em algumas concretizações, um ou mais reagentes são ou compreendem um fragmento de anticorpo (incluindo fragmento de li-

gação ao antígeno), por exemplo, um fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, ou (Fab')₂. Deve ser apreciado que regiões constantes de qualquer isotipo podem ser usadas para os anticorpos contemplados aqui, incluindo regiões constantes IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, e que tais regiões constantes podem ser obtidas de qualquer espécie animal ou humana (por exemplo, espécies murinas). Em algumas concretizações, um ou mais reagentes são ou compreendem um anticorpo que se liga a e/ou reconhece um ou mais componentes de um receptor de célula T. Em concretizações particulares, um ou mais reagentes são ou compreendem um anticorpo anti-CD3. Em certas concretizações, um ou mais reagentes são ou compreendem um anticorpo que se liga a e/ou reconhecem um co-receptor. Em algumas concretizações, um ou mais reagentes são ou compreendem um anticorpo anti-CD28. Em algumas concretizações, um ou mais reagentes são ou compreendem um anticorpo anti-CD3 e/ou um anti-CD28 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, tais como um anticorpo ou fragmento de antígeno do mesmo que contém um parceiro de ligação, por exemplo, um peptídeo de ligação a estreptavidina, por exemplo, Strep-tag® II. Em concretizações particulares, um ou mais agentes são ou compreendem um Fab anti-CD3 e/ou um anti-CD28 contendo um parceiro de ligação, por exemplo, um peptídeo de ligação a estreptavidina, por exemplo, Strep-tag® II.

[00308] Em algumas concretizações, é fornecido aqui um reagente de partícula oligomérica que é composto de e/ou contém uma pluralidade de tetrâmeros de estreptavidina ou muteína de estreptavidina. Em certas concretizações, o reagente de partícula oligomérica fornecido aqui contém uma pluralidade de sítios de ligação que se ligam reversivelmente ou são capazes de se ligar reversivelmente a um ou mais agentes, por exemplo, um agente estimulatório e/ou um agente de seleção. Em algumas concretizações, a partícula oligomérica tem

um raio, por exemplo, um raio médio, entre, ou cerca de 80 nm e, ou cerca de 120 nm, inclusive; um peso molecular, por exemplo, um peso molecular médio entre, ou cerca de $7,5 \times 10^6$ g / mol e, ou cerca de 2×10^8 g / mol, inclusive; e/ou uma quantidade, por exemplo, uma quantidade média, entre, ou cerca de 500 e, ou cerca de 10,000 de tetrâmeros de estreptavidina ou muteína de estreptavidina, inclusive. Em algumas concretizações, o reagente de partícula oligomérica é ligado, por exemplo, ligado reversivelmente, a um ou mais agentes, tal como um agente que se liga a uma molécula, por exemplo, receptor, na superfície de uma célula. Em algumas concretizações, o agente é um Fab anti-CD3 e/ou um anti-CD28, tal como um Fab que contém um parceiro de ligação, por exemplo, um peptídeo de ligação a estreptavidina, por exemplo, Strep-tag® II. Em concretizações particulares, um ou mais agentes é um Fab anti-CD3 e/ou um anti CD28 contendo um parceiro de ligação, por exemplo, um peptídeo de ligação a estreptavidina, por exemplo, Strep-tag® II.

[00309] Em algumas concretizações, as células são estimuladas na presença de, de cerca de, ou de pelo menos, ou cerca de 0,01 µg, 0,02 µg, 0,03 µg, 0,04 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,4 µg, 0,5 µg, 0,75 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, ou 10 µg do reagente estimulatório oligomérico por 10^6 células. Em algumas concretizações, as células são estimuladas na presença de, ou de cerca de 4 µg por 10^6 células. Em concretizações particulares, as células são estimuladas na presença de, ou de cerca de 0,8 µg por 10^6 células. Em certos aspectos, 4 µg do reagente estimulatório oligomérico é ou inclui, ou cerca de 3 µg de partículas oligoméricas e, ou cerca de 1 µg de agentes ligados, por exemplo, ou cerca de 0,5 µg de Fabs anti-CD3 e, ou cerca de 0,5 µg de Fabs anti-CD28.

2. Remoção do Reagente Estimulatório de Células

[00310] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é re-

movido ou separado das células ou populações de células antes da coleta, colheita, ou formulação das células. Em algumas concretizações, os reagentes estimulatórios são removidos ou separados das células ou populações de células após ou durante a incubação, por exemplo, uma incubação descrita aqui, tal como na Seção I-D. Em certas concretizações, as células ou população de células sofrem um processo, procedimento, etapa, ou técnica para remover o reagente estimulatório após a incubação, mas antes das etapas de coleta, colheita, ou formulação das células. Em concretizações particulares, as células ou população de células sofrem um processo, procedimento, etapa, ou técnica para remover o reagente estimulatório após a incubação. Em alguns aspectos, quando reagente estimulatório é separado ou removido das células durante a incubação, as células são retornadas para as mesmas condições de incubação como antes da separação ou remoção pela duração restante da incubação.

[00311] Em certas concretizações, o reagente estimulatório é removido e/ou separado das células. Em concretizações particulares, a ligação e/ou associação entre um reagente estimulatório e células pode, em algumas circunstâncias, ser reduzida durante a incubação. Em certas concretizações, um ou mais agentes podem ser adicionados para reduzir a ligação e/ou associação entre o reagente estimulatório e as células. Em concretizações particulares, uma alteração nas condições de cultura celular, por exemplo, a adição de um agente e/ou uma alteração na temperatura do meio e/ou pH, pode reduzir a ligação e/ou associação entre o reagente estimulatório e as células. Portanto, em algumas concretizações, o reagente estimulatório pode ser removido de uma incubação, sistema de cultura celular, e/ou uma solução separadamente das células, por exemplo, sem remover as células da incubação, sistema de cultura celular, e/ou uma solução.

[00312] Em certas concretizações, o reagente estimulatório é sepa-

rado e/ou removido das células após um período de tempo. Em concretizações particulares, o período de tempo é um período de tempo desde o início da estimulação. Em concretizações particulares, o início da incubação é considerado em ou acerca do momento em que as células são contatadas com o reagente estimulatório e/ou um meio ou solução contendo o reagente estimulatório. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido ou separado das células dentro de ou dentro de cerca de 120 horas, 108 horas, 96 horas, 84 horas, 72 horas, 60 horas, 48 horas, 36 horas, 24 horas, ou 12 horas, inclusive, do início da estimulação. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido ou separado das células em ou em cerca de 48 horas após a estimulação ser iniciada. Em certas concretizações, o reagente estimulatório é removido ou separado das células em ou em cerca de 72 horas após a estimulação ser iniciada. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é removido ou separado das células em ou em cerca de 96 horas após a estimulação ser iniciada.

[00313] Métodos para remover reagentes estimulatórios (por exemplo, reagentes estimulatórios que são ou contêm partículas, tais como partículas de conta ou partículas magnetizáveis) de células são conhecidos. Em certas concretizações, um reagente estimulatório de conta, por exemplo, uma conta paramagnética conjugada de anticorpo anti-CD3 / anti-CD28, é separado ou removido das células ou da população celular. Em algumas concretizações, o uso de anticorpo de competição, tal como anticorpos não marcados, podem ser usados, que, por exemplo, se ligam a um anticorpo primário do reagente estimulatório e alteram sua afinidade para seu antígeno na célula, desse modo permitindo separação delicada. Em alguns casos, após separação, os anticorpos de competição podem permanecer associados com a partícula (por exemplo, partícula de conta) enquanto o anticorpo não reagi-

do é ou pode ser lavado e a célula está livre de anticorpo de isolamento, seleção, enriquecimento e/ou ativação. Exemplar de tal reagente é DETACaBEAD (Friedl et al. 1995; Entschladen et al. 1997). Em algumas concretizações, partículas (por exemplo, partículas de conta) podem ser removidas na presença de um ligante clivável (por exemplo, ligante de DNA), através do qual os anticorpos ligados a partículas são conjugados com o ligante (por exemplo, CELLection, Dynal). Em alguns casos, a região ligante fornece um sítio clivável para remover as partículas (por exemplo, partículas de conta) das células após isolamento, por exemplo, pela adição de DNase ou outro tampão de liberação. Em algumas concretizações, outros métodos enzimáticos podem também ser empregados para liberar uma partícula (por exemplo, partícula de conta) de células. Em algumas concretizações, as partículas (por exemplo, partículas de conta ou partículas magnetizáveis) são biodegradáveis.

[00314] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é magnético, paramagnético, e/ou superparamagnético, e/ou contém uma conta que é magnética, paramagnética, e/ou superparamagnética, e o reagente estimulatório pode ser removido das células expondo as células a um campo magnético. Exemplos de equipamento adequado contendo ímãs para gerar o campo magnético inclui DynaMag CTS (Thermo Fisher), Magnetic Separator (Takara) e EasySep Magnet (Stem Cell Technologies).

[00315] Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido ou separado das células antes da conclusão dos métodos fornecidos, por exemplo, antes da colheita, coleta, e/ou formulação das células modificadas produzidas pelos métodos fornecidos aqui. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é removido e/ou separado das células após construção, por exemplo, transdução ou transfecção, das células. Em certas concretizações, o reagente esti-

mulatório é removido após o cultivo das células, por exemplo, antes do cultivo de células produzidas, por exemplo, transfectadas ou transduzidas, sob condições que promovam proliferação e/ou expansão. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido após as células atingirem um número, densidade, e/ou expansão limites durante o cultivo das células. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é removido antes da formulação das células, por exemplo, antes da formulação das células cultivadas, tais como células cultivadas que atingiram o número, concentração ou expansão limites.

[00316] Em algumas concretizações, o reagente de conta estimulatório, por exemplo, o reagente de conta magnética estimulatório, é removido ou separado das células ou populações de células antes de coleta, colheita, ou formulação das células. Em algumas concretizações, o reagente de conta estimulatório, por exemplo, o reagente de conta magnética estimulatório, é removido ou separado das células ou populações de células por exposição a um campo magnético durante ou após a incubação, por exemplo, uma incubação descrita aqui, tal como na Seção I-D. Em certas concretizações, as células ou população de células são expostas ao campo magnético para remover o reagente de conta estimulatório, por exemplo, o reagente de conta magnética estimulatório, após a incubação, mas não antes das etapas de coleta, colheita, ou formulação das células. Em concretizações particulares, as células ou população de células sofrem exposição ao campo magnético para remover o reagente de conta estimulatório, por exemplo, o reagente de conta magnética estimulatório, após a incubação. Em alguns aspectos, quando o reagente de conta estimulatório é separado ou removido das células ou população de células durante a incubação, as células ou população de células são retornadas para as mesmas condições de incubação como antes da exposição ao campo magnético pelo período restante da incubação.

[00317] Em concretizações particulares, o reagente de conta estimulatório, por exemplo, o reagente de conta magnética estimulatório, é removido ou separado das células, por exemplo, por exposição a um campo magnético, dentro ou dentro de cerca de 120 horas, 108 horas, 96 horas, 84 horas, 72 horas, 60 horas, 48 horas, 36 horas, 24 horas, ou 12 horas, inclusive, do início da estimulação. Em certas concretizações, o reagente de conta estimulatório, por exemplo, o reagente de conta magnética estimulatório, é removido ou separado das células, por exemplo, por exposição a um campo magnético, em ou em cerca de 72 horas após a estimulação ser iniciada. Em algumas concretizações, o reagente de conta estimulatório, por exemplo, o reagente de conta magnética estimulatório, é removido ou separado das células, por exemplo, por exposição a um campo magnético, em ou em cerca de 96 horas após a estimulação ser iniciada.

[00318] Em certas concretizações, o reagente estimulatório é separado e/ou removido das células após um período de tempo. Em concretizações particulares, o período de tempo é um período de tempo do começo e/ou início da incubação sob condições de estimulação. Em concretizações particulares, o início da incubação é considerado em ou a cerca do tempo em que as células são contatadas com o reagente estimulatório e/ou um meio ou solução contendo o reagente estimulatório. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido ou separado das células dentro de ou dentro de cerca de 28 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, e 9 dias após o início ou iniciação da incubação. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é removido ou separado das células dentro de ou dentro de cerca de 28 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, 9 dias após as células T CD4+ e células T CD8+ serem reunidas, combinadas, e/ou misturadas

na composição de entrada. Em certas concretizações, o reagente estimulatório é removido ou separado das células dentro de ou dentro de cerca de 28 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, 9 dias após as células T CD4+ e células T CD8+ serem obtidas, isoladas, enriquecidas, e/ou selecionadas de uma amostra biológica.

[00319] Em algumas concretizações, remoção de um agente estimulatório, tal como um reagente estimulatório oligomérico como descrito, incluindo adição à população de células T incubadas de uma substância, tal como um agente de competição, foi adicionada às células T para romper, tal como para diminuir e/ou terminar, a sinalização do agente ou agentes estimulatórios. Em algumas concretizações, a população das células T incubadas contém a presença de uma substância, tal como um agente de competição, por exemplo, biotina ou um análogo de biotina, por exemplo, D- Biotina. Em algumas concretizações, a substância, tal como um agente de competição, por exemplo, biotina ou um análogo de biotina, por exemplo, D-Biotina, está presente em uma quantidade que é pelo menos 1,5 vezes maior, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 100 vezes, pelo menos 1000 vezes ou mais que a quantidade da substância em uma população de referência ou preparação de células T cultivadas na qual a substância não foi adicionada exogenamente durante a incubação. Em algumas concretizações, a quantidade da substância, tal como um agente de competição, por exemplo, biotina ou um análogo de biotina, por exemplo, D-Biotina, na população de células T cultivadas é de, ou cerca de 10 μM , a, ou cerca de 100 μM , a, ou cerca de 100 μM , a, ou cerca de 1 mM , a, ou cerca de 100 μM , a, ou cerca de 500 μM , a, ou cerca de 10 μM , a, ou cerca de 100 μM . Em algumas concretizações, 10 μM ou cerca de 10 μM de biotina ou um análogo de biotina, por exemplo, D-

biotina, é adicionado às células ou à população de células para separar ou remover o reagente estimulatório oligomérico das células ou população celular.

[00320] Em certas concretizações, os referidos um ou mais agentes (por exemplo, agentes que estimulam ou ativam um TCR e/ou um co-receptor) associados com, tal como são reversivelmente ligados a, o reagente oligomérico, tal como por meio da pluralidade dos sítios de ligação particulares (por exemplo, sítios de ligação Z) presentes no reagente oligomérico. Em alguns casos, isto resulta nos agentes sendo bem dispostos um ao outro, de modo que um efeito de avidéz pode tomar lugar se uma célula alvo tendo (pelo menos duas cópias de) uma molécula de superfície celular que é ligada por ou reconhecida pelo agente sendo trazida em contato com o agente. Em alguns aspectos, o reagente de ligação ao receptor tem uma baixa afinidade pela molécula de receptor da célula no sítio de ligação B, de modo que o reagente de ligação ao receptor dissocia da célula na presença do reagente de competição. Assim, em algumas concretizações, os agentes são removidos das células na presença do reagente de competição.

[00321] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório oligomérico é um oligômero de muteína de estreptavidina com Fabs reversivelmente ligados anti-CD3 e anti-CD28. Em algumas concretizações, os Fabs são ligados, contém domínios de ligação a estreptavidina, por exemplo, que permitem ligação reversível ao oligômero de muteína de estreptavidina. Em alguns casos, Fabs anti-CD3 e anti-CD28 estão estreitamente dispostos um ao outro, de modo que um efeito de avidéz pode tomar lugar se uma célula T expressando CD3 e/ou CD28 é trazida em contato com o reagente estimulatório oligomérico com os Fabs reversivelmente ligados. Em alguns aspectos, os Fabs tem uma baixa afinidade para CD3 e CD28, de modo que os Fabs dissociam da célula na presença do reagente de competição, por exemplo, biotina

ou um variante de biotina ou análogo. Assim, em algumas concretizações, os Fabs são removidos ou dissociados das células na presença do reagente de competição, por exemplo, D-biotina.

[00322] Em algumas concretizações, o reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, é removido ou separado das células ou populações de células antes de coletar, colher, ou formular as células. Em algumas concretizações, reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, é removido ou separado das células ou populações de células por contato ou exposição a um reagente de competição, por exemplo, biotina ou um análogo de biotina, tal como D-biotina, após ou durante a incubação, por exemplo, uma incubação descrita aqui, tal como na Seção I-D. Em certas concretizações, as células or população de células são contatadas ou expostas a um reagente de competição, por exemplo, biotina ou um análogo de biotina, tal como D-biotina, para remover reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, após a incubação, mas antes das etapas de coleta, colheita, ou formulação das células. Em concretizações particulares, as células ou população de células são contatadas ou expostas a um reagente de competição, por exemplo, biotina ou um análogo de biotina, tal como D-biotina, para remover o reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, após a incubação. Em alguns aspectos, quando o reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, é separado ou removido das células durante a incubação, por exemplo, por contato ou exposição a um reagente de competição, por exemplo, biotina ou um análogo de biotina tal como D-biotina, as células são retornadas para as mesmas condições de incu-

bação, como antes da separação ou remoção pela duração restante da incubação.

[00323] Em algumas concretizações, as células são contatadas com, com cerca de, ou com pelo menos, ou cerca de 0,01 μM , 0,05 μM , 0, 1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 10 μM , 100 μM , 500 μM , 0,01 μM , 1 mM, ou 10 mM do reagente de competição para remover ou separar o reagente estimulatório oligomérico das células. Em várias concretizações, as células são contatadas com, com cerca de, ou com pelo menos, ou cerca de 0,01 μM , 0,05 μM , 0, 1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 10 μM , 100 μM , 500 μM , 0,01 μM , 1 mM, ou 10 mM de biotina ou um análogo de biotina, tal como D-biotina, para remover ou separar os oligômeros de muteína de estreptavidina estimulatórios com Fabs reversivelmente ligados anti-CD3 e anti-CD28 das células.

[00324] Em concretizações particulares, o reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, é removido ou separado das células dentro ou dentro de cerca de 120 horas, 108 horas, 96 horas, 84 horas, 72 horas, 60 horas, 48 horas, 36 horas, 24 horas, ou 12 horas, inclusive, do início da estimulação. Em concretizações particulares, o reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, é removido ou separado das células em ou em cerca de 48 horas após a estimulação ser iniciada. Em certas concretizações, o reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório, é removido ou separado das células em ou em cerca de 72 horas após a estimulação ser iniciada. Em algumas concretizações, o reagente oligomérico estimulatório, por exemplo, o reagente de muteína de estreptavidina oligomérico estimulatório é removido ou separado das células em ou em cerca de 96 horas após a estimulação ser iniciada.

C. Modificação de Células

[00325] Em algumas concretizações, as etapas de processamento incluem submeter células, por exemplo, células estimuladas, a modificação, tal como sob condições para introdução de uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína recombinante em uma ou mais células. Exemplares de tais proteínas recombinantes são receptores recombinantes, tais como qualquer um descrito na Seção II. Métodos para fabricar células, tal como por introdução das moléculas de ácido nucleico codificando a proteína recombinante, tal como receptor recombinante, em células podem ser realizados usando qualquer de um número de métodos conhecidos, tais como usando vetores ou outros agentes que contêm um polinucleotídeo que codifica a proteína recombinante. Tais vetores incluem sistemas virais e não virais, incluindo sistemas lentivirais e gammaretrovirais, bem como sistemas com base em transposon, tais como sistema de transferência de gene com base em *Piggybac* ou *Sleeping Beauty*. Métodos exemplares incluem aqueles para transferência de ácidos nucleicos codificando os receptores, incluindo por meio viral, por exemplo, retroviral ou lentiviral, transdução, transposons, e electroporação.

[00326] Em certas concretizações, células e/ou composições de células T enriquecidas são submetidas à modificação, por exemplo, por um processo que envolve transdução ou transfecção de células, antes do cultivo das células. Em alguns casos, o cultivo é realizado sob condições que promovem proliferação e/ou expansão, tal como por um método fornecido aqui, por exemplo, na Seção I-D. Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação após as células terem sido estimuladas, ativadas, e/ou incubadas sob condições de estimulação, tais como por qualquer um dos métodos fornecidos aqui, por exemplo, na Seção I-B. Em concretizações particulares, as células são células estimuladas e/ou a composição de células é

uma composição de células estimuladas, tais como por incubação prévia sob condições de estimulação, por exemplo, como descrito na Seção I-B. Em concretizações particulares, uma ou mais composições foram previamente congeladas e armazenadas, e foram descongeladas antes da modificação.

[00327] Em algumas concretizações, um conjunto e/ou número fixo de células, por exemplo, células estimuladas, são submetidas à modificação, tal como contactando tais células com um agente (por exemplo, vetor lentiviral) contendo um polinucleotídeo codificando uma proteína recombinante (por exemplo, CAR) para fabricar, por exemplo, tal como por transdução ou transfecção. Em concretizações particulares, entre, ou de cerca de 1×10^5 , ou cerca de $50,000 \times 10^6$ células, entre, ou de cerca de 1×10^6 , ou cerca de $50,000 \times 10^6$ células, entre, ou de cerca de 10×10^6 , ou cerca de $5,000 \times 10^6$ células, entre, ou de cerca de 1×10^6 , ou cerca de $1,000 \times 10^6$ células, entre, ou de cerca de 50×10^6 , ou cerca de $5,000 \times 10^6$ células, entre, ou de cerca de 10×10^6 , ou cerca de $1,000 \times 10^6$ células, entre, ou de cerca de 50×10^6 , ou cerca de 500×10^6 células, por exemplo, células estimuladas células, são submetidas à modificação, por exemplo, tal como por transdução ou transfecção. Em concretizações particulares, pelo menos, ou em cerca de 50×10^6 células, 100×10^6 células, 150×10^6 células, 200×10^6 células, ou 250×10^6 células são submetidas à modificação. Em concretizações particulares, pelo menos cerca de 100×10^6 células são submetidas à modificação. Em concretizações particulares, até 200×10^6 células são submetidas à modificação. Em concretizações particulares, entre cerca de 100×10^6 e cerca de 200×10^6 células são submetidas à modificação são submetidas à modificação. Em algumas concretizações, as células são células estimuladas. Em concretizações particulares, as células são células viáveis. Em certas concretizações, as células são negativas para um marcador de apoptose, por exemplo, Anne-

xin V ou caspase ativa 3. Em certas concretizações, as células são células viáveis que foram estimuladas, tal como por uma incubação sob condições de estimulação.

[00328] Em algumas concretizações, o número de células (por exemplo, células estimuladas) a ser submetido a modificação, tal como contactando tais células com um agente (por exemplo, vetor lentiviral) contendo um polinucleotídeo codificando uma proteína recombinante (por exemplo, CAR), por exemplo, tal como por transdução ou transfecção, é o número total de células após a ativação ou estimulação, e até um máximo de 200×10^6 células totais. Em algumas concretizações, para composições de entrada que são originadas de diferentes doadores, diferentes números de células após a ativação ou estimulação podem ser submetidos a modificação, por exemplo, transdução ou transfecção. Em algumas concretizações, em casos onde o número total de células após a ativação ou estimulação é ou excede 200×10^6 , um máximo de até 200×10^6 células são submetidas à modificação, enquanto em casos onde o número total de células após ativação ou estimulação é abaixo de 200×10^6 , todas as células pós-ativação ou pós-estimulação são submetidas à modificação. Em algumas concretizações, as células são células estimuladas. Em concretizações particulares, as células são células viáveis. Em certas concretizações, as células são negativas para um marcador de apoptose, por exemplo, Annexin V ou caspase ativa 3. Em certas concretizações, as células são células viáveis que foram estimuladas, tal como por uma incubação sob condições de estimulação.

[00329] Em algumas concretizações, transferência de gene é realizada pela primeira estimulação da célula, tal como combinando ela com um estímulo que induz uma resposta, tal como proliferação, sobrevivência, e/ou ativação, por exemplo, como medido pela expressão

de uma citocina ou marcador de ativação, seguido por transdução das células ativadas, e expansão em culturas para números suficientes para aplicações clínicas. Em certas concretizações, a transferência de gene é realizada pela primeira incubação das células sob condições de estimulação, tal como por qualquer um dos métodos descritos aqui, por exemplo, na Seção I-B.

[00330] Em certas concretizações, métodos para modificação genéticas são realizados contatando uma ou mais células de uma composição com uma molécula de ácido nucleico codificando a proteína recombinante, por exemplo, receptor recombinante. Em algumas concretizações, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para células usando partículas de vírus infecciosas recombinantes, tais como, por exemplo, vetores derivados de vírus símio 40 (SV40), adenovírus, vírus adeno associado (AAV). Em algumas concretizações, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para células T usando vetores lentivirais recombinantes ou vetores retrovirais, tais como vetores gama-retrovirais (ver, por exemplo, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Abr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 Novembro 29(11): 550–557.

[00331] Em algumas concretizações, o vetor retroviral tem uma longa sequência de repetição terminal (LTR), por exemplo, um vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina Moloney (MoMLV), sarcoma vírus mieloproliferativo (MPSV), vírus de células-tronco embrionárias murinas (MESV), vírus de células-tronco murinas (MSCV), vírus formador de foco no baço (SFFV), ou vírus adeno associado (AAV). A maioria dos vetores retrovirais são derivados de retrovírus murinos. Em algumas concretizações, os retrovírus incluem aqueles derivados de qualquer fonte de células de aves ou mamíferos. Os retrovírus são tipicamente anfotrópicos, o que significa que eles são capazes de in-

fectar células hospedeiras de várias espécies, incluindo humanos. Em uma concretização, o gene a ser expresso substitui as sequências retroviral gag, pol e/ou env. Vários sistemas retrovirais ilustrativos foram descritos (por exemplo, Patente Norte-americana Nos. 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller e Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; e Boris-Lawrie e Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

[00332] Métodos de transdução lentiviral são conhecidos. Métodos exemplares são descritos em, por exemplo, Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; e Cavaliari et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505.

[00333] Em algumas concretizações, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por eletroporação (ver, por exemplo, Chicaybam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 e Van Teldeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). Em algumas concretizações, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por transposição (ver, por exemplo, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; e Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Outros métodos de introdução e expressão de material genético em células imunes incluem a transfecção de fosfato de cálcio (por exemplo, como descrito em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), fusão de protoplastos, transfecção mediada por lipossomas catiônicos; bombardeio de micropartículas facilitado por partículas de tungstênio (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); co-precipitação de DNA de fosfato de estrôncio (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

[00334] Outras abordagens e vetores para transferência dos ácidos nucleicos que codificam os produtos recombinantes são os descritos, por exemplo, em Pedido de Patente internacional, Publicação No.: WO2014055668, e Patente Norte-americana No. 7,446,190.

[00335] Em algumas concretizações, a modificação, por exemplo, transdução ou transfecção, é realizada em meio livre de soro. Em algumas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura de células definido e/ou bem definido. Em certas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura controlado que foi processado, por exemplo, filtrado para remover os inibidores e/ou fatores de crescimento. Em algumas concretizações, o meio livre de soro contém proteínas. Em certas concretizações, o meio livre de soro pode conter albumina sérica, hidrolisados, fatores de crescimento, hormônios, proteínas transportadoras e/ou fatores de ligação.

[00336] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células estimuladas, são submetidas à modificação, por exemplo, transduzidas ou transfectadas, na presença de um adjuvante de transdução. Exemplos de adjuvantes de transdução incluem, mas não estão limitados a, policátions, fragmentos ou variantes derivados de fibronectina ou fibronectina, e RetroNectin. Em certas concretizações, as células são submetidas à modificação na presença de policátions, fibronectina ou fragmentos derivados de fibronectina ou Em certas concretizações, as células são submetidas à modificação na presença de variantes, e/ou RetroNectin. Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação na presença de um policátion que é polibreno, DEAE-dextrano, sulfato de protamina, poli-L-lisina, ou um lipossoma catiônico. Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação na presença de sulfato de protamina.

[00337] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células estimuladas, são submetidas à modificação, por exemplo, transdu-

zidas ou transfectadas, na ausência de um adjuvante de transdução. Assim, em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação na ausência de polications, fibronectina ou fragmentos derivados de fibronectina ou variantes, e RetroNectin. Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação na ausência de um polication que é polibreno, DEAE-dextrano, sulfato de protamina, poli-L-lisina, ou um lipossoma catiônico. Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação na ausência de sulfato de protamina.

[00338] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células T, podem ser transduzidas durante ou após a ativação, estimulação e/ou expansão, por exemplo, com um receptor de célula T (TCR) ou um receptor de antígeno quimérico (CAR). Esta transdução para a introdução do gene do receptor desejado pode ser realizada com qualquer vetor retroviral adequado, por exemplo. A população de células geneticamente modificada pode então ser liberada do estímulo inicial (o estímulo de CD3/CD28, por exemplo) e subsequentemente ser estimulada com um segundo tipo de estímulo, por exemplo, por meio de um novo receptor introduzido). Esse segundo tipo de estímulo pode incluir um estímulo antigênico na forma de uma molécula peptídeo / MHC, o ligante cognato (reticulação) do receptor geneticamente introduzido (por exemplo, ligante natural de um CAR) ou qualquer ligante (tal como um anticorpo) que se liga diretamente dentro da estrutura do novo receptor (por exemplo, reconhecendo regiões constantes dentro do receptor). Ver, por exemplo, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 ou Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)*.

[00339] Em alguns aspectos, as células também são submetidas à modificação para promover a expressão de citocinas ou outros fatores.

Entre ácidos nucleicos adicionais, por exemplo, genes para introdução são aqueles que melhoram a eficácia da terapia, tal como promovendo a viabilidade e/ou função das células transferidas; genes para fornecer um marcador genético para seleção e/ou avaliação das células, tal como para avaliar a sobrevivência ou localização *in vivo*; genes para melhorar a segurança, por exemplo, tornando a célula suscetível à seleção negativa *in vivo*, como descrito por Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); e Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); ver também as publicações de PCT/US91/08442 e PCT/US94/05601 por Lupton et al. descrevendo o uso de genes de fusão selecionáveis bifuncionais derivados da fusão de um marcador selecionável positivo dominante com um marcador selecionável negativo. Ver, por exemplo, Riddell et al., Patente Norte-americana No. 6,040,177, nas colunas 14 a 17.

[00340] Em algumas concretizações, a introdução é realizada contactando uma ou mais células de uma composição com uma molécula de ácido nucleico codificando a proteína recombinante, por exemplo, receptor recombinante. Em algumas concretizações, o contato pode ser efetuado com centrifugação, tal como espinoculação (por exemplo, inoculação centrífuga). Tais métodos incluem aqueles descritos na Publicação Internacional número WO2016/073602. Câmaras centrífugas exemplares incluem as produzidas e vendidas pela Biosafe SA, incluindo aquelas para uso com o sistema Sepax® e Sepax® 2, incluindo câmaras centrífugas A-200/F e A-200 e vários kits para uso com esses sistemas. Câmaras, sistemas e instrumentação de processamento e gabinetes exemplares são descritos, por exemplo, em Patente Norte-americana No. 6,123,655, Patente Norte-americana No. 6,733,433 e Pedido de Patente Norte-americana publicado, Publicação No.: US 2008/0171951, e pedido de patente internacional publicado, publicação no. WO 00/38762, o conteúdo de cada um dos quais é in-

corporado aqui por referência na sua íntegra. Kits exemplares para uso com tais sistemas incluem, mas não são limitados, kits de uso único vendidos pela BioSafe SA sob os nomes de produtos CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 ou CS-900.2.

[00341] Em algumas concretizações, o sistema é incluído com e/ou colocado em associação com outra instrumentação, incluindo instrumentação para operar, automatizar, controlar e/ou monitorar aspectos da etapa de transdução e uma ou mais várias outras etapas de processamento executadas no sistema, por exemplo, uma ou mais etapas de processamento que podem ser realizadas com ou em conexão com o sistema de câmara centrífuga como descrito aqui ou em Publicação Internacional Número WO2016/073602. Esta instrumentação em algumas concretizações está contida em um gabinete. Em algumas concretizações, a instrumentação inclui um gabinete, que inclui um circuito de controle contendo caixa, uma centrífuga, uma tampa, motores, bombas, sensores, displays e uma interface de usuário. Um dispositivo exemplar é descrito na patente Norte-americana No. 6,123,655, Patente Norte-americana No. 6,733,433 e Norte-americana 2008/0171951.

[00342] Em algumas concretizações, o sistema compreende uma série de recipientes, por exemplo, bolsas, tubulações, torneiras, braçadeiras, conectores e uma câmara de centrífuga. Em algumas concretizações, os recipientes, tal como bolsas, incluem um ou mais recipientes, tal como bolsas, contendo as células a serem transduzidas e as partículas do vetor viral, no mesmo recipiente ou em recipientes separados, tal como o mesmo saco ou bolsas separados. Em algumas concretizações, o sistema inclui ainda um ou mais recipientes, tal como bolsas, contendo meio, tal como diluente e/ou solução de lavagem, que é puxado para dentro da câmara e/ou outros componentes para diluir, ressuspender e/ou lavar componentes e/ou composições durante os métodos. Os recipientes podem ser conectados em uma ou mais

posições no sistema, tal como numa posição correspondente a uma linha de entrada, linha de diluente, linha de lavagem, linha de resíduos e/ou linha de saída.

[00343] Em algumas concretizações, a câmara está associada a uma centrífuga, capaz de efetuar a rotação da câmara, tal como em torno do seu eixo de rotação. A rotação pode ocorrer antes, durante e/ou após a incubação em conexão com a transdução das células e/ou em uma ou mais das outras etapas de processamento. Portanto, em algumas concretizações, uma ou mais das várias etapas de processamento são realizadas em rotação, por exemplo, em uma força particular. A câmara é tipicamente capaz de rotação vertical ou geralmente vertical, de modo que a câmara fica na vertical durante a centrifugação e a parede lateral e o eixo são verticais ou geralmente verticais, com a(s) parede(s) de extremidade horizontal ou geralmente horizontal.

[00344] Em algumas concretizações, a composição contendo células e composição contendo partículas de vetor viral, e opcionalmente ar, podem ser combinadas ou misturada antes de fornecer as composições para a cavidade. Em algumas concretizações, a composição contendo células e composição contendo partículas de vetor viral, e opcionalmente ar, são fornecidas separadamente e combinadas e misturadas na cavidade. Em algumas concretizações, uma composição contendo células, uma composição contendo partículas de vetor viral, e opcionalmente ar, pode ser fornecida à cavidade interna em qualquer ordem. Em qualquer uma de algumas concretizações, uma composição contendo células e partículas de vetor viral é uma composição de entrada uma vez combinadas ou misturadas, seja ele combinada ou misturada dentro ou fora da câmara centrífuga e/ou se as células e partículas de vetor viral são fornecidas para a câmara centrífuga juntas ou separadamente, tal como simultaneamente ou sequencialmente.

[00345] Em algumas concretizações, ingestão do volume de gás, tal

como ar, ocorre antes da incubação das células e partículas de vetor viral, tal como rotação, no método de transdução. Em algumas concretizações, ingestão do volume de gás, tal como ar, ocorre durante a incubação das células e partículas de vetor viral, tal como rotação, no método de transdução.

[00346] Em algumas concretizações, o volume líquido das células ou partículas de vetor viral que compõem a composição de transdução, e opcionalmente o volume de ar, pode ser um volume predeterminado. O volume pode ser um volume programado em e/ou controlado por circuitos associados ao sistema.

[00347] Em algumas concretizações, ingestão da composição de transdução, e opcionalmente gás, tal como ar, é controlado manualmente, semi-automaticamente e/ou automaticamente até que um volume desejado ou predeterminado seja levado para a cavidade interna da câmara. Em algumas concretizações, um sensor associado ao sistema pode detectar líquido e/ou gás fluindo de e para a câmara de centrifuga, tal como por meio de sua cor, taxa de vazão e/ou densidade, e pode se comunicar com os circuitos associados para interromper ou continuar a ingestão conforme necessário até que a ingestão do volume desejado ou predeterminado seja alcançada. Em alguns aspectos, um sensor programado ou capaz apenas de detectar líquido no sistema, mas não gás (por exemplo, ar), pode ser capaz de permitir a passagem de gás, tal como ar, no sistema sem interromper a ingestão. Em algumas tais concretizações, um pedaço não transparente de tubulação pode ser colocado na linha próxima ao sensor enquanto a entrada de gás, tal como ar, é desejada. Em algumas concretizações, ingestão de gás, tal como ar, pode ser controlada manualmente.

[00348] Em aspectos dos métodos fornecidos, a cavidade interna da câmara de centrifugação é submetida a rotação de alta velocidade. Em algumas concretizações, a rotação é efetuada antes, simultanea-

mente, subsequentemente ou intermitentemente com a ingestão da composição líquida de entrada, e opcionalmente ar. Em algumas concretizações, a rotação é efetuada após a ingestão da composição líquida de entrada, e opcionalmente ar. Em algumas concretizações, rotação é por centrifugação da câmara centrífuga em uma força centrífuga relativa na superfície interna da parede lateral da cavidade interna / ou em uma camada de superfície das células de, ou cerca de ou pelo menos, ou cerca de 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3500 g ou 4000 g. Em algumas concretizações, rotação é por centrifugação a uma força que é maior que ou cerca de 1100 g, tal como maior que ou cerca de 1200 g, mais que ou cerca de 1400 g, mais que ou cerca de 1600 g, mais que ou cerca de 1800 g, mais que ou cerca de 2000 g, mais que ou cerca de 2400 g, mais que ou cerca de 2800 g, mais que ou cerca de 3000 g ou mais que ou cerca de 3200 g. Em algumas concretizações, rotação é por centrifugação a uma força que é de, ou é de cerca de 1600 g.

[00349] Em algumas concretizações, o método de transdução inclui rotação ou centrifugação da composição de transdução, e opcionalmente ar, na câmara centrífuga durante mais que ou cerca de 5 minutos, tal como mais que ou cerca de 10 minutos, mais que ou cerca de 15 minutos, mais que ou cerca de 20 minutos, mais que ou cerca de 30 minutos, mais que ou cerca de 45 minutos, mais que ou cerca de 60 minutos, mais que ou cerca de 90 minutos ou mais que ou cerca de 120 minutos. Em algumas concretizações, a composição de transdução, e opcionalmente ar, é rotacionado ou centrifugado na câmara centrífuga durante mais que 5 minutos, mas durante não mais que 60 minutos, não mais que 45 minutos, não mais que 30 minutos ou não mais do que 15 minutos. Em concretizações particulares, a transdução inclui rotação ou centrifugação durante ou durante cerca de 60 minutos.

[00350] Em algumas concretizações, o método de transdução inclui rotação ou centrifugação da composição de transdução, e opcionalmente ar, na câmara centrífuga durante entre, ou de cerca de 10 minutos, ou cerca de 60 minutos, ou cerca de 15 minutos e, ou cerca de 60 minutos, ou cerca de 15 minutos e, ou cerca de 45 minutos, ou cerca de 30 minutos e, ou cerca de 60 minutos ou, ou cerca de 45 minutos e, ou cerca de 60 minutos, cada um inclusive, e em uma força na superfície interna da parede lateral da cavidade interna e/ou em uma camada de superfície das células de pelo menos ou mais que a, ou cerca de 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g or 3600 g. Em concretizações particulares, o método de transdução inclui rotação ou centrifugação da composição de transdução, por exemplo, as células e as partículas de vetor viral, em ou em cerca de 1600 g durante ou durante cerca de 60 minutos.

[00351] Em algumas concretizações, o gás, tal como ar, na cavidade da câmara é expulso da câmara. Em algumas concretizações, o gás, tal como ar, é expulso para um recipiente que está operacionalmente ligado como parte do sistema fechado à câmara centrífuga. Em algumas concretizações, o recipiente é um recipiente vazio ou livre. Em algumas concretizações, o ar, tal como gás, na cavidade da câmara é expelido através de um filtro que está operacionalmente conectado à cavidade interna da câmara através de uma linha de tubulação estéril. Em algumas concretizações, o ar é expelido usando manual, processos semi-automáticos ou automáticos. Em algumas concretizações, o ar é expelido da câmara antes de, simultaneamente, intermitentemente ou subsequentemente com expressão da composição de saída contendo células incubadas e partículas de vetor viral, tal como células nas quais transdução foi iniciada ou células foram transduzidas com um vetor viral, da cavidade da câmara.

[00352] Em algumas concretizações, a transdução e/ou outra incu-

bação é realizada como ou como parte de um processo contínuo ou semicontínuo. Em algumas concretizações, um processo contínuo envolve a ingestão contínua de células e partículas de vetor viral, por exemplo, a composição de transdução (como uma única composição pré-existente ou puxando continuamente para o mesmo vaso, por exemplo, cavidade, e desse modo misturando, sua parte), e/ou a expressão ou expulsão contínua de líquido, e opcionalmente expelimento de gás (por exemplo, ar), do vaso, durante pelo menos uma porção da incubação, por exemplo, durante centrifugação. Em algumas concretizações, a ingestão contínua e expressão contínua são realizadas pelo menos em parte simultaneamente. Em algumas concretizações, a ingestão contínua ocorre durante parte da incubação, por exemplo, durante parte da centrifugação e a expressão contínua ocorre durante uma parte separada da incubação. As duas podem alternar. Portanto, a ingestão e expressão contínuas, durante a realização da incubação, podem permitir que um maior volume total de amostra seja processado, por exemplo, transduzida.

[00353] Em algumas concretizações, a incubação faz parte de um processo contínuo, o método incluindo, durante pelo menos uma porção da incubação, efetuar a entrada contínua da referida composição de transdução na cavidade durante a rotação da câmara e durante uma porção da incubação, efetuando a expressão contínua de líquido e, opcionalmente expelimento de gás (por exemplo, ar), da cavidade através pelo menos da abertura durante a rotação da câmara.

[00354] Em algumas concretizações, a incubação semicontínua é realizada alternando entre efetuar a ingestão da composição na cavidade, incubação, expressão de líquido da cavidade e, opcionalmente expelimento de gás (por exemplo, ar) da cavidade, tal como a um recipiente de saída, e, em seguida, a ingestão de uma composição subsequente (por exemplo, segunda, terceira, etc.) contendo mais células e

outros reagentes para processamento, por exemplo, partículas de vetor viral, e repetição do processo. Por exemplo, em algumas concretizações, a incubação faz parte de um processo semicontínuo, o método incluindo, antes da incubação, efetuando a ingestão da composição de transdução na cavidade através da referida abertura pelo menos e subsequente à incubação, efetuando a expressão do fluido da cavidade; efetuando ingestão de outra composição de transdução compreendendo células e as partículas de vetor viral na referida cavidade interna; e incubando a outra composição de transdução na referida cavidade interna sob condições em que as referidas células na referida outra composição de transdução são transduzidas com o referido vetor. O processo pode ser continuado de maneira iterativa por várias rodadas adicionais. Neste respeito, os métodos semicontínuos ou contínuos podem permitir a produção de um volume ainda maior e/ou número de células.

[00355] Em algumas concretizações, uma porção da incubação por transdução é realizada na câmara centrífuga, que é realizada sob condições que incluem rotação ou centrifugação.

[00356] Em algumas concretizações, o método inclui uma incubação em que uma porção adicional da incubação das células e partículas de vetor viral é realizada sem rotação ou centrifugação, que geralmente é realizado subsequente à pelo menos porção da incubação que inclui rotação ou centrifugação da câmara. Em algumas tais concretizações, a incubação adicional é efetuada sob condições resultar na integração do vetor viral em um genoma hospedeiro de uma ou mais das células. Está dentro do nível de um técnico versado avaliar ou determinar se a incubação resultou em integração de partículas de vetor viral em um genoma hospedeiro, e, portanto, determinar empiricamente as condições para uma incubação adicional. Em algumas concretizações, a integração de um vetor viral em um genoma hospe-

deiro pode ser avaliada medindo o nível de expressão de uma proteína recombinante, tal como uma proteína heteróloga, codificada por um ácido nucleico contido no genoma da partícula do vetor viral após a incubação. Vários métodos bem conhecidos para avaliar nível de expressão de moléculas recombinantes podem ser usados, tal como detecção por métodos baseados em afinidade, por exemplo, métodos baseados em imunoafinidade, por exemplo, no contexto de proteínas da superfície celular, tal como por citometria de fluxo. Em alguns exemplos, a expressão é medida pela detecção de um marcador de transdução e/ou construtor repórter. Em algumas concretizações, o ácido nucleico que codifica uma proteína de superfície truncada é incluído no vetor e usado como marcador de expressão e/ou aprimoramento do mesmo.

[00357] Em algumas concretizações, a composição contendo células e partículas virais podem ser rotacionadas, geralmente em força ou velocidade relativamente baixa, tal como velocidade inferior à utilizada para granular as células, tal como de ou de cerca de 600 rpm a ou a cerca de 1700 rpm (por exemplo a, ou cerca de ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm, ou 1500 rpm ou 1700 rpm). Em algumas concretizações, a rotação é realizada em uma força, por exemplo, uma força centrífuga relativa, de ou de cerca de 100 g a 3200 g (por exemplo a, ou cerca de ou pelo menos, ou cerca de 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g ou 3200 g), como medido, por exemplo, em uma parede interna ou externa da câmara ou cavidade. O termo "força centrífuga relativa" ou RCF geralmente é entendido como a força efetiva transmitida a um objeto ou substância (tal como uma célula, amostra ou pastilha e/ou um ponto na câmara ou outro recipiente sendo girado), relativa à força gravitacional da Terra, em um determinado ponto no espaço em comparação com o eixo de rotação. O valor pode ser determinado usando fórmulas bem conheci-

das, levando em consideração a força gravitacional, a velocidade de rotação e o raio de rotação (distância do eixo de rotação e o objeto, substância ou partícula na qual a RCF está sendo medida).

[00358] Em certas concretizações, a composição contendo células e partículas virais é rotacionada durante mais que ou cerca de 5 minutos, tal como mais que ou cerca de 10 minutos, mais que ou cerca de 15 minutos, mais que ou cerca de 20 minutos, mais que ou cerca de 30 minutos, mais que ou cerca de 45 minutos, mais que ou cerca de 60 minutos, mais que ou cerca de 90 minutos ou mais que ou cerca de 120 minutos; ou entre ou entre cerca de 5 minutos e 120 minutos, 30 minutos e 90 minutos, 15 minutos e 60 minutos, 15 minutos e 45 minutos, 30 minutos e 60 minutos ou 45 minutos e 60 minutos, cada um inclusive. Em algumas concretizações, a composição é rotacionada durante ou durante cerca de 60 minutos.

[00359] Em certas concretizações, células, por exemplo, células estimuladas, são cultivadas durante a modificação, por exemplo, transdução ou transfecção, em uma densidade de menos do que a, ou cerca de 1×10^7 células / mL, 9×10^6 células / mL, 8×10^6 células / mL, 7×10^6 células / mL, 6×10^6 células / mL, 5×10^6 células / mL, 4×10^6 células / mL, ou 3×10^6 células / mL. Em algumas concretizações, as células são submetidas à modificação em uma densidade entre, ou cerca de 1×10^3 células / mL e, ou cerca de 1×10^9 células/mL, ou cerca de 1×10^4 células / mL e, ou cerca de 1×10^8 células/mL, ou cerca de 1×10^5 células / mL e, ou cerca de 1×10^7 células / mL, ou cerca de 5×10^5 células / mL e, ou cerca de 1×10^7 células / mL. Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação em uma densidade de, ou de cerca de, 5×10^5 células / mL, 1×10^6 células / mL, 2×10^6 células / mL, 3×10^6 células / mL, 4×10^6 células / mL, ou 5×10^6 células / mL. Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação em uma densidade de, ou de cerca de,

1 x 10⁶ células / mL. Em certas concretizações, as células são cultivadas após a rotação, por exemplo, rotação da composição contendo as células e as partículas virais. Em certas concretizações, as células foram rotacionadas dentro das partículas virais.

[00360] Em algumas concretizações, modificação das células inclui cultivo, contato, ou incubação com o vetor, por exemplo, o vetor viral do vetor não viral. Em certas concretizações, cultivo, contato, e/ou incubação das células com o vetor é realizado durante, durante cerca de, ou durante pelo menos 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 72 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, ou 7 dias, ou mais do que 7 dias. Em algumas concretizações, cultivo, contato, e/ou incubação das células com o vetor é realizado durante um período de tempo entre 30 minutos e 2 horas, entre 1 hora e 8 horas, entre 6 horas e 12 horas, entre 12 horas e 18 horas, entre 16 horas e 24 horas, entre 18 horas e 30 horas, entre 24 horas e 48 horas, entre 24 horas e 72 horas, entre 42 horas e 54 horas, entre 60 horas e 120 horas entre 96 horas e 120 horas, entre 90 horas e entre 1 dias e 7 dias, entre 3 dias e 8 dias, entre 1 dia e 3 dias, entre 4 dias e 6 dias, ou entre 4 dias e 5 dias antes da modificação genética. Em algumas concretizações, as células são cultivadas, contatadas, e/ou incubadas com o vetor durante ou durante cerca de entre 18 horas e 30 horas. Em concretizações particulares, as células são cultivadas, contatadas, e/ou incubadas com o vetor durante, ou durante cerca de, 24 horas.

[00361] Em algumas concretizações, durante pelo menos uma parte da modificação genética, por exemplo, transdução, e/ou subsequente à modificação genética das células é transferida para o conjunto de bolsas de biorreator para cultura das células geneticamente modificadas, tal como para cultivo ou expansão das células, como descrito acima.

[00362] Em concretizações particulares, as células são submetidas à modificação na presença de uma ou mais citocinas. Em certas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes humanas. Em certas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas se ligam a e/ou são capazes de ligação a receptores que são expressos por e/ou são endógenos a células T. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem um membro membro da família de feixes 4-alpha-helix de citocinas. Em algumas concretizações, membros da família de feixes 4-alfa-helix de citocinas incluem, mas não são limitados a, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF), e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-15. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-7. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-2 recombinante.

[00363] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células estimuladas, são submetidas à modificação, por exemplo, transduzidas ou transfectadas, na presença de uma ou mais citocinas, por exemplo, uma citocina humana recombinante, em uma concentração entre, ou de cerca de 1 IU / mL e, ou cerca de 1.000 IU / mL, entre, ou de cerca de 10 IU / mL e, ou cerca de 50 IU / mL, entre, ou de cerca de 50 IU / mL, ou cerca de 100 IU / mL, entre, ou de cerca de 100 IU / mL e, ou cerca de 200 IU / mL, entre, ou de cerca de 100 IU / mL e, ou cerca de 500 IU / mL, entre, ou de cerca de 250 IU / mL e, ou cerca de 500 IU / mL, ou entre, ou de cerca de 500 IU / mL e, ou cerca de 1.000 IU / mL.

[00364] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células estimuladas, são submetidas à modificação, por exemplo, transfectadas ou transduzidas, na presença de IL-2, por exemplo, IL-2 recombinante humana, na concentração entre, ou de cerca de 1 IU / mL e a, ou cerca de 500 IU / mL, entre, ou de cerca de 10 IU / mL e a, ou cerca de 250 IU / mL, entre, ou de cerca de 50 IU / mL e a, ou cerca de 200 IU / mL, entre, ou de cerca de 50 IU / mL e a, ou cerca de 150 IU / mL, entre, ou de cerca de 75 IU / mL e a, ou cerca de 125 IU / mL, entre, ou de cerca de 100 IU / mL e a, ou cerca de 200 IU / mL, ou entre, ou de cerca de 10 IU / mL e a, ou cerca de 100 IU / mL. Em concretizações particulares, células, por exemplo, células estimuladas e/ou células da composição célula estimulada, são incubadas com IL-2 recombinante em uma concentração em ou em cerca de 50 IU / mL, 60 IU / mL, 70 IU / mL, 80 IU / mL, 90 IU / mL, 100 IU / mL, 110 IU / mL, 120 IU / mL, 130 IU / mL, 140 IU / mL, 150 IU / mL, 160 IU / mL, 170 IU / mL, 180 IU / mL, 190 IU / mL, ou 100 IU / mL. Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células estimuladas, são incubadas na presença de, ou de cerca de 100 IU / mL de IL-2 recombinante, por exemplo, IL-2 recombinante humana.

[00365] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células estimuladas, são submetidas à modificação, por exemplo, transfectadas ou transduzidas, na presença de IL-7, por exemplo, IL-7 recombinante humana, em uma concentração entre, ou de cerca de 100 IU / mL e, ou cerca de 2,000 IU / mL, entre, ou de cerca de 500 IU / mL e, ou cerca de 1.000 IU / mL, entre, ou de cerca de 100 IU / mL e, ou cerca de 500 IU / mL, entre, ou de cerca de 500 IU / mL e, ou cerca de 750 IU / mL, entre, ou de cerca de 750 IU / mL, ou cerca de 1.000 IU / mL, ou entre, ou de cerca de 500 IU / mL e, ou cerca de 700 IU / mL. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, células estimuladas, são modificadas, por exemplo, transduzidas ou transfecta-

das, com IL-7 em uma concentração em ou em cerca de 50 IU / mL, 100 IU / mL, 150 IU / mL, 200 IU / mL, 250 IU / mL, 300 IU / mL, 350 IU / mL, 400 IU / mL, 450 IU / mL, 500 IU / mL, 550 IU / mL, 600 IU / mL, 650 IU / mL, 700 IU / mL, 750 IU / mL, 800 IU / mL, 750 IU / mL, 750 IU / mL, ou 1.000 IU / mL. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, células estimuladas, incubadas na presença de, ou de cerca de 600 IU / mL de IL-7.

[00366] Em certas concretizações, as células, por exemplo, células estimuladas, são submetidas à modificação, por exemplo, transfectadas ou transduzidas, na presença de IL-15, por exemplo, IL-15 recombinante humana, em uma concentração entre, ou de cerca de 1 IU / mL e, ou cerca de 500 IU / mL, entre, ou de cerca de 10 IU / mL e, ou cerca de 250 IU / mL, entre, ou de cerca de 50 IU / mL e, ou cerca de 200 IU / mL, entre, ou de cerca de 50 IU / mL e, ou cerca de 150 IU / mL, entre, ou de cerca de 75 IU / mL e, ou cerca de 125 IU / mL, entre, ou de cerca de 100 IU / mL e, ou cerca de 200 IU / mL, ou entre, ou de cerca de 10 IU / mL e, ou cerca de 100 IU / mL. Em algumas concretizações, células, por exemplo, células estimuladas e/ou células da composição de células estimuladas, são incubadas com IL-15 recombinante em uma concentração em ou em cerca de 50 IU / mL, 60 IU / mL, 70 IU / mL, 80 IU / mL, 90 IU / mL, 100 IU / mL, 110 IU / mL, 120 IU / mL, 130 IU / mL, 140 IU / mL, 150 IU / mL, 160 IU / mL, 170 IU / mL, 180 IU / mL, 190 IU / mL, ou 100 IU / mL. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, as células estimuladas, são incubadas na presença de, ou de cerca de 100 IU / mL de IL-15 recombinante, por exemplo, IL-15 recombinante humana.

[00367] Em concretizações particulares, células, por exemplo, células estimuladas são submetidas à modificação sob condições de estimulação na presença de IL-2, IL-7, e/ou IL-15. Em certas concretizações, a IL-2, IL-7, e/ou IL-15 são recombinantes. Em certas concreti-

zações, a IL-2, IL-7, e/ou IL-15 são humanas. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-2 recombinante humana, IL-7, e/ou IL-15. Em certas concretizações, as células são submetidas à modificação, por exemplo, transduzidas ou transfectadas, sob condições de estimulação na presença de IL-2 recombinante, IL-7, e IL-15.

[00368] Em algumas concretizações, os métodos fornecidos são usados em conexão com a transdução de um vetor viral contendo um polinucleotídeo codificando um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células, por exemplo, células de uma composição de célula estimulada. Em certas concretizações, a, ou cerca de 100×10^6 células, por exemplo, células de uma composição de célula estimulada são transduzidas. Em certas concretizações, as células são células viáveis. Em algumas concretizações, a transdução é realizada em meio livre de soro. Em algumas concretizações, a transdução é realizada na presença de IL-2, IL-7, e IL-15. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, as células da composição celular estimulada contêm pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de células que são células T CD4+ ou células T CD8+. Em algumas concretizações, a transdução é realizada durante entre 24 e 48 horas, entre 36 e 12 horas, entre 18 e 30 horas, ou durante, ou durante cerca de, 24 horas. Em certas concretizações, a etapa de transdução é iniciada dentro de dois dias, dentro 36 horas, ou dentro 30 horas do início ou iniciação da incubação, por exemplo, a incubação sob condições de estimulação.

1. Preparação de Partículas de Vetor Viral para Transdução

[00369] O genoma de vetor viral é tipicamente construído em uma forma de plasmídeo que pode ser transfectada em um pacote ou linhagem de célula produtora. Em qualquer de tais exemplos, o ácido nucleico codificando uma proteína recombinante, tal como um receptor

recombinante, é inserido ou localizado em uma região do vetor viral, tal como geralmente em uma região não essencial do genoma viral. Em algumas concretizações, o ácido nucleico é inserido no genoma viral em lugar de certas sequências virais para produzir um vírus que é de replicação defeituosa.

[00370] Qualquer um de vários métodos conhecidos pode ser usado para produzir partículas retrovirais cujo genoma contém uma cópia de RNA do genoma de vetor viral. Em algumas concretizações, pelo menos dois componentes estão envolvidos na preparação de um Sistema de liberação de gene com base no vírus: primeiro, empacotando plasmídeos, abrangendo as proteínas estruturais bem como as enzimas necessárias para gerar uma partícula de vetor viral, e segundo, o próprio vetor viral, isto é, o material genético a ser transferido. As garantias de biossegurança podem ser introduzidas no planejamento de um ou ambos os componentes.

[00371] Em algumas concretizações, o plasmídeo de empacotamento pode conter todas as proteínas retrovirais, tal como HIV-1, que não proteínas envelope (Naldini *et al.*, 1998). Em outras concretizações, os vetores virais podem não ter genes virais adicionais, tais como aqueles que estão associados com a virulência, por exemplo, vpr, vif, vpu e nef, e/ou Tat, um transativador primário do HIV. Em algumas concretizações, vetores lentivirais, tais como os vetores lentivirais com base em HIV, compreendem apenas três genes do vírus parental: gag, pol e rev, que reduz ou elimina a possibilidade de reconstituição de um vírus do tipo selvagem por meio de recombinação.

[00372] Em algumas concretizações, o genoma de vetor viral é introduzido em uma linhagem celular de empacotamento que contém todos os componentes necessários para empacotar o RNA genômico viral, transcrito do genoma de vetor viral, em partículas virais. Alternativamente, o genoma de vetor viral pode compreender um ou mais ge-

nes que codificam componentes virais, além de uma ou mais seqüências, por exemplo, ácidos nucleicos recombinantes de interesse. Em alguns aspectos, a fim de impedir a replicação do genoma na célula-alvo, no entanto, os genes virais endógenos requeridos para a replicação são removidos e fornecidos separadamente na linhagem celular de empacotamento.

[00373] Em algumas concretizações, uma linhagem celular de empacotamento é transfectada com um ou mais vetores plasmídicos contendo os componentes necessários para gerar as partículas. Em algumas concretizações, uma linhagem celular de empacotamento é transfectada com um plasmídeo contendo o genoma de vetor viral, incluindo as LTRs, a seqüência de empacotamento de ação cis e a seqüência de interesse, isto é, um ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno, como um CAR; e um ou mais plasmídeos auxiliares que codificam os componentes enzimáticos e/ou estruturais do vírus e/ou, tal como Gag, pol e/ou rev. Em algumas concretizações, múltiplos vetores são utilizados para separar os vários componentes genéticos que geram as partículas do vetor retroviral. Em algumas tais concretizações, o fornecimento de vetores separados para a célula de empacotamento reduz a chance de eventos de recombinação que poderiam de outro modo gerar vírus competentes de replicação. Em algumas concretizações, um único vetor plasmídico tendo todos os componentes retrovirais pode ser usado.

[00374] Em algumas concretizações, a partícula de vetor retroviral, tal como partícula de vetor lentiviral, é pseudotipada para aumentar a eficiência de transdução das células hospedeiras. Por exemplo, uma partícula de vetor retroviral, tal como uma partícula de vetor lentiviral, em algumas concretizações é pseudotipada com uma glicoproteína VSV-G, que fornece uma ampla gama de hospedeiros celulares estendendo os tipos de células que podem ser transduzidos. Em algu-

mas concretizações, uma linhagem celular de empacotamento é transfectada com um plasmídeo ou polinucleotídeo que codifica uma glicoproteína envelope não nativa, tal como para incluir envelopes xenotrópicos, politrópicos ou anfotrópicos, tal como envelope de vírus Sindbis, GALV ou VSV-G.

[00375] Em algumas concretizações, a linhagem celular de empacotamento fornece os componentes, incluindo proteínas regulatórias e estruturais virais, que são requeridas em *trans* para o empacotamento do RNA genômico viral em partículas de vetor lentiviral. Em algumas concretizações, a linhagem celular de empacotamento pode ser qualquer linha celular capaz de expressar proteínas lentivirais e produzir partículas de vetor lentiviral funcionais. Em alguns aspectos, as linhagens de células de empacotamento adequadas incluem 293 células (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) e Cf2Th (ATCC CRL 1430).

[00376] Em algumas concretizações, a linhagem celular de empacotamento expressa de forma estável a(s) proteína(s) viral(is). Por exemplo, em alguns aspectos, uma linhagem celular de empacotamento contendo os genes gag, pol, rev e/ ou outros genes estruturais, mas sem o LTR e componentes de empacotamento podem ser construídos. Em algumas concretizações, uma linhagem celular de empacotamento pode ser transfectada transitoriamente com moléculas de ácido nucleico que codificam uma ou mais proteínas virais juntamente com o genoma de vetor viral, contendo uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína heteróloga e/ou um ácido nucleico que codifica uma glicoproteína envelope .

[00377] Em algumas concretizações, os vetores virais e os plasmídeos de empacotamento e/ou auxiliares são introduzidos por meio de transfecção ou infecção na linhagem celular de empacotamento. A li-

nhagem celular de empacotamento produz partículas de vetor viral que contêm o genoma de vetor viral. Os métodos para transfecção ou infecção são bem conhecidos. Exemplos não limitantes incluem métodos de fosfato de cálcio, DEAE-dextrano e lipofecção, eletroporação e microinjeção.

[00378] Quando um plasmídeo recombinante e a LTR retroviral e as sequências de empacotamento são introduzidos em uma linhagem celular especial (por exemplo, por precipitação com fosfato de cálcio, por exemplo), as sequências de empacotamento podem permitir que a transcrição de RNA do plasmídeo recombinante seja empacotada em partículas virais que então podem ser secretadas no meio de cultura. Os meios contendo as retrovíroses recombinantes em algumas concretizações são então coletados, opcionalmente concentrados e usados para transferência de gene. Por exemplo, em alguns aspectos, após cotransfecção dos plasmídeos de empacotamento e do vetor de transferência para a linhagem celular de empacotamento, as partículas de vetor viral são recuperadas do meio de cultura e tituladas por métodos padrão usados por aqueles versados na técnica.

[00379] Em algumas concretizações, um vetor retroviral, tal como um vetor lentiviral, pode ser produzido em uma linhagem celular de empacotamento, tal como um exemplo de linhagem celular HEK 293T, por introdução de plasmídeos para permitir a geração de partículas lentivirais. Em algumas concretizações, uma célula de empacotamento é transfectada e/ou contém um polinucleotídeo que codifica gag e pol, e um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno, por exemplo, um CAR. Em algumas concretizações, a linhagem celular de empacotamento é opcionalmente e/ou adicionalmente transfectada com e/ou contém um polinucleotídeo que codifica uma proteína rev. Em algumas concretizações, a linhagem celular de empacotamento é opcionalmente e/ou adicionalmente trans-

fectada com e/ou contém um polinucleotídeo que codifica uma glicoproteína envelope não nativa, como VSV-G. Em algumas tais concretizações, aproximadamente dois dias após a transfecção das células, por exemplo, as células HEK 293T, o sobrenadante celular contém vetores lentivirais recombinantes, que podem ser recuperados e titulados.

[00380] Partículas de vetor retroviral recuperadas e/ou produzidas podem ser usadas para transduzir células alvo usando os métodos como descritos. Uma vez nas células alvo, o RNA viral é reversamente transcrito, importado para o núcleo e integrado de maneira estável no genoma hospedeiro. Um ou dois dias após a integração do RNA viral, a expressão da proteína recombinante, por exemplo, receptor de antígeno, tal como CAR, pode ser detectada.

2. Vetores não virais

[00381] Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por meio de eletroporação (ver, por exemplo, Chicaybam *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8 (3): e60298 e Van Tedeloo *et al.* (2000) *Gene Therapy* 7 (16): 1431-1437). Em algumas concretizações, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por meio de transposição (ver, por exemplo, Manuri *et al.* (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma *et al.* (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; e Huang *et al.* (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Outros métodos de introdução e expressão de material genético em células imunes incluem a transfecção de fosfato de cálcio (por exemplo, como descrito em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nova York. N.Y.), fusão de protoplasto, transfecção mediada por lipossoma catiônico; bombardeio de micropartícula facilitado por partícula de tungstênio (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); e co-precipitação de DNA de fosfato de estrôncio (Brash *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

[00382] Outros métodos e vetores para transferência dos ácidos nucleicos que codificam os produtos recombinantes são aqueles descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional, Publicação No.: WO 2014055668 e Patente Norte-americana No. 7.446.190.

[00383] Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por meio de transposons. Transposons (elementos transponíveis), são segmentos móveis de DNA que podem se mover de um locus para outro dentro dos genomas. Esses elementos se movem por meio de um mecanismo conservador de "copia e cola": a transposase catalisa a excisão do transposon de sua localização original e promove sua reintegração em outra parte do genoma. Elementos deficientes de transposase podem ser mobilizados se a transposase for fornecida por outro gene de transposase. Desse modo, os transposons podem ser utilizados para incorporar um DNA estranho no genoma hospedeiro sem o uso de um sistema de transdução viral. Exemplos de transposons adequados para uso com células mamíferas, por exemplo, leucócitos primários humanos, incluem mas não estão limitados a Sleeping Beauty e Piggybac.

[00384] Transfecção com base em transposon é um sistema de dois componentes que consiste em uma transposase e um transposon. Em algumas concretizações, o sistema que compreende um transposon é modificado compreender um DNA estranho (também referido aqui como DNA de carga), por exemplo, um gene que codifica um receptor recombinante, que é flanqueado por sequências de repetição invertida / repetição direta (IR / DR) que são reconhecidas por uma transposase acompanhante. Em algumas concretizações, um plasmídeo não viral codifica uma transposase sob o controle de um promotor. A transfecção do plasmídeo para uma célula hospedeira resulta em uma expressão transitória da transposase, desse modo, por um período inicial após a transfecção, a transposase é expressa em

níveis suficientes para integrar o transposon no DNA genômico. Em algumas concretizações, a própria transposase não é integrada ao DNA genômico e, portanto, a expressão da transposase diminui ao longo do tempo. Em algumas concretizações, a expressão da transposase é expressa pela célula hospedeira em níveis suficientes para integrar um transposon correspondente por menos que cerca de 4 horas, menos que cerca de 8 horas, menos que cerca de 8 horas, menos que cerca de 12 horas, menos que cerca de 24 horas, menos que cerca de 2 dias, menos que cerca de 3 dias, menos que cerca de 4 dias, menos que cerca de 5 dias, menos que cerca de 6 dias, menos que cerca de 7 dias, menos que cerca de 2 semanas, menos que cerca de 3 semanas, menos que cerca de 4 semanas, menos que cerca de semanas ou menos que 8 semanas. Em algumas concretizações, o DNA de carga que é introduzido no genoma do hospedeiro não é subsequentemente removido do genoma do hospedeiro, pelo menos porque a dose do hospedeiro não expressa uma transposase endógena capaz de excisar o DNA de carga.

[00385] Sleeping Beauty (SB) é um membro sintético da superfamília de transposons Tc/1-mariner, reconstruída a partir de elementos dormentes alojados no genoma de peixes salmonídeos. A transfecção com base em transposon SB é um sistema de dois componentes que consiste em uma transposase e um transposon contendo seqüências de repetição invertida / repetição direta (IR / DR) que resultam em integração precisa em um dinucleotídeo TA. O transposon é projetado com um cassete de expressão de interesse, ladeada por IR / DRs. A transposase SB liga sítios de ligação específicos que estão localizados no IR do transposon Sleeping Beauty. A transposase SB medeia a integração do transposon, um elemento móvel que codifica uma seqüência de carga flanqueada em ambos os lados por repetições terminais invertidas que alojam sítios de ligação para a enzima catalítica

(SB). A expressão estável resulta quando o SB insere sequências de genes nos cromossomos de vertebrados em um dinucleotídeo alvo de TA através de um mecanismo de cópia-e-cola. Este sistema foi usado para modificar vários tipos de células de vertebrados, incluindo leucócitos de sangue periférico humano primários. Em algumas concretizações, as células são contatadas, incubadas e/ou tratadas com um transposon SB compreendendo um gene de carga, por exemplo, um gene que codifica um receptor recombinante ou um CAR, flanqueado por sequências IR de SB. Em concretizações particulares, as células a serem transfectadas são contatadas, incubadas e/ou tratadas com um plasmídeo compreendendo um transposon SB compreendendo um gene de carga, por exemplo, um gene que codifica um CAR, flanqueado por sequências IR de SB. Em certas concretizações, o plasmídeo também compreende um gene que codifica uma transposase SB que não é flanqueada por sequências IR de SB.

[00386] PiggyBac (PB) é outro sistema de transposon que pode ser usado para integrar o DNA de carga no DNA genômico de um hospedeiro, por exemplo, um humano. A transposase PB reconhece sequências de repetição terminal invertidas (ITRs) específicas de transposon PB localizadas em ambas as extremidades do transposon e move eficientemente o conteúdo dos sítios originais e os integra de maneira eficiente nos sítios cromossômicos TTAA. O sistema de transposon PB possibilita que genes de interesse entre as duas ITRs no vetor PB sejam mobilizados nos genomas alvo. O sistema PB foi usado para modificar uma variedade de tipos de células de vertebrados, incluindo células humanas primárias. Em algumas concretizações, as células a serem transfectadas são contatadas, incubadas e/ou tratadas com um transposon PB compreendendo um gene de carga, por exemplo, um gene que codifica um CAR, flanqueado por sequências IR de PB. Em concretizações particulares, as células a se-

rem transfetadas são contatadas, incubadas e/ou tratadas com um plasmídeo compreendendo um transposon PB compreendendo um gene de carga, por exemplo, um gene que codifica um CAR, flanqueado por sequências IR de PB. Em certas concretizações, o plasmídeo também compreende um gene que codifica uma transposase SB que não é flanqueada por sequências de IR de PB.

[00387] Em algumas concretizações, os vários elementos do transposon / transposase empregados nos métodos objeto, por exemplo, vetor SB ou PB, pode ser produzido por métodos padrão de clivagem enzimática de restrição, ligação e clonagem molecular. Um protocolo para construir os vetores objeto inclui as seguintes etapas. Primeiro, os fragmentos de ácido nucleico purificados contendo sequências nucleotídicas componentes desejadas, bem como sequências estranhas, são clivados com endonucleases de restrição de fontes iniciais, por exemplo, um vetor compreendendo o gene de transposase. Os fragmentos contendo as sequências nucleotídicas desejadas são então separados dos fragmentos indesejados de tamanho diferente usando métodos de separação convencionais, por exemplo, por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos desejados são excisados do gel e ligados entre si na configuração apropriada, de modo a produzir um ácido nucleico circular ou plasmídeo contendo as seqüências desejadas, por exemplo, sequências correspondentes aos vários elementos dos vetores objeto, como descrito acima. Onde desejado, as moléculas circulares desse modo construídas são então amplificadas em um hospedeiro procariótico, por exemplo, *E. coli*. Os procedimentos de clivagem, construção de plasmídeo, transformação celular e produção de plasmídeo envolvidos nessas etapas são bem conhecidos por alguém versado na técnica e as enzimas requeridas para restrição e ligação estão disponíveis comercialmente. (Ver, por exemplo, R. Wu, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 68, Academic Press, N.Y. (1979); T.

Maniatis, E. F. Fritsch e J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); Catálogo 1982-83, New England Biolabs, Inc.; Catálogo 1982-83, Bethesda Research Laboratories, Inc. Um exemplo de como construir os vetores empregados nos métodos objeto é fornecido na seção Experimental, infra. A preparação de um sistema de transposon Sleeping Beauty representativo é também descrita nos documentos WO 98/40510 e WO 99/25817).

[00388] Em algumas concretizações, a transdução com transposons é realizada com um plasmídeo que compreende um gene de transposase e um plasmídeo que compreende um transposon que contém uma sequência de DNA de carga que é flanqueada por sequências de repetição invertida / repetição direta (IR / DR) que são reconhecidas pela transposase. Em certas concretizações, a sequência de DNA de carga codifica uma proteína heteróloga, por exemplo, um receptor de célula T recombinante ou um CAR. Em algumas concretizações, o plasmídeo compreende transposase e o transposon. Em algumas concretizações, a transposase está sob controle de um promotor ubíquo, ou qualquer promotor adequado para direcionar a expressão da transposase na célula alvo. Os promotores ubíquos incluem, mas não estão limitados a, EF1a, CMB, SV40, PGK1, Ubc, β -actina humana, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa e U6. Em algumas concretizações, o DNA de carga compreende um cassete de seleção que permite a seleção de células com integração estável do DNA de carga no DNA genômico. Cassetes de seleção adequados incluem, mas não estão limitados a, cassetes de seleção que codificam um gene de resistência à canamicina, gene de resistência à espectinomicina, gene de resistência à estreptomicina, gene de resistência à ampicilina, gene de resistência à carbenicilina, gene de resistência à higromicina, gene de resistência à bleomicina, gene de resistência à eritromicina e gene

de resistência à polimixina B.

[00389] Em algumas concretizações, os componentes para a transdução com um transposon, por exemplo, plasmídeos compreendendo um transposase SB e transposon SB, são introduzidos na célula alvo. Qualquer protocolo conveniente pode ser empregado, em que o protocolo pode fornecer a introdução *in vitro* ou *in vivo* dos componentes do sistema na célula alvo, dependendo da localização da célula alvo. Por exemplo, onde a célula alvo é uma célula isolada, o sistema pode ser introduzido diretamente na célula sob condições de cultura celular permissivas de viabilidade da célula alvo, por exemplo, utilizando técnicas de transformação padrão. Tais técnicas incluem, mas não estão necessariamente limitadas a: infecção viral, transformação, conjugação, fusão de protoplastos, eletroporação, tecnologia de pistola de partículas, precipitação de fosfato de cálcio, microinjeção direta, liberação de vetor viral e similares. A escolha do método é geralmente dependente do tipo de célula que está sendo transformada e das circunstâncias sob as quais a transformação está ocorrendo (isto é, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*). Uma discussão geral desses métodos pode ser encontrada em Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995.

[00390] Em algumas concretizações, o transposon SB e a fonte de transposase SB são introduzidos em uma célula alvo de um organismo multicelular, por exemplo, um mamífero ou um humano, sob condições suficientes para excisão do ácido nucleico flanqueado por repetição invertida do vetor transportando o transposon e subsequente integração do ácido nucleico excisado no genoma da célula alvo. Algumas concretizações compreendem ainda uma etapa de garantir que a atividade requisitada de transposase esteja presente na célula alvo juntamente com o transposon introduzido. Dependendo da estrutura do próprio vetor de transposon, isto é, se o vetor inclui ou não uma região

que codifica um produto com atividade de transposase, o método pode também incluir a introdução de um segundo vetor na célula alvo que codifica a atividade de transposase requisitada.

[00391] Em algumas concretizações, a quantidade de ácido nucleico do vetor compreendendo o transposon e a quantidade de ácido nucleico do vetor que codifica a transposase que é introduzida na célula é suficiente para fornecer a excisão e inserção desejadas do ácido nucleico de transposon no genoma da célula alvo. Como tal, a quantidade de ácido nucleico vetor introduzida deve fornecer uma quantidade suficiente de atividade da transposase e um número suficiente de cópias do ácido nucleico que se deseja que seja inserido na célula alvo. A quantidade de ácido nucleico vetor que é introduzida na célula alvo varia dependendo da eficiência do protocolo de introdução particular que é empregado, por exemplo, o protocolo de administração *ex vivo* particular que é empregado.

[00392] Depois que o DNA vetor entra na célula-alvo em combinação com a transposase requisitada, a região de ácido nucleico do vetor que é flanqueada por repetições invertidas, isto é, o ácido nucleico vetor posicionado entre as repetições invertidas reconhecidas de transposase Sleeping Beauty, é excisado do vetor por meio da transposase fornecida e inserido no genoma da célula alvo. Como tal, a introdução do DNA vetor na célula alvo é seguida por subsequente excisão e inserção mediada pela transposase do ácido nucleico exógeno transportado pelo vetor no genoma da célula alvo. Em concretizações particulares, o vetor é integrado nos genomas de pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 2%, pelo menos, ou cerca de 3%, pelo menos, ou cerca de 4%, pelo menos, ou cerca de 4%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 6%, pelo menos, ou cerca de 7%, pelo menos, ou cerca de 8%, pelo menos, ou cerca de 9%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 15%, pelo menos,

ou cerca de 15% ou pelo menos, ou cerca de 20% das células que são transfectadas com o transposon SB e/ou transposase SB. Em algumas concretizações, a integração do ácido nucleico no genoma da célula alvo é estável, isto é, o ácido nucleico vetor permanece presente no genoma da célula alvo por mais de um período de tempo transitório e é passado em uma parte do material genético cromossômico para a progênie da célula alvo.

[00393] Em certas concretizações, os transposons são usados para integrar ácidos nucleicos, isto é, polinucleotídeos, de vários tamanhos no genoma da célula alvo. Em algumas concretizações, o tamanho do DNA que é inserido no genoma da célula-alvo usando os métodos objeto varia de, ou de cerca de 0,1 kb até de, ou cerca de 200 kb, de, ou de cerca de 0,5 kb até de, ou cerca de 100 kb, de, ou cerca de 1,0 kb até de, ou cerca de 8,0 kb, até de, ou cerca de 1,0 até de, ou cerca de 200 kb, de, ou cerca de 1,0 até de, ou cerca de 10 kb, de, ou de cerca de 10 kb de, ou cerca de 50 kb, de, ou de cerca de 50 kb a, ou cerca de cerca de 100 kb, ou de, ou cerca de 100 kb até de, ou cerca de 200 kb. Em algumas concretizações, o tamanho do DNA que é inserido no genoma da célula-alvo usando os métodos objeto varia de, ou de cerca de 1,0 kb até de, ou de cerca de 8,0 kb. Em algumas concretizações, o tamanho do DNA que é inserido no genoma da célula alvo, usando os métodos objeto, varia de, ou cerca de 1,0 até de, a cerca de 200 kb. Em concretizações particulares, o tamanho do DNA que é inserido no genoma da célula-alvo usando os métodos objeto varia de, a cerca de 1,0 kb a a, ou aproximadamente 8,0 kb.

D. Cultivando e/ou expandindo as células

[00394] Em algumas concretizações, os métodos incluídos incluem uma ou mais etapas para o cultivo de células, tal como o cultivo das células sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão. Em algumas concretizações, células, por exemplo, células T CD4+ e

CD8+ modificadas, são cultivadas sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão subsequente à modificação genética das células, por exemplo, introduzindo um polipeptídeo recombinante nas células, por transdução ou transfecção. Em concretizações particulares, as células são cultivadas após terem sido incubadas sob condições de estimulação e/ou após terem sido transduzidas ou transfectadas com um polinucleotídeo recombinante, por exemplo, um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Em algumas concretizações, o cultivo produz células cultivadas. Em certas concretizações, o cultivo produz uma composição cultivada, por exemplo, uma composição de células cultivadas. Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais etapas de processamento incluem uma etapa de estimulação das células isoladas, tal como as populações celulares selecionadas. A incubação pode ser antes de, ou em conexão com a modificação genética, tal como modificação genética resultante de concretizações do método de transdução aqui descrito, por exemplo, na Seção I-C. Em algumas concretizações, a estimulação resulta em ativação e/ou proliferação das células, por exemplo, antes da transdução.

[00395] Em certas concretizações, as células e/ou composições de células T modificadas são cultivadas, por exemplo, sob condições que promovem a expansão e/ou proliferação, antes de coletar e formular as células, tal como por um método aqui fornecido, por exemplo, Seção I-E. Em concretizações particulares, as células são cultivadas após terem sido modificadas, transduzidas e/ou transfectadas, como ocorre por qualquer um dos métodos especificados aqui, por exemplo, na Seção I-C. Em concretizações particulares, as composições modificadas foram previamente criocongeladas e armazenadas, e descongeladas antes do cultivo.

[00396] Em certas concretizações, é cultivada uma composição de células. Em concretizações particulares, cerca de ou pelo menos, ou

cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, menos de, ou cerca de 70%, menos de, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, menos de, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, menos de, ou cerca de 95%, menos de, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou de, ou de cerca de 100% das células da composição são células T CD3+. Em certas concretizações, cerca de ou pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou de, ou cerca de 100% das células da composição são células que são células T CD4 + ou CD8+.

[00397] Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 90%, ou pelo menos, ou cerca de 95% das células submetidas ou que foram submetidas à modificação, transfecção e/ou transdução. Em concretizações particulares, todas ou cerca de todas as células submetidas ou submetidas a engenharia, transfecção e/ou transdução são cultivadas.

[00398] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células modificadas são cultivadas em um volume de mídia que é cerca de 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 1.000 mL, 1.200 mL, 1.400 mL, 1.600 mL, 1.800 mL, 2.000 mL, 2.200 mL ou 2.400 mL. Em algumas concretizações, as células são cultivadas em um volume inicial que é posteriormente ajustado para um volume diferente. Em concretizações particulares, o volume é ajustado durante o cultivo. Em concretizações particulares, o volume é aumentado em relação ao volume inicial durante o cultivo. Em

concretizações particulares, o volume é aumentado quando as células atingem uma densidade durante o cultivo. Em certas concretizações, o volume inicial é de, ou é de, ou de cerca de 500 mL.

[00399] Em concretizações particulares, o volume é aumentado em relação ao volume inicial quando as células atingem uma densidade ou concentração durante o cultivo. Em concretizações particulares, o volume é aumentado quando as células atingem uma densidade e/ou concentração de, de cerca de, ou pelo menos que, ou cerca de $0,1 \times 10^6$ células/mL, $0,2 \times 10^6$ células/mL, $0,4 \times 10^6$ células/mL, $0,6 \times 10^6$ células/mL, $0,8 \times 10^6$ células/mL, 1×10^6 células/mL, $1,2 \times 10^6$ células/mL, $1,4 \times 10^6$ células/mL, $1,6 \times 10^6$ células/mL, $1,8 \times 10^6$ células/mL, $2,0 \times 10^6$ células/mL, $2,5 \times 10^6$ células/mL, $3,0 \times 10^6$ células/mL, $3,5 \times 10^6$ células/mL, $4,0 \times 10^6$ células/mL, $4,5 \times 10^6$ células/mL, $5,0 \times 10^6$ células/mL, 6×10^6 células/mL, 8×10^6 células/mL, ou 10×10^6 células/mL. Em algumas concretizações, a densidade e/ou concentração é de células viáveis na cultura. Em algumas concretizações, o volume é aumentado do volume inicial quando as células atingem uma densidade e/ou concentração de, pelo menos, ou aproximadamente $0,6 \times 10^6$ células/mL.

[00400] Em algumas concretizações, as células atingem uma densidade e/ou concentração, e o volume é aumentado em, em cerca de, ou pelo menos em, ou cerca de 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 1.000 mL, 1.200 mL, 1.400 mL, 1.600 mL, 1.800 mL, 2.000 mL, 2.200 mL ou 2.400 mL. Em algumas concretizações, o volume é aumentado em 500 mL. Em concretizações particulares, o volume é aumentado para um volume de, de cerca de, ou pelo menos que, ou cerca de 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 800 mL, 900 mL, 1.000 mL, 1.200 mL, 1.400 mL, 1.600 mL, 1.800 mL, 2.000 mL, 2.200 mL ou 2.400 mL. Em certas concretizações, o volume é aumentado para um volume de 1.000 mL. Em certas concretizações,

o volume é aumentado em uma taxa de, pelo menos cerca de 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 90 mL, ou 100 mL, a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 minutos. Em certas concretizações, a taxa é de, ou de cerca de 50 mL a cada 8 minutos.

[00401] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células modificadas, são cultivadas inicialmente em um volume de 500 mL. Em concretizações particulares, o volume é aumentado para 1.000 mL quando as células atingem uma densidade ou concentração de $0,6 \times 10^6$ células/mL durante o cultivo.

[00402] Em algumas concretizações, o cultivo é realizado em meio livre de soro. Em algumas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura celular definido e/ou bem definido. Em certas concretizações, o meio livre de soro é um meio de cultura controlado que foi processado, por exemplo, filtrado para remover inibidores e/ou fatores de crescimento. Em algumas concretizações, o meio livre de soro contém proteínas. Em certas concretizações, o meio livre de soro pode conter albumina sérica, hidrolisados, fatores de crescimento, hormônios, proteínas carreadoras e/ou fatores de ligação.

[00403] Em algumas concretizações, os métodos fornecidos são usados em conexão com uma etapa de cultivo das células sob condições que promovam expansão e/ou proliferação. Tais condições incluem aquelas planejadas para induzir proliferação, expansão, ativação, e/ou sobrevivência de células na população, para imitar a exposição a antígenos, e/ou preparar as células para engenharia genética, tal como para a introdução de um receptor de antígeno recombinante.

[00404] Em algumas concretizações, as condições de cultivo podem incluir um ou mais meios particulares, temperatura, teor de oxigênio, teor de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons, e/ou fatores estimulatórios, tal co-

mo citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[00405] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é removido e/ou separado das células subsequentes a, e/ou após o cultivo. Em certas concretizações, o agente estimulatório é removido e/ou separado das células após e/ou subsequente ao cultivo e antes da formulação das células, por exemplo, formulação de uma composição de saída de células de saída cultivadas. Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é um reagente estimulatório que é aqui descrito, por exemplo, na Seção I-B-1. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido e/ou separado das células como aqui descrito, por exemplo, na Seção I-B-2.

[00406] As condições podem incluir um ou mais meios particulaa-res, temperatura, teor de oxigênio, teor de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons, fatores estimulatórios, tais como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[00407] Em alguns aspectos, a incubação é realizada de acordo com técnicas tais como aquelas descritas na Patente Norte-americana 6.040.177 de Riddell *et al.*, Klebanoff *et al.* (2012) J Immunother. 35 (9): 651–660, Terakura *et al.* (2012) Blood.1: 72–82, Wang *et al.* (2012) J. Immunother. 35 (9): 689-701.

[00408] Em algumas concretizações, pelo menos uma parte do cultivo é realizada na cavidade interna de uma câmara centrífuga, por exemplo, sob rotação centrífuga, tal como descrito na Publicação Internacional Número WO 2016/073602. Em algumas concretizações, pelo menos uma porção de uma incubação realizada em uma câmara centrífuga inclui a mistura com um reagente ou reagentes para induzir

a estimulação e/ou ativação. Em algumas concretizações, as células, tais como as células selecionadas, são misturadas com uma condição estimulante ou agente estimulatório na câmara centrífuga. Em alguns aspectos de tais processos, um volume de células é misturado com uma quantidade de uma ou mais condições ou agentes estimulantes que são muito menos do que é normalmente empregada na realização de estimulações similares em uma placa de cultura de células ou outro sistema.

[00409] Em algumas concretizações, o agente estimulatório é adicionado às células na cavidade da câmara em uma quantidade substancialmente menor que (por exemplo, não mais que 5%, 10%, 20%, 30%, 40). %, 50%, 60%, 70% ou 80% da quantidade) em comparação com a quantidade do agente estimulatório que é normalmente usada ou seria necessária para atingir aproximadamente a mesma ou similar eficiência de seleção do mesmo número de células ou o mesmo volume de células quando a seleção é realizada sem mistura em uma câmara centrífuga, por exemplo, em um tubo ou saco com agitação ou rotação periódica. Em algumas concretizações, o cultivo é realizado com a adição de um tampão de cultivo às células e agente estimulatório para atingir um volume-alvo de, por exemplo, 10 mL a 2.000 mL, tal como pelo menos, ou pelo menos cerca de, ou cerca de 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 1.000 mL, 1.200 mL, 1.400 mL, 1.600 mL, 1.800 mL, 2.000 mL, 2.200 mL ou 2.400 mL. Em algumas concretizações, o tampão de incubação e agente estimulatório são pré-misturados antes da adição às células. Em algumas concretizações, um tampão de incubação e um agente estimulatório são adicionados separadamente às células. Em algumas concretizações, a incubação estimulatória é realizada com uma condição de mistura suave periódica, que pode auxiliar na

promoção de interações energeticamente favorecidas e, desse modo, permitir o uso de menos estimulante geral, além de estimular e ativar células.

[00410] Em algumas concretizações, a incubação geralmente é realizada sob condições de mistura, como na presença de centrifugação, geralmente em força ou velocidade relativamente baixas, tal como velocidade menor do que aquela usada para granular as células, tal como de, ou de cerca de 600 rpm a, ou a cerca de 1700 rpm (por exemplo, de, ou de cerca de, ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm, ou 1500 rpm ou 1700 rpm), tal como em uma RCF na amostra ou parede da câmara ou outro recipiente a partir de, ou a partir de cerca de 80 g a 100 g (por exemplo, de, ou cerca de, ou de pelo menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g ou 100 g). Em algumas concretizações, a centrifugação é realizado usando intervalos repetidos de uma centrifugação em tal velocidade tão baixa, seguida de um período de descanso, tal como uma centrifugação e/ou descanso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 segundos, como uma centrifugação de aproximadamente 1 ou 2 segundos, seguida de um descanso por aproximadamente 5, 6, 7 ou 8 segundos.

[00411] Em algumas concretizações, a duração total da incubação, por exemplo, com o agente estimulante, é entre, ou entre cerca de 1 hora e 96 horas, 1 hora e 72 horas, 1 hora e 48 horas, 4 horas e 36 horas, 8 horas e 30 horas ou 12 horas e 24 horas, tal como pelo menos, ou cerca de pelo menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas ou 72 horas. Em algumas concretizações, a incubação adicional ocorre por um período entre 1 hora e 48 horas, 4 horas e 36 horas, 8 horas e 30 horas ou 12 horas e 24 horas, inclusive.

[00412] Em concretizações particulares, uma composição de células T enriquecidas é cultivada na presença de uma ou mais citocinas. Em certas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes. Em concretizações particulares, como as refe-

ridas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes humanas. Em certas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas se ligam a, e/ou são capazes de se ligar a receptores que são expressos por e/ou são endógenas às células T. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são, ou incluem um membro da família de feixe 4-alfa-hélice de citocinas. Em algumas concretizações, os membros da família do feixe 4-alfa-hélice de citocinas incluem, mas não estão limitados a, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), fator estimulatório de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator estimulatório de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-15. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-7. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-2 recombinante.

[00413] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células modificadas, são cultivadas na presença de uma citocina, por exemplo, uma citocina humana recombinante, em uma concentração entre, ou de cerca de 1 UI / mL e entre, ou de cerca de 2.000 UI / mL, entre, ou de cerca de 10 UI / mL, ou cerca de 100 UI / mL, entre, ou cerca de 50 UI / mL, ou cerca de 200 UI / mL, entre, ou cerca de 100 UI / mL e a, ou cerca de 500 UI / mL, entre ou cerca de 100 UI / mL e a, ou cerca de 1.000 UI / mL, entre ou cerca de 500 UI / mL e de, ou de cerca de 2.000 UI/mL, ou entre, ou de cerca de 100 IU/mL e de, ou de cerca de 1.500 UI/mL.

[00414] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células modificadas, são cultivadas com IL-2, por exemplo, IL-2 humana recombinante, em uma concentração entre, ou cerca de 1 UI / mL e, ou cerca de 500 UI / mL, entre, ou cerca de 10 UI / mL, ou cerca de

400 UI / mL, entre, ou cerca de 100 UI / mL, ou cerca de 300 UI / mL, entre, ou cerca de 100 UI / mL e a, ou cerca de 250 UI / mL, entre ou cerca de 150 UI / mL e de, ou cerca de 300 UI / mL, entre ou cerca de 200 UI / mL e de, ou cerca de 400 UI / mL, ou entre, ou cerca de 150 UI / mL e de, ou cerca de 300 UI / mL, por exemplo, em um meio livre de soro. Em concretizações particulares, células, por exemplo, células da composição de entrada, são incubadas com IL-2 recombinante em uma concentração de, de cerca de, ou pelo menos que, ou cerca de 100 UI / mL, 120 UI / mL, 140 UI / mL, 160 UI / mL, 180 UI / mL, 200 UI / mL, 220 UI / mL, 240 UI / mL, 260 UI / mL, 280 UI / mL, 300 UI / mL, 320 UI / mL, 340 UI / mL, 360 UI / mL, 380 UI / mL ou 400 UI / mL. Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células de entrada, são cultivadas na presença de, ou de cerca de 200 UI / mL de IL-2 recombinante, por exemplo, IL-2 recombinante humana.

[00415] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células modificadas, são cultivadas com IL-7 recombinante, por exemplo, IL-7 humana recombinante, em uma concentração entre, ou cerca de 100 UI / mL e de, ou cerca de 2.000 UI/mL, entre, ou de cerca de 500 UI / mL e de, ou de cerca de 1.500 UI / mL, entre, ou cerca de 600 UI/mL, e de ou cerca de 1200 UI / mL, entre, ou de cerca de 800 UI/mL e de, ou cerca de 1600 UI/mL, entre, ou de cerca de 900 UI/mL e de, ou cerca de 1.800 UI / mL, ou entre, ou cerca de 1.000 UI / mL e de, ou cerca de 1.500 UI / mL, por exemplo, em um meio livre de soro. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, as células modificadas, são incubadas com IL-7 em uma concentração de, pelo menos que, ou cerca de 200 UI/mL, 300 UI/mL, 400 UI/mL, 500 UI/mL, 600 UI / mL, 700 UI / mL, 800 UI / mL, 900 UI / mL, 1.000 UI / mL, 1.200 UI / mL, 1.400 UI / mL, 1.600 UI / mL, 1.800 UI / mL mL, 2.000 UI / mL, 2.200 UI/mL, ou 2.400 UI/mL. Em concretizações particulares, as células, por exemplo, as células modificadas, são cultivadas na

presença de, ou de cerca de 1.200 UI/mL de IL-7.

[00416] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células modificadas, são cultivadas com IL-15, por exemplo, IL-15 humana recombinante, em uma concentração entre, ou de cerca de 1 UI / mL e de, ou cerca de 500 UI/mL, entre, ou cerca de 10 UI/mL, ou cerca de 400 UI/mL, entre, ou de cerca de 100 UI / mL, ou cerca de 300 UI / mL, entre, ou cerca de 100 UI / mL e de, ou cerca de 250 UI / mL, entre ou de cerca de 150 UI/mL e de, ou cerca de 300 UI/mL, entre ou cerca de 200 UI/mL e de, ou de cerca de 400 UI / mL, ou entre, ou cerca de 150 UI / mL e de, ou de cerca de 150 UI/mL, por exemplo, em um meio livre de soro. Em concretizações particulares, células, por exemplo, células da composição modificada, são incubadas com IL-15 recombinante em uma concentração de, de cerca de, ou de pelo menos cerca de 100 UI / mL, 120 UI / mL, 140 UI / mL, 160 UI / mL, 180 UI / mL, 200 UI / mL, 220 UI / mL, 240 UI / mL, 260 UI / mL, 280 UI / mL, 300 UI / mL, 320 UI / mL, 340 UI / mL, 360 UI / mL, 380 UI / mL ou 400 UI / mL. Em algumas concretizações, as células, por exemplo, as células T modificadas, são cultivadas na presença de, de cerca de 200 UI/mL de IL-15 recombinante, por exemplo, IL-15 humana recombinante.

[00417] Em concretizações particulares, as células, por exemplo, células modificadas e/ou da composição modificada, são cultivadas na presença de IL-2, IL-7, e/ou IL-15, por exemplo, em um meio livre de soro. Em algumas concretizações, a IL-2, IL-7 e/ou IL-15 são recombinantes. Em certas concretizações, a IL-2, IL-7 e/ou IL-15 são humanas. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem IL-2, IL-7, e/ou IL-15 recombinantes humanas. Em certas concretizações, as células são cultivadas na presença de IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes.

[00418] Em concretizações particulares, o cultivo é realizado em

sistema fechado. Em certas concretizações, o cultivo é realizado em sistema fechado sob condições estéreis. Em concretizações particulares, o cultivo é realizado no mesmo sistema fechado que uma ou mais etapas dos sistemas fornecidos. Em algumas concretizações, a composição de células T enriquecidas é removida de um sistema fechado e colocada em e/ou conectada a um biorreator para o cultivo. Exemplos de biorreatores adequados para o cultivo incluem, mas não estão limitados a, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 I 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems, e Pall XRS Bioreactor Systems. Em algumas concretizações, o biorreator é usado para perfundir e/ou misturar as células durante pelo menos uma parte da etapa de cultivo.

[00419] Em algumas concretizações, as células cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator sofrem expansão durante o cultivo mais rapidamente do que as células que são cultivadas sem biorreator, por exemplo, células cultivadas sob condições estáticas tal como sem mistura, balanço, movimento, e/ou perfusão. Em algumas concretizações, as células cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator atingem ou alcançam um limiar de expansão, contagem de células, concentração e/ou densidade dentro de 21 dias, 14 dias, 10 dias, 8 dias, 7 dias, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias, 60 horas, 48 horas, 36 horas, 24 horas ou 12 horas. Em algumas concretizações, as células cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator atingem ou alcançam um limite de expansão, concentração, contagem de célula, e/ou densidade pelo menos que, ou cerca de 50%, pelo menos de, de cerca de 60%, pelo menos que, ou cerca de 70%, pelo menos que, ou cerca de 80%, pelo menos que, ou cerca de 90%, pelo menos que, ou cerca de 95%, pelo menos de, ou decerca de 100%, menos que, ou cerca de 150%, menos que, ou cerca de 1 vez, pelo

menos, ou cerca de 2 vezes, pelo menos que, ou cerca de 3 vezes, pelo menos que, ou cerca de 4 vezes, pelo menos que, ou cerca de 5 vezes do que as células cultivadas em um processo exemplar e/ou alternativo em que as células não são cultivadas enquanto fechadas, conectadas e/ou sob controle de um biorreator .

[00420] Em algumas concretizações, a mistura é ou inclui balanço e/ou movimento. Em alguns casos, o biorreator pode ser submetido a movimento ou balanço, o que, em alguns aspectos, pode aumentar a transferência de oxigênio. A movimentação do biorreator pode incluir, mas não se limita a, girar ao longo de um eixo horizontal, girar ao longo de um eixo vertical, um movimento de balanço ao longo de um eixo horizontal inclinado ou transversal do biorreator ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas concretizações, pelo menos uma parte d incubação é realizada com balanço. A velocidade e o ângulo do balanço podem ser ajustados para alcançar a agitação desejada. Em algumas concretizações, o ângulo da rocha é de 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° ou 1°. Em certas concretizações, o ângulo da rocha é entre 6-16°. Em outras concretizações, o ângulo da rocha está entre 7-16°. Em outras concretizações, o ângulo da rocha está entre 8 e 12°. Em algumas concretizações, a taxa de rocha é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm. Em algumas concretizações, a taxa de rocha está entre 4 e 12 rpm, como entre 4 e 6 rpm, inclusive.

[00421] Em algumas concretizações, o biorreator mantém a temperatura em ou próximo a 37°C e os níveis de CO₂ a, ou próximo a, 5% com um fluxo de ar constante a, próximo a, pelo menos, ou cerca de 0,01 L/min, 0,05 L/min, 0,1 L/min, 0,2 L/min, 0,3 L/min, 0,4 L/min, 0,5 L/min, 1,0 L/min, 1,5 L/min, ou 2,0 L/min ou mais que 2,0 L/min. Em certas concretizações, pelo menos uma parte do cultivo é realizada

com perfusão, com uma taxa de 750 mL/dia e/ou 1500 mL/dia, por exemplo, dependendo do momento em relação ao início do cultivo e/ou densidade das células cultivadas. Em algumas concretizações, pelo menos uma parte da expansão da cultura de células é realizada com um movimento de balanço, tal como num ângulo entre 5° e 10°, tal como 6°, a uma velocidade constante de balanço, tal como uma velocidade entre 5 e 15 RPM, como 6 RMP ou 10 RPM.

[00422] Em algumas concretizações, a menor parte da etapa de cultivo é realizada sob perfusão constante, por exemplo, uma perfusão a uma taxa lenta e constante. Em algumas concretizações, a perfusão é ou inclui uma saída de líquido, por exemplo, meio usado e uma entrada de meio fresco. Em certas concretizações, a perfusão substitui o meio usado por fresco. Em algumas concretizações, pelo menos uma parte do cultivo é realizada sob perfusão a uma taxa constante de, ou de cerca de, ou de pelo menos a cerca de 100 mL/dia, 200 mL/dia, 250 mL/dia, 275 mL/dia, 290 mL/dia, 300 mL/dia, 350 mL/dia, 400 mL/dia, 450 mL/dia, 500 mL/dia, 550 mL/dia, 550 mL/dia, 575 mL/dia, 580 mL/dia, 600 mL/dia, 650 mL/dia, 700 mL/dia, 750 mL/dia, 800 mL/dia, 850 mL/dia, 900 mL/dia, 950 mL/dia, 1000 mL/dia, 1100 mL/dia, 1160 mL/dia, 1200 mL/dia, 1400 mL/dia, 1500 ml dia, 1600 mL/dia, 1800 mL/dia, 2000 mL/dia, 2200 mL/dia ou 2400 mL/dia.

[00423] Em concretizações particulares, o cultivo é iniciado sob condições sem nenhuma perfusão, e a perfusão iniciou após um período definido e/ou predeterminado de tempo, tal como ou como erca de, ou de pelo menos 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, ou mais de 72 horas após o começo ou início do cultivo. Em concretizações particulares, a perfusão é iniciada quando a densidade ou concentração das células atinge uma densidade ou concentração estabelecida ou predeterminada. Em algumas concretizações, a perfusão é iniciada quando as células cultivadas atingem uma densi-

dade ou concentração de, de cerca de, ou de menos, ou de cerca de $0,1 \times 10^6$ células/mL, $0,2 \times 10^6$ células/mL, $0,4 \times 10^6$ células/mL, $0,6 \times 10^6$ células/mL, $0,8 \times 10^6$ células/mL, 1×10^6 células/mL, $1,2 \times 10^6$ células/mL, $1,4 \times 10^6$ células/mL, $1,6 \times 10^6$ células/mL, $1,8 \times 10^6$ células/mL, $2,0 \times 10^6$ células/mL, $2,5 \times 10^6$ células/mL, $3,0 \times 10^6$ células/mL, $3,5 \times 10^6$ células/mL, $4,0 \times 10^6$ células/mL, $4,5 \times 10^6$ células/mL, $5,0 \times 10^6$ células/mL, 6×10^6 células/mL, 8×10^6 células/mL, ou 10×10^6 células/mL, ou células viáveis das mesmas.

[00424] Em concretizações particulares, a perfusão é realizada em diferentes velocidades durante o cultivo. Por exemplo, em algumas concretizações, quando a taxa da perfusão depende da densidade e/ou concentração das células cultivadas. Em certas concretizações, a taxa de perfusão aumenta quando as células atingem densidade ou concentração estabelecida ou predeterminada. A taxa de perfusão pode mudar, por exemplo, de uma taxa de perfusão constante para uma taxa de perfusão constante aumentada, uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, mais de cinco vezes, mais de dez vezes, mais de 15 vezes, mais de 20 vezes, mais de 25 vezes, mais de 50 vezes ou mais de 100 vezes durante o cultivo. Em algumas concretizações, a taxa de perfusão constante aumenta quando as células atingem uma densidade ou concentração estabelecida ou predeterminada de, de cerca de, ou pelo menos que, ou cerca de $0,6 \times 10^6$ células/mL, $0,8 \times 10^6$ células/mL, 1×10^6 células/mL, $1,2 \times 10^6$ células/mL, $1,4 \times 10^6$ células/mL, $1,6 \times 10^6$ células/mL, $1,8 \times 10^6$ células/mL, $2,0 \times 10^6$ células/mL, $2,5 \times 10^6$ células/mL, $3,0 \times 10^6$ células/mL, $3,5 \times 10^6$ células/mL, $4,0 \times 10^6$ células/mL, $4,5 \times 10^6$ células/mL, $5,0 \times 10^6$ células/mL, 6×10^6 células/mL, 8×10^6 células/mL, ou 10×10^6 células/mL, ou células viáveis da mesma.

[00425] Em algumas concretizações, o cultivo é iniciado sob condições sem perfusão e a perfusão é iniciada quando a densidade ou

concentração das células atinge uma densidade ou concentração estabelecida ou predeterminada. Em algumas concretizações, a perfusão é iniciada em uma taxa, de cerca de, ou pelo menos, ou cerca de 100 mL/dia, 200 mL/dia, 200 mL/dia, 250 mL/dia, 275 mL/dia, 290 mL/dia, 300 mL/dia, 350 mL/dia, 400 mL/dia, 450 mL/dia, 500 mL/dia, 550 mL/dia, 575 mL/dia, 580 mL/dia, 600 mL/dia, 650 mL/dia, 700 mL/dia, 750 mL/dia, 800 mL/dia, 850 mL/dia, 900 mL/dia, 950 mL/dia, 1000 mL/dia, 1100 mL/dia, 1160 mL/dia, 1200 mL/dia, 1400 mL/dia, 1600 mL/dia, 1800 mL/dia, 2000 mL/dia, 2200 mL/dia ou 2400 mL/dia quando a densidade ou concentração das células atinge uma densidade ou concentração estabelecida ou predeterminada. Em algumas concretizações, a perfusão é iniciada quando as células cultivadas atingem uma densidade ou concentração de, de cerca de, ou pelo menos que, ou cerca de $0,1 \times 10^6$ células/mL, $0,2 \times 10^6$ células/mL, $0,4 \times 10^6$ células/mL, $0,6 \times 10^6$ células/mL, $0,8 \times 10^6$ células/mL, 1×10^6 células/mL, $1,2 \times 10^6$ células/mL, $1,4 \times 10^6$ células/mL, $1,6 \times 10^6$ células/mL, $1,8 \times 10^6$ células/mL, $2,0 \times 10^6$ células/mL, $2,5 \times 10^6$ células/mL, $3,0 \times 10^6$ células/mL, $3,5 \times 10^6$ células/mL, $4,0 \times 10^6$ células/mL, $4,5 \times 10^6$ células/mL, $5,0 \times 10^6$ células/mL, 6×10^6 células/mL, 8×10^6 células/mL, ou 10×10^6 células/mL, ou células viáveis da mesma. Em algumas concretizações, a perfusão é realizada quando as células são cultivadas em um volume de, de cerca de, ou pelo menos, ou cerca de 300 mL, 400 mL, 500 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL ou 1000 mL. Em algumas concretizações, o volume é de 1000 mL.

[00426] Em certas concretizações, pelo menos parte do cultivo é realizada com perfusão em uma determinada taxa, e a taxa de perfusão é aumentada para, para cerca de, ou para pelo menos, ou cerca de 100 mL/dia, 200 mL/dia, 250 mL/dia, 275 mL/dia, 290 mL/dia, 300 mL/dia, 350 mL/dia, 400 mL/dia, 450 mL/dia, 500 mL/dia, 500 mL/dia, 550 mL/dia, 575 mL/dia, 580 mL/dia, 600 mL/dia, 650 mL/dia, 700

mL/dia, 750 mL/dia, 800 mL/dia, 850 mL/dia, 900 mL/dia, 900 mL/dia, 950 mL/dia, 1000 mL/dia, 1100 mL/dia, 1160 mL/dia, 1200 mL/dia, 1400 mL/dia, 1600 mL/dia, 1800 mL/dia, 2000 mL/dia, 2000 mL/dia, 2200 mL/dia ou 2400 mL/dia quando a densidade ou concentração das células atinge uma densidade ou concentração estabelecida ou predefinida. Em algumas concretizações, a perfusão é iniciada quando as células cultivadas atingem uma densidade ou concentração de, de cerca de, ou pelo menos que, ou cerca de $0,1 \times 10^6$ células/mL, $0,2 \times 10^6$ células/mL, $0,4 \times 10^6$ células/mL, $0,6 \times 10^6$ células/mL, $0,8 \times 10^6$ células/mL, 1×10^6 células/mL, $1,2 \times 10^6$ células/mL, $1,4 \times 10^6$ células/mL, $1,6 \times 10^6$ células/mL, $1,8 \times 10^6$ células/mL, $2,0 \times 10^6$ células/mL, $2,5 \times 10^6$ células/mL, $3,0 \times 10^6$ células/mL, $3,5 \times 10^6$ células/mL, $4,0 \times 10^6$ células/mL, $4,5 \times 10^6$ células/mL, $5,0 \times 10^6$ células/mL, 6×10^6 células/mL, 8×10^6 células/mL, ou 10×10^6 células/mL, ou células viáveis da mesma.

[00427] Em algumas concretizações, em certas concretizações, o cultivo é iniciado sob condições sem perfusão ou perfusão em uma determinada taxa, e a taxa de perfusão é aumentada para, para cerca de, ou para 750 mL/dia quando a densidade ou concentração das células atinge uma concentração de, de cerca de, ou de pelo menos $0,61 \times 10^6$ células/mL. Em certas concretizações, as células são perfundidas em uma taxa de, de cerca de, ou de pelo menos 750 mL/dia quando a densidade ou concentração das células atinge uma concentração de, de cerca de, ou de pelo menos $0,61 \times 10^6$ células/mL quando as células são cultivadas em um volume de, de cerca de, ou de pelo menos 1000 ml. Em algumas concretizações, a taxa de perfusão é aumentada para, para cerca de, ou para 1500 mL/dia quando a densidade ou concentração das células atinge uma concentração de, de cerca de, ou de pelo menos 2×10^6 células/mL.

[00428] Em alguns aspectos, cultivo com perfusão, como a uma alta

taxa de perfusão, por exemplo, de cerca de, ou pelo menos, ou cerca de 500 mL/dia, 600 mL/dia, 700 mL/dia , 750 mL/dia, 800 mL/dia, 900 mL/dia, 1000 mL/dia, 1100 mL/dia, 1200 mL/dia, 1300 mL/dia, 1400 mL/dia, 1500 mL/dia, 1600 mL/dia , 1700 mL/dia, 1800 mL/dia, 1900 mL/dia, ou 2000 mL/dia melhora a saúde celular, viabilidade, sobrevivência, proliferação, expansão, e/ou função, tal como aumentando e/ou otimizando a disponibilidade de nutrientes para as células, mantendo o pH e/ou minimizando a presença de resíduos celulares.

[00429] Em alguns aspectos, o cultivo com perfusão pode melhorar a remoção e/ou a redução de reagentes residuais do processo. Em certas concretizações, os reagentes do processo residuais podem interferir com e/ou complicar a interpretação de ensaios, medições e/ou testes que são realizados durante ou após o processo. Tais ensaios podem incluir, mas não estão limitados a, medições de esterilidade, endotoxinas, contas residuais, DNA viral, por exemplo, DNA viral competente de replicação, contagens celulares, ensaios de viabilidade, ensaios de saúde celular e ensaios de atividade celular. Em algumas concretizações, taxas mais altas de perfusão eliminam mais reagentes de processo residuais do que taxas mais baixas de perfusão.

[00430] Em algumas concretizações, uma composição de células enriquecidas é cultivada na presença de um tensoativo. Em concretizações particulares, cultivar como células da composição reduz a quantidade de tensão de cisalhamento que pode ocorrer durante o cultivo, por exemplo, devido à mistura, balanço, movimento e/ou perfusão. Em algumas concretizações, um tensoativo é ou inclui um agente que reduz a tensão de superfície de líquidos e/ou sólidos. Por exemplo, um tensoativo inclui um álcool graxo (por exemplo, álcool esterílico), um éter de polioxietileno glicol octilfenol (por exemplo, Triton X-100) ou um éster alquílico de polioxietileno glicol sorbitano (por exemplo, polissorbato 20, 40, 60). Em algumas concretizações, o tensoativo

é ou inclui um tensoativo aniônico, um tensoativo catiônico, um tensoativo zwitteriônico ou um tensoativo não iônico adicionado a ele. Em certas concretizações, o tensoativo é selecionado do grupo que consiste em Polissorbato 80 (PS80), Polissorbato 20 (PS20), Poloxâmero 188 (P188). Em certas concretizações, o tensoativo é poloxâmero, por exemplo, poloxamer 188.

[00431] Em certas concretizações, o cultivo é realizado na ausência de um tensoativo.

[00432] Em concretizações particulares, o cultivo termina quando as células atingem uma quantidade, concentração, e/ou expansão limiar. Em algumas concretizações, o cultivo termina quando as células atingem uma quantidade total limite de células, por exemplo, contagem de células limite. Em algumas concretizações, a contagem celular limite é de, ou é de cerca de, ou é pelo menos que, ou cerca de 50×10^6 células, 100×10^6 células, 200×10^6 células, 300×10^6 células, 400×10^6 células, 600×10^6 células, 800×10^6 células, 1000×10^6 células, 1200×10^6 células, 1400×10^6 células, 1600×10^6 células, 1800×10^6 células, 2000×10^6 células, 2500×10^6 células, 3000×10^6 células, 3500×10^6 células, 5000×10^6 células, 3500×10^6 células, $10,000 \times 10^6$ células, 12.000×10^6 células, 15.000×10^6 células ou 20.000×10^6 células, ou células viáveis da mesma. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é de pelo menos 3500×10^6 células ou 5500×10^6 células. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é menor que cerca de 5500×10^6 células. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é menor que cerca de 3500×10^6 células. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é menor que cerca de 3000×10^6 células. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é de pelo menos 2500×10^6 células. Em algumas con-

cretizações, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é de pelo menos 2000×10^6 células. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é de pelo menos 3000×10^6 células. Em algumas concretizações, a contagem de células de limite é entre, ou de cerca de 3000×10^6 células e cerca de ou 2000×10^6 células. Em concretizações particulares, o cultivo termina quando as células atingem um limiar de contagem de células. Em algumas concretizações, o cultivo termina em, em cerca de, ou dentro de, ou cerca de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, ou 7 dias ou mais, após a contagem celular limite ser atingida. Em concretizações particulares, o cultivo termina em, ou em cerca de, 1 dia após a contagem limiar de células ser alcançada. Em certas concretizações, o cultivo termina entre 18 e 30 horas após a contagem celular limite estar ativa.

[00433] Em concretizações particulares, o cultivo termina quando as células atingem uma densidade ou concentração celular limite. Em algumas concretizações, a densidade ou concentração celular limite para uma composição de saída é de, ou é de cerca de, ou é pelo menos que, ou cerca de 1×10^6 células/mL, 5×10^6 células/mL, 10×10^6 células/mL, 15×10^6 células/mL, 20×10^6 células/mL, 25×10^6 células/mL, 30×10^6 células/mL, 35×10^6 células/mL, 40×10^6 células/mL, 45×10^6 células/mL, 50×10^6 células/mL, 55×10^6 células/mL, 60×10^6 células/mL, 65×10^6 células/mL, 70×10^6 células/mL, 75×10^6 células/mL, 80×10^6 células/mL, 85×10^6 células/mL, 90×10^6 células/mL, 95×10^6 células/mL, 100×10^6 células/mL, ou células viáveis da mesma. Em algumas concretizações, a densidade ou concentração celular limite média ou mediana para uma pluralidade de composições de saída é de, ou é de cerca de, ou é pelo menos que, ou cerca de 1×10^6 células/mL, 5×10^6 células/mL, 10×10^6 células/mL, 15×10^6 células/mL, 20×10^6 células/mL, 25×10^6 células/mL, 30×10^6 cé-

lulas/mL, 35×10^6 células/mL, 40×10^6 células/mL, 45×10^6 células/mL, 50×10^6 células/mL, 55×10^6 células/mL, 60×10^6 células/mL, 65×10^6 células/mL, 70×10^6 células/mL, 75×10^6 células/mL, 80×10^6 células/mL, 85×10^6 células/mL, 90×10^6 células/mL, 95×10^6 células/mL, 100×10^6 células/mL, ou células viáveis da mesma.

[00434] Em concretizações particulares, cerca de um dia ou cerca de 24 horas antes das células obterem a quantidade, concentração, e/ou expansão limite (por exemplo, antes que as células atinjam um valor total de células, por exemplo, contagem de células de limiar), a quantidade total de células é de, ou é de cerca de, ou é pelo menos que, ou cerca de 50×10^6 células, 100×10^6 células, 200×10^6 células, 300×10^6 células, 400×10^6 células, 600×10^6 células, 800×10^6 células, 1000×10^6 células, 1200×10^6 células, 1400×10^6 células, 1600×10^6 células, 1800×10^6 células, 2000×10^6 células, 2500×10^6 células, 3000×10^6 células, 3500×10^6 células, 5000×10^6 células, 3500×10^6 células, 10.000×10^6 células, 12.000×10^6 células, 15.000×10^6 células ou 20.000×10^6 células, ou células viáveis do mesmo. Em algumas concretizações, cerca de um dia ou cerca de 24 horas antes das células atingirem uma contagem celular limite, a quantidade total de células é entre, ou cerca de 100×10^6 células e cerca de 4000×10^6 células. Em algumas concretizações, cerca de um dia ou cerca de 24 horas antes das células atingirem a contagem celular limite, a quantidade total de células é menor que, ou de cerca de 3000×10^6 células. Em algumas concretizações, cerca de um dia ou cerca de 24 horas antes das células atingirem a contagem celular limite, a quantidade total de células é entre, ou de cerca de 500×10^6 células e cerca de 1500×10^6 células. Em algumas concretizações, cerca de um dia ou cerca de 24 horas antes das células atingirem a contagem celular limite, a quantidade total de células é entre, ou de cerca de 500×10^6 células e cerca de 1000×10^6 células. Em algumas concretizações, cerca de um dia ou

cerca de 24 horas antes das células atingirem a contagem celular limite, a quantidade total de células é, ou é, aproximadamente ou é menos que 900×10^6 células .

[00435] Em concretizações particulares, a contagem de células limite é de, ou é de cerca de, ou é pelo menos que, ou cerca de 1000×10^6 células, 1200×10^6 células, 1400×10^6 células, 1600×10^6 células, 1800×10^6 células, 2000×10^6 células, 2500×10^6 células, 3000×10^6 células, 3500×10^6 células, ou células viáveis das mesmas, enquanto que cerca de um dia ou cerca de 24 horas antes das células atingirem a contagem celular limite, a quantidade total de células é de, ou é de cerca de, ou é menor que 100×10^6 células, 200×10^6 células, 300×10^6 células, 400×10^6 células, 600×10^6 células, 800×10^6 células, 1000×10^6 células, 1200×10^6 células, 1400×10^6 células ou 1600×10^6 células, células viáveis das mesmas. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é entre, ou de cerca de 2000×10^6 células e cerca de 3000×10^6 células, ou células viáveis das mesmas, enquanto um, cerca de um dia ou um, ou cerca de 24 horas antes de as células atingirem a contagem celular limite, a quantidade total de células é entre, aproximadamente 500×10^6 células ou aproximadamente 1500×10^6 células, ou células viáveis das mesmas. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é de, ou de cerca de 2500×10^6 células, ou células viáveis, enquanto que cerca de um dia ou cerca de 24 horas antes das células atingirem uma contagem celular limite, a quantidade total de células é de, ou de cerca de 900×10^6 células, ou células viáveis do mesmo.

[00436] Em algumas concretizações, a etapa de cultivo é realizada durante o período de tempo requerido para que as células atinjam um valor, densidade e/ou expansão limite. Em algumas concretizações, o cultivo é realizado durante, ou durante cerca de, ou durante menos que, ou cerca de, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48

horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 2 dias, aproximadamente. 3 dias 4 dias, 5 dias, 5,5 dias, 6 dias, 7 dias, 7,5 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas. Em concretizações particulares, o período médio de tempo requerido para as células de uma pluralidade de composições separadas de células T enriquecidas que foram isoladas, enriquecidas e/ou selecionadas de diferentes amostras biológicas atingirem a densidade limiar é de, é de cerca de, ou é menor que, ou de cerca de 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 2 dias, 3 dias 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas. Em certas concretizações, o período médio de tempo requerido para as células de uma pluralidade de composições separadas de células T enriquecidas e/ou selecionadas de diferentes amostras biológicas para atingir o limite de densidade é, é sobre, ou é inferior a, ou cerca de 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 2 dias, 3 dias 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas.

[00437] Em algumas concretizações, o cultivo termina quando as células atingem uma quantidade total limite de células, por exemplo, contagem celular limite, de cerca de 5500×10^6 células, e o período de tempo requerido para as células atingirem a quantidade limite desde o início do cultivo é entre cerca de 6 dias e cerca de 7 dias ou entre 6 dias e 7 dias.

[00438] Em algumas concretizações, o cultivo termina (por exemplo, quando as células estão prontas para a colheita) quando as células atingem uma quantidade total limite de células, por exemplo, contagem celular limite de, ou de cerca de 5500×10^6 células. Em algumas concretizações, um dia, ou cerca de um dia ou de, ou cerca de 24 horas antes das células atingirem a quantidade limite de células, por

exemplo, contagem celular limite, a quantidade total de células é de, ou de cerca de 3000×10^6 células. Em algumas concretizações, a quantidade total de células é de, ou de cerca de 3000×10^6 células no dia anterior, quando as células atingem o limite de contagem de células de, ou de cerca de 5500×10^6 células. Em algumas concretizações, o período de tempo requerido para que as células atinjam o valor limite desde o início do cultivo é entre, aproximadamente 6 dias e cerca de 10 dias ou entre 6 dias e 10 dias, tal como, cerca de 7 dias e cerca de 10 dias ou entre 7 dias e 10 dias. Em algumas concretizações, a média de tempo requerido para as células atingirem o valor limite desde o início do cultivo é de, ou de cerca de 8 dias ou é de 8 dias.

[00439] Em algumas concretizações, o cultivo termina quando as células atingem uma quantidade total limite de células, por exemplo, contagem celular limite, de, ou de cerca de 2000×10^6 células, ou cerca de 2500×10^6 células, ou a, ou cerca de 3000×10^6 células, e o período de tempo requerido para que as células atinjam o valor limite desde o início do cultivo é entre, ou cerca de 4 dias e aproximadamente 5 dias, ou cerca de 5 dias, ou 5 dias. Em algumas concretizações, a contagem de células limite é entre, ou cerca de 3000×10^6 células e cerca de 2000×10^6 células e o período de tempo requerido para as células atingirem a quantidade limite desde o início do cultivo é entre, cerca de 4 dias e cerca de 5 dias, cerca de 5 dias ou 5 dias.

[00440] Em algumas concretizações, o cultivo termina (por exemplo, quando as células estão prontas para a colheita) quando as células atingem uma quantidade total limite de células, por exemplo, contagem celular limite, de cerca de 2500×10^6 células. Em algumas concretizações, um dia, ou cerca de um dia, ou 24 horas, ou cerca de 24 horas antes das células atingirem a quantidade limite de células, por exemplo, contagem celular limite, a quantidade total de células é de, ou de cerca de 900×10^6 células. Em algumas concretizações, a quan-

tidade total de células é de, ou cerca de 900×10^6 células no dia anterior ao dia em que as células atingem a contagem celular limite ^{de}, ou de cerca de 2500×10^6 células. Em algumas concretizações, o período de tempo requerido para que as células atinjam o valor limite desde o início do cultivo é entre, ou de cerca de 6 dias e, aproximadamente, 9 dias ou entre 6 dias e 9 dias. Em algumas concretizações, o período de tempo requerido para as células atingirem o valor limite desde o início do cultivo é entre, aproximadamente 5 dias e cerca de 9 dias ou entre 5 dias e 9 dias. Em algumas concretizações, a média de tempo requerido para as células atingirem o valor limite desde o início do cultivo é de, ou de cerca de 7 dias ou é de 7 dias.

[00441] Em algumas concretizações, o cultivo é realizado por pelo menos um período mínimo de tempo. Em algumas concretizações, o cultivo é realizado por pelo menos 14 dias, pelo menos 12 dias, pelo menos 10 dias, pelo menos 7 dias, pelo menos 6 dias, pelo menos 5 dias, pelo menos 4 dias, pelo menos 3 dias, pelo menos 2 dias, pelo menos 36 horas, pelo menos 24 horas, pelo menos 12 horas ou pelo menos 6 horas, mesmo que o limite seja atingido antes da quantidade mínima de tempo. Em algumas concretizações, o tempo mínimo é de, ou de cerca de 7 dias, 8 dias, 9 dias ou 10 dias. Em certas concretizações, o tempo mínimo é de 8 dias.

[00442] Em certas concretizações, o cultivo é realizado por pelo menos um período mínimo de tempo. Em certas concretizações, o cultivo é realizado até, até cerca de, ou até pelo menos 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias ou 13 dias se passarem desde o começo ou início da incubação sob reagentes estimulatórios, por exemplo, a partir de quando as células são contatadas com o reagente estimulatório; a partir de quando as células e/ou composições de células, por exemplo, CD4+ e CD8+ células, são misturadas para gerar a composição de entrada.

[00443] Em certas concretizações, as células cultivadas são células de saída. Em algumas concretizações, uma composição de células T enriquecidas que foi cultivada é uma composição de saída de células T enriquecidas. Em concretizações particulares, as células T CD4 + e/ou células T CD8 + que foram cultivadas são células T CD4 + e/ou CD8+.

[00444] Em certas concretizações, como as células são colhidas antes de, antes de cerca de, ou antes de pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis, oito, dez, vinte, ou mais duplicações celulares da população celular, por exemplo, duplicações que ocorrem durante o cultivo ou expansão. Em concretizações particulares, a quantidade de duplicações celulares pode ser calculada medindo o número de células viáveis em uma população em diferentes momentos, tal como em diferentes momentos ou estágios do processo de cultivo ou expansão. Em particular concretização, a duplicações celulares pode ser calculada comparando a quantidade total de células viáveis em um ponto no tempo com o número total de células viáveis presentes em um momento anterior. Em certas concretizações, o cultivo ou expansão é concluído antes de, de cerca de, ou de pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis, oito, dez, vinte ou mais duplicações celulares da população celular, por exemplo, duplicações que ocorrem durante o cultivo ou expansão. Em certos aspectos, a duplicação celular é calculada determinando o número total de células nucleadas (TNC) quando o cultivo ou expansão é iniciado e quando o cultivo ou expansão é concluído e, em seguida, determinando o log natural do produto do TNC na conclusão dividido pelo TNC no início e depois dividindo o referido log natural do produto pelo log natural de 2.

[00445] Em várias concretizações, as células são coletadas ou colhidas antes das células da população de entrada terem dobrado mais de três, duas ou uma vez. Em alguns aspectos, reduzir a duplicação

que pode ocorrer durante um processo de cultivo ou expansão aumentará, em algumas concretizações, a porção de células T modificadas que são ingênuas e/ou de um fenótipo de memória, tal como um fenótipo de memória central. Em algumas concretizações, aumentar a duplicação durante um processo de cultivo ou expansão aumenta a diferenciação de células T que pode ocorrer durante o processo de cultivo ou expansão. Em alguns aspectos, é contemplado que, para um processo de geração ou produção de composições de células modificadas, reduzir a expansão ou duplicações celulares que ocorrem durante o processo, por exemplo, durante o cultivo ou expansão, aumenta a quantidade ou porção de células T virgens e/ou células T de um fenótipo de memória, tal como um fenótipo de memória central, da composição de célula modificada resultante. Em aspectos particulares, o aumento da expansão ou duplicações celulares que ocorrem durante o processo aumenta a quantidade ou porção de células T diferenciadas da composição de célula modificada resultante. Em alguns aspectos, é contemplado que o processo, tais como os processos aqui fornecidos, que aumentam ou ampliam a porção de células virgens e/ou células T de um fenótipo de memória, tal como um fenótipo de memória central, na composição de célula modificada resultante pode aumentar a potência, eficácia e persistência, por exemplo, *in vivo* após administração, da composição de células modificadas.

[00446] Em alguns aspectos, o número de duplicações que n em uma população é determinado usando a seguinte fórmula:

1) *Duplicações celulares*

$$= \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ na colheita}}{TNC \text{ 3 dias após a ativação}}\right)}{\ln 2}, 0$$

. Em certas concretizações, a duplicação da população de uma composição celular determinada usando a fórmula é de, ou é de cerca de, ou é maior que, ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população

média de uma pluralidade de composições celulares é de, ou de cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é entre cerca de 3,0 e cerca de 9,0, ou entre cerca de 5 e cerca de 7,5.

[00447] Em alguns aspectos, o número de duplicações que ocorrem em uma população é determinado usando a seguinte fórmula:

$$2) \text{ Duplicações celulares} = \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ na colheita}}{TNC \text{ no início da estimulação}}\right)}{\ln 2}$$

. Em certas concretizações,

a duplicação da população de uma composição celular determinada usando a fórmula é de, ou é de cerca de, ou é maior que, ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é de, ou de cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação da população média de uma pluralidade de composições celulares é entre cerca de 3,0 e cerca de 9,0, ou entre cerca de 5 e cerca de 7,5.

[00448] Em certas concretizações, o número de duplicações que ocorrem em uma população é determinado aplicando a seguinte fórmula:

$$3) \text{ Duplicações celulares} = \frac{\ln\left(\frac{TNC \text{ na colheita}}{TNC \text{ após a estimulação}}\right)}{\ln 2}$$

. Em certas concretiza-

ções, a duplicação da população de uma composição celular determinada usando a fórmula é de, ou é de cerca de, ou é maior que, ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é de, ou de cerca

de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação da população média de uma pluralidade de composições celulares é entre cerca de 3,0 e cerca de 9,0, ou entre cerca de 5 e cerca de 7,5.

[00449] Em várias concretizações, o número de duplicações que ocorrem em uma população é determinado aplicando a seguinte fórmula:

4)
$$\text{Duplicações Celulares} = \frac{\ln\left(\frac{\text{TNC na colheita}}{\text{TNC na transdução}}\right)}{\ln 2}$$
 . Em certas concretizações, a duplicação da população de uma composição celular determinada usando a fórmula é de, ou é de cerca de, ou é maior que, ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é de, ou de cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação da população média de uma pluralidade de composições celulares é entre cerca de 3,0 e cerca de 9,0, ou entre cerca de 5 e cerca de 7,5.

[00450] Em concretizações particulares, o número de duplicações que ocorrem em uma população é determinado aplicando a seguinte fórmula:

5)
$$\text{Duplicações celulares} = \frac{\ln\left(\frac{\text{TNC na colheita}}{\text{TNC no início do cultivo ou expansão}}\right)}{\ln 2}$$
 . Em certas concretizações, a duplicação da população de uma composição celular determinada usando a fórmula é de, ou é de cerca de, ou é maior que, ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é de, ou de cerca de 2,0,

2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é entre cerca de 3,0 e cerca de 9,0, ou entre cerca de 5 e cerca de 7,5.

[00451] Em certas concretizações, o cultivo ou expansão é concluído antes do número total de células, por exemplo, número total de células cultivadas ou células submetidas à expansão, ser maior que, ou que cerca de um, dois, três, quatro, cinco, seis, oito, dez, vinte ou mais de vinte vezes o número de células da população de entrada, por exemplo, o número total de células que foram contatadas com o reagente estimulatório. Em certas concretizações, o cultivo ou expansão é concluído antes do número total de células, por exemplo, número total de células cultivadas ou células submetidas à expansão, ser de, ou ser de cerca de, ou ser maior que, ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes o número de células da população de entrada, por exemplo, o número total de células que foram contatadas com o reagente estimulatório. Em várias concretizações, o cultivo ou expansão é concluído antes que o número total de células cultivadas seja maior que, ou que cerca de uma, duas, três, quatro, cinco, seis, oito, dez, vinte, ou mais de vinte vezes o número total de células que foram transformadas, transduzidas ou espi-noculadas, por exemplo, o número total de células que foram contatadas com um vetor viral. Em certas concretizações, o cultivo ou expansão é concluído antes do número total de células, por exemplo, número total de células cultivadas ou células submetidas à expansão, ser de, ou ser de cerca de, ou ser maior que, ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0 vezes o número total de células que foram transformadas, transduzidas ou espi-noculadas, por exemplo, o número total de células que foram contatadas com um vetor viral. Em certas concretizações, a duplicação da

população de uma composição celular é de, ou é de cerca de, ou é maior que ou que cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é de, ou de cerca de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 ou 10,0. Em certas concretizações, a duplicação de população média de uma pluralidade de composições celulares é entre cerca de 3,0 e cerca de 9,0, ou entre cerca de 5 e cerca de 7,5. Em certas concretizações, as células são células T, células viáveis T, células T CD3 +, células T CD4, células T CD8 +, células T expressando CAR, ou uma combinação de qualquer um dos itens anteriores.

[00452] Em concretizações particulares, quando o cultivo termina, as células em uma composição de saída atingem uma densidade ou concentração celular de, ou de cerca de, ou células em uma pluralidade de composições de saída atingem uma densidade ou concentração celular média ou mediana de, ou de cerca de, 1×10^6 células/mL, 5×10^6 células/mL, 10×10^6 células/mL, 15×10^6 células/mL, 20×10^6 células/mL, 25×10^6 células/mL, 30×10^6 células/mL, 35×10^6 células/mL, 40×10^6 células/mL, 45×10^6 células/mL, 50×10^6 células/mL, 55×10^6 células/mL, 60×10^6 células/mL, 65×10^6 células/mL, 70×10^6 células/mL, 75×10^6 células/mL, 80×10^6 células/mL, 85×10^6 células/mL, 90×10^6 células/mL, 95×10^6 células/mL, 100×10^6 células/mL, ou células viáveis das mesmas. Em concretizações particulares, quando o cultivo termina, as células em uma composição de saída atingem uma densidade ou concentração celular, ou as células em uma pluralidade de composições de saída atingem uma densidade ou concentração média ou mediana de células, entre ou entre cerca de 15×10^6 células/mL e cerca de 45×10^6 células/mL, entre ou entre 20×10^6 células/mL e cerca de 40×10^6 células/mL, aproximadamente como 21×10^6 células/mL, 22×10^6 células/mL, 23×10^6 células/mL, 24×10^6 célu-

las/mL, 25×10^6 células/mL, $2^6 \times 10^6$ células/mL, 27×10^6 células/mL, 28×10^6 células/mL, 29×10^6 células/mL, 30×10^6 células/mL, 31×10^6 células/mL, 32×10^6 células/mL, 33×10^6 células/mL, 34×10^6 células/mL, 35×10^6 células/mL, $3^6 \times 10^6$ células/mL, 37×10^6 células/mL, 38×10^6 células/mL, 38×10^6 células/mL, ou 39×10^6 células/mL. Em algumas concretizações, a densidade ou concentração média ou mediana de células é entre cerca de 30×10^6 células/mL e cerca de 40×10^6 células/mL, entre cerca de 15×10^6 células/mL e cerca de 25×10^6 células/mL, entre cerca de 35×10^6 células/mL e cerca de 40×10^6 células/mL, ou entre cerca de 20×10^6 células/mL e cerca de 25×10^6 células/mL.

Monitoramento de Células durante o Cultivo

[00453] Em algumas concretizações, as células são monitoradas durante a etapa de cultivo. O monitoramento pode ser realizado, por exemplo, para determinar (por exemplo, medir, quantificar) a morfologia celular, viabilidade celular, morte celular, e/ou concentração celular (por exemplo, concentração celular viável, contagem celular viável). Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado manualmente, tal como por um operador humano. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado por um sistema automatizado. O sistema automatizado pode requerer um mínimo ou nenhuma entrada manual para monitorar as células cultivadas. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado tanto manualmente quanto por um sistema automatizado.

[00454] Em certas concretizações, as células são monitoradas por um sistema automatizado que não requer entrada manual. Em algumas concretizações, o sistema automatizado é compatível com um biorreator, por exemplo, um biorreator como descrito aqui, de modo que as células em cultivo possam ser removidas do biorreator, monitoradas e subsequentemente retornadas ao biorreator. Em algumas

concretizações, o monitoramento e o cultivo ocorrem em uma configuração de circuito fechado. Em alguns aspectos, em uma configuração de circuito fechado, o sistema automatizado e o biorreator permanecem estéreis. Em concretizações, o sistema automatizado é estéril. Em algumas concretizações, o sistema automatizado é um sistema em linha.

[00455] Em algumas concretizações, o sistema automatizado inclui o uso de técnicas ópticas (por exemplo, microscopias) para detecção de morfologia celular, viabilidade celular, morte celular e/ou concentração celular (por exemplo, concentração de células viáveis, contagem de células viáveis. Qualquer técnica óptica adequada para determinar, por exemplo, características celulares, viabilidade e concentração e contagem são contempladas aqui. Exemplos não limitativos de técnicas ópticas úteis incluem microscopia de campo brilhante, microscopia por fluorescência, microscopia por contraste interferência diferencial, microscopia por contraste de fase, microscopia por holografia digital (DHM), microscopia por holografia digital diferencial (DDHM) ou uma combinação das mesmas. Microscopias por holografia digital diferencial, DDHM e DHM diferencial podem ser usadas aqui de forma alternadamente. Em certas concretizações, o sistema automatizado inclui um microscópio de holografia digital diferencial. Em certas concretizações, o sistema automatizado inclui um microscópio de holografia digital diferencial, incluindo recursos de iluminação (por exemplo, laser, led). Descrições de metodologia e uso de DDHM podem ser encontradas, por exemplo, nas US 7.362.449; EP 1.631.788; US 9.904.248; e US 9.684.281, que são incorporadas aqui por referência na sua totalidade.

[00456] O DDHM permite imageamento não destrutivo e sem rótulo de células, resultando em imagens holográficas de alto contraste. As imagens podem sofrer segmentação objeto e análise adicional para

obter uma pluralidade de aspectos morfológicos que descrevem quantitativamente os objetos imageados (por exemplo, células cultivadas, detritos celulares). Como tal, vários aspectos (por exemplo, morfologia celular, viabilidade celular, concentração celular, contagem celular) podem ser diretamente avaliados ou calculados de DDHM usando, por exemplo, as etapas de aquisição de imagem, processamento de imagem, segmentação de imagem e extração de característica. Em algumas concretizações, o sistema automatizado inclui um dispositivo de gravação digital para gravar imagens holográficas. Em algumas concretizações, o sistema automatizado inclui um computador, incluindo algoritmos para análise de imagens holográficas. Em algumas concretizações, o sistema automatizado inclui um monitor e/ou computador para exibir os resultados da análise de imagem holográfica. Em algumas concretizações, a análise é automatizada (isto é, capaz de ser executada na ausência de entrada do usuário). Um exemplo de um sistema automatizado adequado para monitorar células durante a etapa de cultivo inclui, mas não está limitado a, Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, Bruxelas, Bélgica).

[00457] Em certas concretizações, o monitoramento é realizado continuamente durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado em tempo real durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado em momentos distintos durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 15 minutos durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 30 minutos durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 45 minutos durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada hora pela duração da etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o moni-

toramento é realizado pelo menos a cada 2 horas pela duração da etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 4 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 6 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 8 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 10 horas pela duração da etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 12 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 14 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 16 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 18 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 20 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos a cada 22 horas durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez ao dia durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada dois dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada três dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada quatro dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada cinco dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada seis dias, durante o período da etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada sete

dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada oito dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada nove dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez a cada dez dias durante a etapa de cultivo. Em algumas concretizações, o monitoramento é realizado pelo menos uma vez durante a etapa de cultivo.

[00458] Em algumas concretizações, as características das células que podem ser determinadas pelo monitoramento, incluindo técnicas ópticas como DHM ou DDHM, incluem viabilidade celular, concentração celular, número de células e/ou densidade celular. Em algumas concretizações, a viabilidade celular é caracterizada ou determinada. Em algumas concretizações, a concentração, densidade e/ou número celular é caracterizado ou determinado. Em algumas concretizações, concentração de células viáveis, número de células viáveis e/ou densidade de células viáveis é/são caracterizados ou determinados. Em algumas concretizações, as células cultivadas são monitoradas pelo sistema automatizado até que um limiar de expansão seja atingido, como descrito acima. Em algumas concretizações, uma vez atingido um limiar de expansão, as células cultivadas são colhidas, tal como por métodos automáticos ou manuais, por exemplo, por um operador humano. O limiar de expansão pode depender da concentração total, densidade e/ou número de células cultivadas determinados pelo sistema automatizado. Alternativamente, o limiar de expansão pode depender da concentração, densidade e/ou número de células viáveis. Número e contagem podem ser usados aqui alternadamente.

[00459] Em algumas concretizações, as células colhidas são formuladas como descrito, tal como na presença de um carreador farmacêuticamente aceitável. Em algumas concretizações, as células colhidas

são formuladas na presença de um crioprotetor.

E. Formulação das células

[00460] Em algumas concretizações, uma ou mais etapas do processo (por exemplo, realizadas na câmara centrífuga e/ou sistema fechado) para a fabricação, geração ou produção de uma terapia celular e/ou células modificadas podem incluir a formulação de células, tal como formulação de células geneticamente modificadas resultantes das etapas de processamento de transdução fornecidas antes ou após a cultura, por exemplo, cultivo e expansão, e/ou uma ou mais outras etapas de processamento, conforme descrito. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos associados com a formulação de células incluem o processamento de células transduzidas, tais como células transduzidas e/ou expandidas usando as etapas de processamento descritas acima, em um sistema fechado.

[00461] Em algumas concretizações, o reagente estimulatório é removido e/ou separado das células antes da formulação. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido e/ou separado das células após o cultivo. Em certas concretizações, o agente estimulatório é removido e/ou separado das células subsequente ao cultivo e antes da formulação das células cultivadas, por exemplo, sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão. Em certas concretizações, o reagente estimulatório é um reagente estimulatório descrito aqui, por exemplo, na Seção I-B-1. Em concretizações particulares, o reagente estimulatório é removido e/ou separado das células como aqui descrito, por exemplo, na Seção I-B-2.

[00462] Em algumas concretizações, as células são formuladas entre 0 dias e 10 dias, entre 0 e 5 dias, entre 2 dias e 7 dias, entre 0,5 dias e 4 dias, ou entre 1 dia e 3 dias, após a contagem, densidade e/ou expansão celular limiar ter sido alcançada durante o cultivo. Em certas concretizações, as células são formuladas em, ou em ou em

cerca de ou dentro de ou a, ou cerca de ou dentro de 12 horas, 18 horas, 24 horas, 1 dia, 2 dias ou 3 dias após a contagem, densidade e/ou expansão celular limite ser alcançada durante o cultivo. Em algumas concretizações, como as células são formuladas dentro de, ou dentro de cerca de 1 dia após a contagem, densidade e/ou expansão celular limite ter sido alcançada durante o cultivo.

[00463] Em algumas concretizações, os métodos selecionados para a fabricação, geração ou produção de uma terapia celular e/ou células modificadas podem incluir a formulação de células, tal como a formulação de células geneticamente modificadas resultantes das etapas de processamento fornecidas antes ou após a incubação, modificação, e cultivo, e/ou uma ou mais outras etapas de processamento, como descrito. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos associados com a formulação de células incluem o processamento de células transduzidas, tais como células transduzidas e/ou expandidas usando as etapas de processamento descritas acima, em um sistema fechado. Em algumas concretizações, a dose de células que compreende células modificadas com um receptor de antígeno recombinante, por exemplo, CAR ou TCR, é fornecida como uma composição ou formulação, tal como uma composição ou formulação farmacêutica. Tais composições podem ser usadas de acordo com os métodos definidos, tal como na prevenção ou tratamento de doenças, condições e distúrbios, ou nos métodos de detecção, diagnósticos e prognósticos.

[00464] Em alguns casos, as células são processadas em uma ou mais etapas (por exemplo, realizadas na câmara centrífuga e/ou sistema fechado) para fabricar, gerar ou produzir uma terapia celular e/ou células modificadas podem incluir formulação de células, tal como a formulação de células geneticamente modificadas resultantes das etapas de processamento de transdução fornecidas antes ou após a cultura, por exemplo, cultivo e expansão, e/ou uma ou mais outras etapas

de processamento, conforme descrito. Em alguns casos, as células podem ser formuladas em uma quantidade para administração de dosagens, tal como para uma única administração de dosagem unitária ou administração de dosagens múltiplas. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos associados com a formulação de células incluem o processamento de células transduzidas, tais como células transduzidas e/ou expandidas usando as etapas de processamento descritas acima, em um sistema fechado.

[00465] Em certas concretizações, uma ou mais composições de células T enriquecidas são formuladas. Em concretizações particulares, uma ou mais composições de células T enriquecidas são formuladas após as referidas uma ou mais composições terem sido modificadas e/ou cultivadas. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais composições são composições de entrada. Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais composições de entrada foram previamente criocongeladas e armazenadas, e são descongeladas antes da incubação.

[00466] Em certas concretizações, as células formuladas são células de saída. Em algumas concretizações, uma composição formulada de células T enriquecidas é uma composição de saída de células T enriquecidas. Em concretizações particulares, as células T CD4+ formuladas e as células T CD8+ formuladas são as células T CD4+ e CD8+ de saída. Em concretizações particulares, uma composição celular formulada, por exemplo, uma composição formulada de células CD4+ e CD8+ enriquecidas, é uma composição celular de saída, por exemplo, uma composição celular de células CD4+ e CD8+ enriquecidas.

[00467] Em algumas concretizações, as células podem ser formuladas em um recipiente, como uma bolsa ou frasco. Em algumas concretizações, as células são formuladas entre 0 dias e 10 dias, entre 0 e 5

dias, entre 2 dias e 7 dias, entre 0,5 dias e 4 dias, ou entre 1 dia e 3 dias após a contagem, densidade e expansão celular limite terem sido atingidas durante o cultivo. Em certas concretizações, as células são formuladas em, ou em ou cerca de, ou dentro de 12 horas, 18 horas, 24 horas, 1 dia, 2 dias ou 3 dias após a contagem, densidade e/ou expansão celular limite ser sido alcançada durante o cultivo. Em algumas concretizações, as células são formuladas dentro de, ou dentro de cerca de 1 dia após a contagem, densidade e/ou expansão celular limite ter sido alcançada durante o cultivo.

[00468] Em certas concretizações, as células são cultivadas durante uma duração ou período de tempo mínimo, por exemplo, de modo que as células sejam colhidas em um estado menos ativado do que se fossem formuladas em um período anterior durante o cultivo, independentemente de quando o limite é atingido. Em algumas concretizações, as células são cultivadas entre 0 dia e 3 dias, por exemplo, entre 0 e 3 dias, entre 1 e 2 dias, em ou em cerca de 1 dia, em ou em cerca de 2 dias, ou em ou em cerca de 3 dias, após a contagem, densidade e/ou expansão celular limite ter sido atingida durante o cultivo. Em certas concretizações, as células ativam a contagem, densidade e/ou expansão celular limiar e permanecem cultivadas por um tempo ou duração mínima antes da formulação. Em algumas concretizações, as células que atingiram o limiar não são formuladas até que tenham sido cultivadas por uma duração ou período mínimo, como um tempo ou duração mínima entre 1 dia e 14 dias, 2 dias e 7 dias, 3 dias e 6 dias, ou um tempo ou duração mínima do cultivo de 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou mais de 7 dias. Em algumas concretizações, o tempo ou duração mínima do cultivo é entre 3 e 6 dias.

[00469] Em algumas concretizações, as células são formuladas em um tampão farmacologicamente aceitável, que podem, em alguns aspectos, incluir um carreador ou excipiente farmacologicamente aceitá-

vel. Em algumas concretizações, o processamento inclui a troca de um meio em um meio ou tampão de formulação que é farmacologicamente aceitável ou desejado para administração a um indivíduo. Em algumas concretizações, as etapas de processamento podem envolver a lavagem das células transduzidas e/ou expandidas para substituir as células em um tampão farmacologicamente aceitável que pode incluir um ou mais carreadores ou excipientes farmacologicamente aceitáveis opcionais. Exemplos de tais formas farmacêuticas, incluindo carreadores ou excipientes farmacologicamente aceitáveis, podem ser quaisquer dos descritos abaixo em conjunto com formas aceitáveis para administrar as células e composições a um indivíduo. A composição farmacêutica em algumas concretizações contém como células em quantidades eficazes para tratar ou prevenir uma doença ou condição, tal como uma quantidade terapêuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz.

[00470] Um "veículo farmacologicamente aceitável" refere-se a um ingrediente em uma formulação farmacêutica, que não seja um ingrediente ativo, que não seja tóxico para um indivíduo. Um carreador farmacologicamente aceitável inclui, mas não está limitado a, um tampão, excipiente, estabilizante ou conservante.

[00471] Em alguns aspectos, a escolha do carreador é determinada em parte pela célula particular e/ou pelo método de administração. Por conseguinte, existe uma variedade de formulações adequadas. Por exemplo, a composição farmacêutica pode conter conservantes. Conservantes adequados podem incluir, por exemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sódio e cloreto de benzalcônio. Em alguns aspectos, é utilizada uma mistura de dois ou mais conservantes. O conservante ou misturas do mesmo estão tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 2% em peso da composição total. Carreadores são descritos, por exemplo, pela Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

Os carreadores farmacologicamente aceitáveis são geralmente não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas e incluem, mas não estão limitados a: tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabeno tal como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tal como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons formadores de sal tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tal como polietileno glicol (PEG).

[00472] Agentes de tamponamento em alguns aspectos estão incluídos nas composições. Os agentes tamponantes adequados incluem, por exemplo, ácido cítrico, citrato de sódio, ácido fosfórico, fosfato de potássio e vários outros ácidos e sais. Em alguns aspectos, é utilizada uma mistura de dois ou mais agentes tamponantes. O agente de tamponamento ou misturas dos mesmos estão tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 4% em peso da composição total. São conhecidos métodos para a preparação de composições farmacêuticas administráveis. Métodos exemplares são descritos em maiores detalhes, por exemplo, em Remington: The Science and Practice de Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21^a. ed. (1 de maio de 2005).

[00473] As formulações podem incluir soluções aquosas. A formulação ou composição pode também conter mais de um ingrediente ativo úteis para a indicação, doença ou condição particular a ser tratada com as células, preferivelmente aquelas com atividades complementares às células, onde as respectivas atividades não afetam adversamente uma à outra. Tais ingredientes ativos estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido. Desse modo, em algumas concretizações, a composição farmacêutica também inclui outros agentes ou fármacos farmacologicamente ativos, tais como quimioterápicos, por exemplo, asparaginase, bussulfano, carboplatina, cisplatina, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracils, gencitabina, hidroxureia, metotrexato, paclitaxel, rituximabe, vinblastina e/ou vincristina.

[00474] As composições em algumas concretizações são fornecidas como preparações líquidas estéreis, por exemplo, soluções aquosas isotônicas, suspensões, emulsões, dispersões ou composições viscosas, que em alguns aspectos podem ser tamponadas para um pH selecionado. As composições líquidas podem compreender carreadores, que podem ser um solvente ou meio dispersante contendo, por exemplo, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido) e misturas adequadas dos mesmos. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando as células em um solvente, como em mistura com um carreador, diluente ou excipiente adequado, tais como água estéril, solução salina fisiológica, glicose, dextrose ou similares. As composições podem conter substâncias auxiliares tais como agentes umectantes, dispersantes ou emulsificantes (por exemplo, metilcelulose), agentes de tamponamento de pH, aditivos que realçam a gelificação ou a viscosidade, conservantes, agentes aromatizantes e/ou corantes, dependendo da via de administração e da preparação

desejada. Em alguns aspectos, textos padrões podem ser consultados para preparar as preparações adequadas.

[00475] Vários aditivos que realçam a estabilidade e esterilidade das composições, incluindo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e tampões, podem ser adicionados. A prevenção da ação de microrganismos pode ser assegurada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol e ácido sórbico. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pelo uso de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00476] Em algumas concretizações, o tampão da formulação contém um crioconservante. Em algumas concretizações, a célula é formulada com uma solução crioconservante que contém solução de 1,0% a 30% de DMSO, tal como uma solução de 5% a 20% de DMSO ou uma solução de 5% a 10% de DMSO. Em algumas concretizações, a solução de criopreservação é ou contém, por exemplo, PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina sérica humana (HSA) ou outro meio de congelamento de células adequado. Em algumas concretizações, a solução crioconservante é ou contém, por exemplo, pelo menos, ou cerca de 7,5% de DMSO. Em algumas concretizações, as etapas de processamento podem envolver a lavagem das células transduzidas e/ou expandidas para substituir as células em uma solução crioconservante. Em algumas concretizações, as células são congeladas, por exemplo, congeladas ou crioconservadas, em meios e/ou solução com uma concentração final de 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5%, ou 5,0% de DMSO, ou entre 1% e 15%, entre 6% e 12%, entre 5% e 10%, ou entre 6% e 8% de DMSO. Em concretizações particulares, as células são congeladas, por exemplo, criocongeladas ou crioconservadas, em meios e/ou solução com uma concentração final de,

ou de cerca de 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5%, ou 0,25% de HSA, ou entre 0,1% e -5%, entre 0,25% e 4%, entre 0,5% e 2%, ou entre 1% e 2% de HSA.

[00477] Em concretizações particulares, a composição de células T enriquecidas, por exemplo, células T que foram estimuladas, modificadas e/ou cultivadas, são formuladas, criocongeladas e em seguida armazenadas por um período de tempo. Em certas concretizações, as células criocongeladas, formuladas são armazenadas até que as células sejam liberadas para infusão. Em concretizações particulares, as células criocongeladas são armazenadas entre 1 dia e 6 meses, entre 1 mês e 3 meses, entre 1 dia e 14 dias, entre 1 dia e 7 dias, entre 1 dia e 7 dias, entre 3 dias e 6 dias, entre 6 meses e 12 meses, ou mais de 12 meses. Em algumas concretizações, as células são criocongeladas e armazenadas durante, durante cerca de, ou menos que 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias ou 7 dias. Em certas concretizações, as células são descongeladas e administradas a um indivíduo após o armazenamento. Em certas concretizações, as células são armazenadas durante, ou durante cerca de 5 dias.

[00478] Em algumas concretizações, a formulação é realizada usando uma ou mais etapas do processamento, incluindo lavagem, diluição ou concentração das células, tais como as células cultivadas ou expandidas. Em algumas concretizações, o processamento pode incluir diluição ou concentração das células para uma concentração ou número desejado, tais como composições de forma de dose unitária, incluindo o número de células para administração em uma determinada dose ou fração da mesma. Em algumas concretizações, as etapas de processamento podem incluir uma redução de volume para desse modo aumentar a concentração de células conforme desejado. Em algumas concretizações, as etapas de processamento podem incluir uma adição de volume para desse modo reduzir a concentração de

células, conforme desejado. Em algumas concretizações, o processamento inclui a adição de um volume de um tampão de formulação a células transduzidas e/ou expandidas. Em algumas concretizações, o volume de tampão de formulação é de, ou de cerca de 10 mL a 1000 mL, tal como pelo menos, ou pelo menos cerca de ou cerca de 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL ou 1000 mL.

[00479] Em algumas concretizações, tais etapas de processamento para formular uma composição celular são realizadas em um sistema fechado. Exemplos de tais etapas de processamento podem ser realizados usando uma câmara centrífuga em conjunto com um ou mais sistemas ou kits associados a um sistema de processamento celular, tal como uma câmara centrífuga produzida e vendida pela Biosafe SA, incluindo aquelas para uso com os sistemas de processamento celular Sepax® ou Sepax 2®. Um sistema e processo exemplificativos são descritos na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Em algumas concretizações, o método inclui efetuar expressão a partir da cavidade interna da câmara centrífuga de uma composição formulada, que é a composição resultante de células formuladas em um tampão de formulação, tal como tampão farmacologicamente aceitável, em qualquer uma das concretizações acima mencionadas, como descrito. Em algumas concretizações, a expressão da composição formulada é para um recipiente, como um saco que está operacionalmente ligado como parte de um sistema fechado com a câmara centrífuga. Em algumas concretizações, o recipiente, tal como um saco, é conectado a um sistema em uma linha de saída ou posição de saída.

[00480] Em algumas concretizações, o sistema fechado, tal como associado com uma câmara centrífuga ou sistema de processamento celular, inclui um kit de saída com várias portas contendo um coletor de tubos de várias vias associado a cada extremidade de uma linha de

tubulação com uma porta à qual um ou vários recipientes podem ser conectados para expressão da composição formulada. Em alguns aspectos, um número ou uma pluralidade desejada de recipientes de saída, por exemplo, bolsas, pode ser conectado esterilmente a um ou mais, geralmente dois ou mais, tais como pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais das portas da saída de várias portas. Por exemplo, em algumas concretizações, um ou mais recipientes, por exemplo, bolsas podem ser fixados às portas, ou a menos do que todas as portas. Desse modo, em algumas concretizações, o sistema pode efetuar a expressão da composição de saída em uma pluralidade de bolsas de saída.

[00481] Em alguns aspectos, as células podem ser expressas para uma ou mais dos vários bolsas de saída em uma quantidade para administração de dosagem, tal como para uma administração de única dose unitária ou administração de múltiplas doses. Por exemplo, em algumas concretizações, os bolsas de saída podem conter o número de células para administração em uma determinada dose ou fração da mesma. Desse modo, cada bolsa, em alguns aspectos, pode conter uma dose unitária única para administração ou pode conter uma fração de uma dose desejada, de modo que mais de um dos vários bolsas de saída, tais como dois bolsas de saída, ou 3 dos bolsas de saída constituem juntos uma dose para administração.

[00482] Desse modo, os recipientes, por exemplo, bolsas de saída, geralmente contêm as células a serem administradas, por exemplo, uma ou mais doses unitárias das mesmas. A dose unitária pode ser uma quantidade ou número de células a serem administradas ao indivíduo ou duas vezes o número (ou mais) de células a serem administradas. Pode ser a menor dose ou a menor dose possível das células que seriam administradas ao indivíduo.

[00483] Em algumas concretizações, cada um dos recipientes, por exemplo, bolsas, compreende individualmente uma dose unitária das

células. Desse modo, em algumas concretizações, cada um dos recipientes compreende o mesmo ou aproximadamente ou substancialmente o mesmo número de células. Em algumas concretizações, cada dose unitária contém pelo menos, ou pelo menos cerca de 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 ou 1×10^8 células modificadas, células totais, células T, ou PBMCs. Em algumas concretizações, o volume da composição celular formulada em cada saco é de 10 mL a 100 mL, tal como pelo menos ou pelo menos cerca de 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL ou 100 mL.

[00484] Em algumas concretizações, tais células produzidas pelo método, ou uma composição que compreende tais células, são administradas a um indivíduo para tratamento de uma doença ou condição.

F. Aspectos exemplares do processo

[00485] Em concretizações particulares, os métodos definidos são usados em conexão com um processo que produz ou gera uma composição de saída de células T enriquecidas a partir de uma ou mais composições de entrada e/ou de uma única amostra biológica. Em certas concretizações, a composição de saída contém células que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um TCR ou um CAR. Em concretizações particulares, as células das composições de saída são adequadas para administração a um indivíduo como uma terapia, por exemplo, uma terapia celular autóloga. Em algumas concretizações, a composição de saída é uma composição de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas.

[00486] Em algumas concretizações, os métodos fornecidos são usados em conexão com um processo inteiro para gerar ou produzir células de saída e/ou composições de saída de células T enriquecidas, tal como um processo que inclui algumas ou todas as etapas de: coletar ou obter uma amostra biológica; isolar, selecionar ou enriquecer células de entrada da amostra biológica; criocongelar e armazenar as

células de entrada; descongelar e/ou incubar as células de entrada sob condições de estimulação; modificar as células estimuladas para expressar ou conter um polinucleotídeo recombinante, por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante tal como um CAR; cultivando como células modificadas para uma quantidade, densidade, ou expansão limiar; formular as células cultivadas em uma composição de saída; e/ou criocongelar e armazenar as células de saída formuladas até que as células sejam liberadas para infusão e/ou sejam adequadas para serem administradas a um indivíduo. Em algumas concretizações, todo o processo é realizado com uma única composição de células T enriquecidas, por exemplo, células T CD4+ e CD8+. Em certas concretizações, o processo é realizado com duas ou mais composições de entrada de células T enriquecidas que são combinadas antes de e/ou durante o processo para gerar ou produzir uma única composição de saída de células T enriquecidas. Em algumas concretizações, as células T enriquecidas são ou incluem células T modificadas, por exemplo, células T transduzidas para expressar um receptor recombinante.

[00487] Em algumas concretizações, o processo associado com os métodos fornecidos é comparado a um processo alternativo. Em concretizações particulares, o processo alternativo pode diferir em um ou mais aspectos específicos, mas de outra forma contém similares ou iguais características, aspectos, etapas, estágios, reagentes e/ou condições do processo associado aos métodos fornecidos. Em algumas concretizações, o processo alternativo é similar ao processo associado com os métodos definidos, mas difere de uma maneira que inclui, mas não está limitada a, um ou mais de; diferentes reagentes e/ou formulações de meios; presença de soro durante a incubação, transdução, transfecção, e/ou cultivo; composição celular diferente da composição de entrada, por exemplo, relação de células T CD4+ para CD8 +;

quantidade e/ou concentração diferente de células de entrada incubadas sob condições de estimulação; diferentes condições de estimulação e/ou um diferente reagente estimulatório; diferente relação de reagente estimulatório para células; diferente vetor e/ou método de transdução; diferente tempo ou ordem para incubar, transduzir e/ou transfectar as células; ausência ou diferença de uma ou mais citocinas recombinantes presentes durante a incubação, transdução, transfecção, e/ou cultivo; diferente quantidade e/ou concentração de células que são transduzidas; diferentes condições de balanço e/ou perfusão durante o cultivo; e/ou uma diferente quantidade, densidade ou expansão limiar alcançada durante o cultivo.

[00488] Em certas concretizações, o processo é concluído dentro de um período de tempo e/ou duração de, ou de cerca de 35 dias, 34 dias, 33 dias, 32 dias, 31 dias, 30 dias, 29 dias, 28 dias, 27 dias, 26 dias, 25 dias, 24 dias, 23 dias, 22 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, 9 dias ou menos que 9 dias. Em algumas concretizações, o processo é concluído em 25 dias. Em certas concretizações, o processo é concluído em 21 dias. Em concretizações particulares, o processo é concluído dentro de uma duração e/ou período de tempo entre 14 e 18 dias. Em algumas concretizações, o processo é considerado concluído quando: a composição é colhida e/ou formulada; a composição está pronta para ser colhida e/ou formulada; a composição atingiu um valor limiar alvo para a colheita; a composição é liberada e/ou pronta para teste pós-formulação; a composição está pronta para ser administrada ao sujeito, e/ou a composição é administrada ao sujeito; incluindo os tempos de armazenamento das composições criocongeladas. Em concretizações particulares, quando o processo é realizado em mais de uma composição de células T enriquecidas obtidas da mesma amostra biológica, o processo é concluído quando pelo menos uma

amostra representativa de cada e toda composição da mesma amostra biológica tiver concluído a processo.

[00489] Em algumas concretizações, o processo é concluído dentro de 21 dias, medido desde o início ou coleta da amostra biológica e/ou o isolamento, seleção, estimulação e/ou enriquecimento de células de entrada da amostra biológica para quando as células de saída são liberadas para infusão. Em concretizações particulares, o processo é concluído entre 14 e 18 dias, medido desde o início ou coleta da amostra biológica e/ou o isolamento, seleção, estimulação e/ou enriquecimento de células de entrada da amostra biológica para quando as células de saída estiverem prontas para testes pós-formulação, liberadas para infusão, e/ou prontas para serem administradas ao indivíduo.

[00490] Em certas concretizações, a duração e/ou período de tempo, durante o processo que ocorre desde o começo ou o início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que as células de saída são coletadas, formuladas e/ou criocongeladas, é de 5 dias ou cerca de 5 dias, entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18 dias, entre 8 e 15 dias, entre 8 e 15 dias, entre 14 e 18 dias, entre 8 e 14 dias, entre 8 e 14 dias, entre 8 e 15 dias, tal como entre 8 e 13 dias ou entre 9 dias e 13 dias. Em concretizações particulares, a duração e/ou período de tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que as células de saída são coletadas, formuladas e/ou criocongeladas é entre 7 dias e 10 dias, entre 6 dias e 9 dias ou entre 5 dias e 8 dias.

[00491] Em certas concretizações, o período médio de tempo e/ou duração do processo que ocorre desde o começo ou início da incubação até o momento em que o limiar é atingido é de de cerca de ou menos que cerca de 5 dias, entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18

dias, entre 9 dias e 13 dias, entre 14 dias a 18 dias, ou é de, é menor que, ou é de cerca de 5 dias, 5,5 dias, 6 dias, 6,5 dias, 7 dias, 7,5 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias ou 13 dias. Em concretizações particulares, o período médio de tempo e/ou a duração do processo que ocorre desde o começo ou início da incubação até o momento em que o limite é atingido é de cerca de ou menos que cerca de 5 dias, entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18 dias, entre 14 e 18 dias, entre 8 dias e 13 dias, ou entre 9 dias e 13 dias, ou é de, é menor que, ou é de cerca de 5 dias, 5,5 dias, 6 dias, 6,5 dias, 7 dias, 7,5 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias ou 13 dias. Em concretizações particulares, a duração e/ou período de tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que o limite é atingido é de 5 dias ou cerca de 5 dias, entre 5 dias e 7 dias, entre 7 dias e 10 dias, entre 6 dias e 9 dias ou entre 5 dias e 8 dias.

[00492] Em algumas concretizações, a taxa de sucesso na qual as células modificadas (por exemplo, células T CAR) podem ser bem-sucedidamente fabricadas pelo processo fornecido é pelo menos que, ou cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Em alguns aspectos, a taxa de sucesso é determinada como a percentagem de indivíduos cujas amostras foram coletadas, por exemplo, por afere-se, para modificação pelo processo fornecido, em que tais células atendem aos critérios do processo para colheita de células de saída, incluindo coleta, formulação e/ou criopreservação de células de saída, em um tempo que é de cerca de ou menos que cerca de 5 dias, entre 5 dias e 10 dias, tal como 7 dias e 10 dias, entre 6 dias e 9 dias ou entre 5 dias e 8 dias dias, 5 dias, 5,5 dias, 6 dias, 6,5 dias, 7 dias ou 7,5 dias, após o início da estimulação com um reagente estimulatório. Em alguns aspectos, a taxa de sucesso é determinada como a percentagem de indivíduos cujas amostras foram coletadas, por exemplo, por

afere-se, para modificação pelo processo fornecido, no qual tais células atendem aos critérios do processo de reinfusão das células modificadas ao indivíduo, incluindo teste pós-formulação, liberação para infusão, e/ou prontas para sere, administradas ao sujeito, em um período de 21 dias após o início da estimulação com o reagente estimulatório.

[00493] Em algumas concretizações, a duração e/ou o período de tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que as células de saída são coletadas, formuladas e/ou criocongeladas é entre 9 dias e 15 dias, durante cerca de, ou durante pelo menos, ou cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% dos indivíduos entre uma pluralidade de indivíduos submetidos ao processo fornecido para a fabricação de células. Em certas concretizações, a duração e/ou período de tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que as células de saída são coletadas, formuladas e/ou criocongeladas é entre 14 dias e 18 dias para, para cerca de, ou para pelo menos, ou cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% dos indivíduos entre uma pluralidade de indivíduos submetidos ao processo fornecido para a fabricação de células. Em concretizações particulares, a duração e/ou período de tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que as células de saída são coletadas, formuladas, e/ou criocongeladas é entre 7 e 10 dias para, para cerca de, ou pelo menos para, ou cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% dos indivíduos entre uma pluralidade de indivíduos submetidos ao processo fornecido para a fabricação de células. Em concretizações particulares, a duração e/ou período de tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que as células de saída são coleta-

das, formuladas, e/ou criocongeladas é entre 6 e 9 dias para, para cerca de, ou pelo menos para, ou para cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% dos assuntos entre uma pluralidade de indivíduos submetidos ao processo fornecido para a fabricação de células. Em concretizações particulares, a duração e/ou período de tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que as células de saída são coletadas, formuladas, e/ou criocongeladas é entre 5 e 8 dias para, para cerca de, ou para pelo menos, ou para cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% dos indivíduos entre uma pluralidade de indivíduos submetidos ao processo fornecido para a fabricação de células. Em algumas concretizações, esses indivíduos são pacientes que têm uma doença ou condição, como um câncer, como um mieloma múltiplo.

[00494] Em algumas concretizações, a duração e/ou período de tempo durante o processo que ocorre a partir do isolamento, enriquecimento e seleção das composições de células enriquecidas CD4+ e CD8+ de uma amostra biológica, por exemplo, aferese e/ou leucaferese, até o momento em que as células de saída são coletadas, formuladas e/ou criocongeladas é entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18 dias, entre 14 e 18 dias, entre 8 e 19 dias, entre 8 e 14 dias, ou entre 10 e 16 dias. Em certas concretizações, as células de saída são coletadas, formuladas e/ou colhidas entre 10 e 16 dias após o isolamento, enriquecimento e/ou seleção durante pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% dos indivíduos entre uma pluralidade de indivíduos submetidos ao processo fornecido para a fabricação de células. Em concretizações particulares, as células de saída são coletadas, formuladas e/ou colhidas entre 14 e 18 dias após o isolamento, enriquecimento e/ou seleção durante pelo menos 85%, pelo

menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% dos indivíduos entre uma pluralidade de indivíduos submetidos ao processo fornecido para a fabricação de células.

[00495] Em algumas concretizações, o processo é concluído dentro de uma duração e/ou período de tempo de, ou de cerca de 35 dias, 34 dias, 33 dias, 32 dias, 31 dias, 30 dias, 29 dias, 28 dias, 27 dias, 26 dias, 25 dias, 24 dias, 23 dias, 22 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, 9 dias ou menos que 9 dias, conforme medido desde o início ou coleta da amostra biológica, por exemplo, uma amostra de aferese ou leucaferese, até quando uma composição de saída é administrada ou está pronta para ser administrada ao indivíduo, as células de saída são colhidas e/ou formuladas; as células de saída estão prontas para serem colhidas e/ou formuladas; as células de saída atingiram um valor limite alvo para a colheita; e/ou a composição de saída é liberada para teste, incluindo os tempos de armazenamento das composições criocongeladas. Em algumas concretizações, o processo é concluído dentro de 21 dias, medido desde o início ou coleta da amostra biológica até quando as células de saída estiverem prontas para serem liberadas para infusão por exemplo, para um indivíduo.

[00496] Em algumas concretizações, o processo é concluído, dentro de um intervalo de confiança de ou de pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99 % ou 99,9%, dentro de uma duração e/ou período de tempo de, ou de cerca de 35 dias, 34 dias, 33 dias, 32 dias, 31 dias, 30 dias, 29 dias, 28 dias, 27 dias, 26 dias, 25 dias, 24 dias, 23 dias, 22 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, 9 dias, ou menos que 9 dias, medidos desde o início ou coleta da amostra biológica e/ou o isolamento, seleção, estimulação e/ou enri-

quecimento de células de entrada da amostra biológica até quando as células de saída são liberadas para infusão, incluindo os tempos de armazenamento das composições criocongeladas. Em certas concretizações, o processo é concluído, dentro de um intervalo de confiança de, ou de pelo menos, ou de cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 97%, 98%, 99% ou 99,9%, dentro de 14 dias a 18 dias, medidos desde o início ou coleta da amostra biológica e/ou o isolamento, seleção, estimulação e/ou enriquecimento de células de entrada da amostra biológica até quando as células de saída são liberadas para infusão, incluindo os tempos de armazenamento das composições criocongeladas.

[00497] Em certas concretizações, o processo é concluído, dentro de um intervalo de confiança de, ou de pelo menos a, ou de cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 99,9%, dentro de uma duração e/ou período de tempo de, ou de cerca de 35 dias, 34 dias, 33 dias, 32 dias, 31 dias, 30 dias, 29 dias, 28 dias, 27 dias, 26 dias, 25 dias, 24 dias, 23 dias, 22 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, 9 dias, ou menos que 9 dias, medidos a partir da coleta da amostra biológica e/ou do isolamento, seleção, estimulação, e/ou enriquecimento de células T, por exemplo, células T de entrada, da amostra biológica até quando as células de saída forem administradas ao indivíduo e/ou estão prontas para serem administradas ao indivíduo, incluindo os tempos de armazenamento das composições de células criocongeladas. Em certas concretizações, o processo é concluído, dentro de um intervalo de confiança de, ou pelo menos que, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 97%, 98%, 99% ou 99,9 %, dentro de uma duração e/ou período de tempo entre 14 dias e 18 dias, conforme medido a partir da coleta da amostra biológica e/ou o isolamento, seleção, estimulação e/ou enriquecimento de células T, por exemplo, células T de

entrada, desde uma amostra biológica até quando as células de saída forem administradas ao indivíduo e/ou estiverem prontas para serem administradas ao indivíduo, incluindo os tempos de armazenamento para composições celulares criocongeladas.

[00498] Em certas concretizações, o processo é concluído, dentro de um intervalo de confiança de ou de pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99 % ou 99,9%, dentro de uma duração e/ou período de tempo de, ou de cerca de 35 dias, 34 dias, 33 dias, 32 dias, 31 dias, 30 dias, 29 dias, 28 dias, 27 dias, 26 dias , 25 dias, 24 dias, 23 dias, 22 dias, 21 dias, 20 dias, 19 dias, 18 dias, 17 dias, 16 dias, 15 dias, 14 dias, 13 dias, 12 dias, 11 dias, 10 dias, 9 dias, ou menos que 9 dias, conforme medido a partir da coleta da amostra biológica e/ou do isolamento, seleção, estimulação, e/ou enriquecimento de células T, por exemplo, células T de entrada, da amostra biológica até quando as células de saída estiverem prontas para testes pós-formulação, incluindo os tempos de armazenamento para composições celulares criocongeladas. Em certas concretizações, o processo é concluído, dentro de um intervalo de confiança de, ou pelo menos que, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 97%, 98%, 99% ou 99,9 %, dentro de uma duração e/ou período de tempo entre 14 dias e 18 dias, conforme medido a partir da coleta da amostra biológica e/ou o isolamento, seleção, estimulação e/ou enriquecimento de células, por exemplo, células T de entrada, desde uma amostra biológica até quando as células de saída estiverem prontas para testes pós-formulação, incluindo os tempos de armazenamento para composições celulares criocongeladas.

[00499] Em certas concretizações, a duração e/ou período de tempo para concluir o processo é entre 10 dias e 35 dias, entre 12 dias e 33 dias, entre 17 dias e 25 dias, entre 14 dias e 18 dias, ou entre 19 e 23 dias, por exemplo, quando o tempo de armazenamento é incluído,

para amostras de uma pluralidade de indivíduos, e/ou pelo menos uma certa percentagem de indivíduos, como aqueles com uma indicação ou doença específica, por exemplo, pelo menos, ou cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% ou mais de 95% desses indivíduos. Em certas concretizações, o período médio de tempo e/ou duração para concluir o processo (como medido desde a retirada da amostra do indivíduo até o momento em que o produto está pronto ou liberado para infusão no indivíduo) em uma pluralidade de composições iniciais de diferentes amostras biológicas é entre 15 dias e 27 dias, entre 17 dias e 25 dias, entre 14 e 18 dias, ou entre 19 dias e 23 dias ou é de, é de cerca de ou é inferior a 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, 22 dias ou 23 dias, por exemplo, quando o tempo de armazenamento é incluído. Em concretizações particulares, o período médio de tempo e/ou duração para concluir o processo em uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas é entre 15 dias e 27 dias, entre 17 dias e 25 dias, entre 14 dias e 18 dias, entre 19 dias e 23 dias ou é de, é menor que, ou é de cerca de 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, 22 dias, ou 23 dias, por exemplo, quando o tempo de armazenamento de e/ou transporte é incluído. Em concretizações particulares, a duração para concluir o processo de uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas é entre 15 dias e 27 dias, entre 17 dias e 25 dias, entre 14 e 18 dias, ou entre 19 dias e 23 dias ou é, é menor que, ou cerca de 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias, 21 dias, 22 dias ou 23 dias, por exemplo, quando o tempo de armazenamento é incluído.

[00500] Em certas concretizações, a duração do processo, tal como em várias composições iniciais, de diferentes amostras biológicas e/ou indivíduos com doenças diferentes, é menor que, ou não maior que 21 dias; em alguns aspectos, tal resultado é alcançado com uma taxa de

sucesso superior a, ou cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de sucesso na fabricação de produtos em tais amostras ou pacientes. Em concretizações particulares, a duração do processo, como em várias composições de partida, por exemplo, de diferentes amostras biológicas e/ou indivíduos com diferentes doenças, é entre 14 e 18 dias; Em alguns aspectos, esse resultado é alcançado com uma taxa de sucesso superior a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de sucesso na fabricação de produtos em tais amostras ou pacientes.

[00501] Em algumas concretizações, a duração e/ou período de tempo para concluir o processo é entre 7 dias e 27 dias, entre 9 dias e 25 dias, entre 11 dias e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, Entre 11 e 15 dias, quando o tempo de armazenamento das células criocongeladas não é incluído ou considerado. Em certas concretizações, o período médio de tempo e/ou duração requerida para concluir o processo em uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas é entre 7 dias e 27 dias, entre 9 dias e 25 dias, entre 11 dias e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, ou entre 11 dias e 15 dias, ou é de, é menor que, ou é cerca de 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias ou 18 dias em que o tempo de armazenamento das células criocongeladas não é incluído ou é considerado. Em concretizações particulares, o período médio de tempo e/ou duração requerida para concluir o processo de uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas é entre 7 dias e 27 dias, entre 9 dias e 25 dias, entre 11 dias e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, ou entre 11 dias e 15 dias, ou é de, é menor que, ou é de cerca de 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias ou 18 dias em que o tempo de armazenamento das células criocongeladas não é incluído ou considerado. Em algumas concretizações, o período médio de tempo e/ou duração requerido para concluir o processo em uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas é inferior a 21 dias quando o

tempo de armazenamento de células criocongeladas não é incluído.

[00502] Em concretizações particulares, o período de tempo para concluir o processo em pelo menos 10% de uma pluralidade de composições obtidas de diferentes fontes, por exemplo, diferentes amostras biológicas e/ou diferentes composições de entrada de células T enriquecidas isoladas, enriquecidas, e/ou selecionadas de diferentes amostras biológicas, é entre 7 dias e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, entre 10 dias e 17 dias, ou entre 11 dias e 15 dias ou é de, ou é de cerca de 11 dias, 12 dias ou 13 dias em que o tempo de armazenamento de células criocongeladas não é incluído ou considerado. Em formas de atividades particulares, o período de tempo requerido para concluir o processo em pelo menos 50% de uma pluralidade de composições de diferentes fontes biológicas, é entre 7 dias e 27 dias, entre 9 dias e 25 dias, entre 11 dias e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, ou entre 11 dias e 15 dias, ou é de, é menor que, ou é de cerca de 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, ou 18 dias quando o tempo de armazenamento de células criocongeladas não é incluído ou considerado. Em certas concretizações, o período de tempo requerido para concluir o processo em pelo menos 90% de uma pluralidade de composições de diferentes fontes é entre 7 dias e 27 dias, entre 9 dias e 25 dias, entre 11 dias e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, ou entre 11 dias e 15 dias, ou é de, é menor que, ou é cerca de 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias ou 18 dias quando o tempo de armazenamento das células criocongeladas não é incluído ou considerado. Em certas concretizações, o período de tempo requerido para concluir o processo em pelo menos 90% de uma pluralidade de composições de diferentes fontes é inferior a 21 dias quando o tempo de armazenamento das células criocongeladas não é incluído.

[00503] Em algumas concretizações, a duração e/ou período de

tempo durante o processo que ocorre desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que uma quantidade, densidade, e/ou grau de expansão limite (tal como uma expansão duplicada particular, tal como quatro vezes ou uma dose particular) é alcançada durante o cultivo entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, ou entre 8 e 15 dias, tal como entre 8 e 13 dias ou entre 9 dias e 13 dias. Em certas concretizações, o período médio de tempo e/ou duração do processo que ocorre desde o começo ou início da incubação até o momento em que o limiar é alcançado é entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18 dias, entre 14 e 18 dias, ou entre 9 dias e 13 dias, é menor que, ou seja, cerca de 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias ou 13 dias. Em concretizações particulares, o período médio de tempo e/ou duração do processo que ocorre desde o começo ou início da incubação até o momento em que o limite é atingido é entre 5 e 25 dias, entre 7 e 18 dias, entre 14 dias e 18 dias, entre 9 dias e 13 dias, ou seja, cerca de 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias ou 13 dias.

[00504] Em algumas concretizações, a duração e/ou o período de tempo do processo desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que a quantidade, densidade e/ou expansão limite é atingida durante o cultivo é pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 15%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 25 %, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 35%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50 %, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75 %, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, ou menos a, ou cerca de 90% menos tempo do que em um processo alternativo. Em concretizações particu-

lares, a duração e/ou período de tempo durante o processo, desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que a quantidade, densidade e/ou expansão limite é alcançada durante o cultivo é menor que a duração e/ou o período de tempo de um processo alternativo em cerca de 0,5 dias, 1 dia, 1,5 dias, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias ou mais de 14 dias.

[00505] Em certas concretizações, o período de tempo requerido para que pelo menos 10% de uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas atinja a quantidade, densidade e/ou expansão limite desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação até o momento em que a quantidade, densidade e/ou expansão limite é alcançada durante o cultivo é entre 5 dias e 20 dias, entre 7 dias e 15 dias, entre 9 dias e 11 dias, ou seja, é menor que , ou é cerca de 7 dias, 8 dias, 9 dias ou 10 dias. Em concretizações particulares, o período de tempo requerido para que pelo menos 50% de uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas atinja a quantidade, densidade e/ou expansão limite desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação é entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18 dias, ou entre 9 dias e 13 dias, ou é de, é menor que, ou é de cerca de 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias de 13 dias. Em algumas concretizações, o período de tempo requerido para que pelo menos 90% de uma pluralidade de composições de diferentes amostras biológicas atinja a quantidade, densidade e/ou expansão limite desde o começo ou início da incubação sob condições de estimulação é entre 5 dias e 25 dias, entre 7 dias e 18 dias, entre 9 dias e 13 dias, ou seja, cerca de 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, ou 13 dias.

[00506] Em algumas concretizações os métodos fornecidos são usados em conexão com a geração ou produção bem-sucedida de

composições de saída de células T modificadas que são adequadas para uso em terapia celular. Em algumas concretizações, uma composição de saída é gerada com sucesso se as células da composição atingirem a contagem, densidade e/ou expansão celular limite durante o cultivo. Em concretizações particulares, uma composição de saída é bem-sucedidamente gerada se, as células de pelo menos, ou de cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95% das células expressam o receptor recombinante. Em concretizações particulares, uma composição de saída é bem-sucedidamente produzida ou gerada se uma composição de saída for adequada para uso terapêutico, por exemplo, como uma terapia celular autóloga. Em concretizações particulares, a composição de saída é adequada para uso terapêutico se as células das composições de saída atenderem a um ou mais critérios. Em algumas concretizações, as células e/ou as composições de células adequadas para uso em terapia celular são estéreis (por exemplo, falta de contaminação microbiana detectável), livres de endotoxina, vírus livre de replicação competente, viável, ativo (por exemplo, possuam atividade citolítica e/ou liberam citocina em resposta a um antígeno alvo), e/ou contêm uma alta porção de células que expressam o receptor recombinante.

[00507] Em algumas concretizações, uma porção, amostra e/ou fração das células de saída é coletada, por exemplo, antes do criocongelamento, e é testada com um ou mais ensaios. Em algumas concretizações, os referidos um ou mais ensaios incluem ensaios para avaliar as células de saída, por exemplo, estimar, avaliar e/ou quantificar aspectos, fenótipos, e/ou características das células de saída, por exemplo, para determinar ou verificar as características biológicas e/ou de segurança das células de saída. Em algumas concretizações, os referidos um ou mais ensaios podem incluir ensaios para verificar se a porção, amostra e/ou fração das células de saída são estéreis. Em

concretizações particulares, os ensaios incluem testes quanto à presença de contaminação microbiana, endotoxinas bacterianas, reagentes residuais, e/ou vírus competente para replicação. Em algumas concretizações, um ou mais ensaios medem, detectam e/ou quantificam uma ou mais características biológicas. Em certas concretizações, os referidos um ou mais ensaios medem, detectam e/ou quantificam a contagem de células, densidade celular, fenótipo celular, por exemplo, expressão de superfície de CD3, CD4, e/ou CD8, viabilidade, e/ou atividade, por exemplo, liberação de citocinas e/ou atividade citolítica.

[00508] Em concretizações particulares, os referidos um ou mais ensaios são realizados antes das células de saída serem liberadas para infusão, prontas para administração a um indivíduo e/ou administradas a um indivíduo. Em concretizações particulares, as células de saída são liberadas para infusão, prontas para administração a um indivíduo e/ou administradas a um indivíduo após a realização de um ou mais ensaios, por exemplo, em uma porção, fração e/ou amostra de células de saída. Em concretizações particulares, as células de saída são liberadas para infusão, prontas para administração a um indivíduo, e/ou administradas a um indivíduo depois que as células de saída são determinadas como seguras, por exemplo, estéreis e/ou livres, e/ou têm características biológicas desejadas após a conclusão dos referidos um ou mais ensaios.

[00509] Em concretizações particulares, os métodos selecionados têm pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 81%, pelo menos, ou cerca de 82%, pelo menos, ou cerca de 83%, pelo menos, ou cerca de 84%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 86%, pelo menos, ou cerca de 87%, pelo menos, ou cerca de 88%, pelo menos, ou cerca de 89%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 91%, pelo menos, ou cerca de 92%, pelo menos, ou cerca de 93%, pelo menos, ou cerca de 94%, pelo menos, ou cerca

de 95%, pelo menos, ou cerca de 96%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99% de probabilidade ou possibilidade de bem-sucedidamente produzir uma composição de saída de células T enriquecidas de uma composição de células de entrada e/ou uma amostra biológica. Em certas concretizações, a probabilidade ou possibilidade está entre 85% e 100%, entre 90% e 95%, ou entre 92% e 94%. Em certas concretizações, os métodos fornecidos geram ou produzem bem-sucedidamente uma composição de saída de células T enriquecidas de pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80% , pelo menos, ou cerca de 81%, pelo menos, ou cerca de 82%, pelo menos, ou cerca de 83%, pelo menos, ou cerca de 84%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 86%, pelo menos, ou cerca de 87%, pelo menos, ou cerca de 88%, pelo menos, ou cerca de 89%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 91%, pelo menos, ou cerca de 92%, pelo menos, ou cerca de 93%, pelo menos, ou cerca de 94%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 96%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99% das composições e/ou amostras de uma pluralidade de composições celulares de entrada e/ou de uma pluralidade de amostras biológicas. Em algumas concretizações, os métodos fornecidos geram ou produzem bem-sucedidamente uma composição de saída de células T enriquecidas de, entre, ou de cerca de 85% e de, ou de cerca de 100%, entre, ou de cerca de 90% e de, ou de cerca de 95%, entre, ou de cerca de 92% e de, ou de cerca de 94% das composições e/ou amostras de uma pluralidade de composições de células de entrada e/ou de uma pluralidade de amostras biológicas.

[00510] Em algumas concretizações, o processo é concluído em 21 dias para as células obtidas, selecionadas ou enriquecidas com pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou

pelo menos 99,9% das amostras de diferentes indivíduos e tem uma taxa de sucesso de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou maior. Em algumas concretizações, o processo é concluído em 21 dias para as células obtidas, selecionadas ou enriquecidas a partir de, ou em pelo menos, ou cerca de 90%, em ou em pelo menos, ou cerca de 91%, em ou em pelo menos, ou cerca de 92%, em ou em pelo menos, ou cerca de 93%, em ou em pelo menos, ou cerca de 94%, em ou em pelo menos, ou cerca de 95%, em ou em pelo menos, ou cerca de 96%, em ou em pelo menos, ou cerca de 97%, em ou em pelo menos, ou cerca de 98% ou em ou em pelo menos ou ou cerca de 99%, ou 100% das amostras de diferentes indivíduos. Em algumas concretizações, o processo tem uma taxa de sucesso de pelo menos, ou cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99 % ou 100% para a produção de células modificadas prontas para infusão em um indivíduo dentro de 21 dias a partir da obtenção, seleção ou enriquecimento como células do indivíduo. Em certas concretizações, o processo é concluído dentro de 21 dias para as células obtidas, selecionadas ou enriquecidas a partir de pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou pelo menos 99,9% das amostras de diferentes indivíduos e tem uma taxa de sucesso de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou maior.

[00511] Em concretizações particulares, o processo é concluído entre 14 e 18 dias para as células obtidas, selecionadas ou enriquecidas com pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou pelo menos 99,9% das amostras de diferentes indivíduos e tem uma taxa de sucesso de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou maior. Em certas concretizações, o processo é concluído entre 14 e 18 dias para as células obtidas, selecionadas ou enriquecidas com pelo menos, ou cerca de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou pelo menos 99,9% das amostras de diferentes indivíduos e tem

uma taxa de sucesso de pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou maior.

[00512] Em concretizações particulares, o processo associado com os métodos fornecidos tem uma probabilidade ou possibilidade de bem-sucedidamente gerar ou produzir uma composição de saída que seja maior que a probabilidade ou possibilidade de um processo alternativo e/ou processo exemplar de bem-sucedidamente gerar ou produzir com sucesso uma composição de saída de pelo menos, ou cerca de 0,5%, pelo menos, ou cerca de 1%, pelo menos, ou cerca de 1,5%, pelo menos, ou cerca de 2%, pelo menos, ou cerca de 2,5%, pelo menos, ou cerca de 3%, pelo menos, ou cerca de 3,5%, pelo menos, ou cerca de 4,0%, pelo menos, ou cerca de 4,5%, pelo menos, ou cerca de 5%, pelo menos, ou cerca de 5,5%, pelo menos, ou cerca de 6%, pelo menos, ou cerca de 6,5%, pelo menos, ou cerca de 7%, pelo menos, ou cerca de 7,5%, pelo menos, ou cerca de 8%, pelo menos, ou cerca de 8,5%, pelo menos, ou cerca de 9%, pelo menos, ou cerca de 9,5%, ou menos a, a , ou cerca de 10%, ou em mais de 10%.

G. Aspectos Exemplares das Composições de Saída

[00513] Em certas concretizações, os métodos fornecidos são usados em conexão com um processo para gerar ou produzir células de saída e/ou composições de saída de células T enriquecidas. Em concretizações particulares, as células de saída e/ou composições de saída de células T enriquecidas são ou incluem células que foram coletadas, obtidas, isoladas, selecionadas e/ou enriquecidas com a amostra biológica, tal como uma amostra de sangue ou amostra de leucaferese; incubadas sob condições de estimulação; modificadas, por exemplo, transduzidas, para expressar ou conter um polinucleotídeo recombinante, por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante tal como um CAR; cultivadas até uma quantidade, densidade, ou expansão limiar; e/ou formuladas. Em algumas concretiza-

ções, a composição de saída foi previamente criocongelada e descongelada, por exemplo, durante, antes de e/ou após uma ou mais etapas do processo. Em algumas concretizações, a composição de saída contém células T, por exemplo, células T CD4+ e células T CD8+, que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um CAR.

[00514] Em concretizações particulares, uma composição de saída é uma composição de células enriquecidas para células T CD3+ enriquecidas. Em algumas concretizações, uma composição de saída é ou inclui pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou de, ou cerca de 100% de células T CD3+. Em algumas concretizações, a composição de saída consiste essencialmente em células CD3+ T. Em certas concretizações, a composição de saída é uma composição de células enriquecidas para células T CD4+ e células T CD8+ enriquecidas. Em concretizações particulares, a composição de saída é ou inclui pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 98%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,5%, pelo menos, ou cerca de 99,9%, ou a, ou cerca de 100% das células que são células T CD4+ ou CD8+. Em algumas concretizações, a composição de saída consiste essencialmente em células T CD4+ e CD8+.

[00515] Em concretizações particulares, a composição de saída contém entre ou cerca de 10% e a ou cerca de 90% entre ou cerca de

20% e a ou cerca de 80%, entre ou cerca de 25% e a ou cerca de 75%, entre ou cerca de 30% e a ou cerca de cerca de 70%, entre ou cerca de 35% e a ou cerca de 65%, entre ou cerca de 40% e em ou cerca de 60%, entre ou cerca de 55% e a ou cerca de 45%, ou cerca de 50% ou 50% de células T CD4+ e a ou cerca de, entre, ou cerca de 10% e a, ou cerca de 90%, entre, ou cerca de 20% e a, ou cerca de 80%, entre ou cerca de 25% e cerca de 75%, entre ou cerca de 30% e a, ou cerca de 70%, entre ou cerca de 35% e a, ou cerca de 65%, entre ou cerca de 40% e a, ou cerca de 60%, entre, ou cerca de 55% e a, ou cerca de 45%, ou cerca de 50% ou 50% de células T CD8+. Em certas concretizações, a composição de saída contém entre, ou cerca de 35% e a, ou cerca de 65%, entre, ou cerca de 40% e a, ou cerca de 60%, entre ou cerca de 60%, entre, ou cerca de 55% e a, ou cerca de 45%, ou cerca de 50% ou 50% de células T CD4+ e a, ou cerca de entre, ou cerca de 35% e a, ou cerca de 65%, entre, ou cerca de 40% e a, ou cerca de 60%, entre ou cerca de 55% e a, ou cerca de 45% ou cerca de 50% ou 50% de células T CD8+. Em concretizações particulares, a composição de saída contém entre, ou cerca de 35% e a, ou cerca de 65% de células T CD4+ e a, ou cerca de entre a ou cerca de 35% e a, ou cerca de 65% de células T CD8+. Em concretizações particulares, a composição de saída contém uma relação entre 3: 1 e 1: 3, entre 2,5: 1 e 1: 2,5, entre 2: 1 e 1: 2, entre 1,5: 1 e 1: 1,5, entre 1,4: 1 e 1: 1,4, entre 1,3: 1 e 1: 1,3, entre 1,2: 1 e 1: 1,2, ou entre 1,1: 1 e 1: 1,1 células T CD4+ para células T CD8+. Em algumas concretizações, a composição de células tem uma relação de, ou cerca de 3: 1, 2,8: 1, 2,5: 1, 2,25: 1, 2: 1, 1,8: 1, 1,6: 1, 1,5: 1, 1,4: 1, 1,3: 1, 1,2: 1, 1,1: 1, 1: 1,1: 1,1, 1: 1,2, 1: 1,3, 1: 1,4, 1: 1,5, 1: 1,6, 1: 1,8, 1:2, 1: 2,25, 1: 2,5, 1: 2,8, 1: 3.

[00516] Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo

menos, ou cerca de 90%, pelo menos, cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 98%, ou menos a, ou cerca de 99% das composições de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm uma proporção de células T CD4+ para células T CD8+ entre 10:90 e 90:10, entre 20:80 e 80:20, entre 75:25 e 25:75, entre 70:30 e 30:70, entre 35:65 e 65:35, entre 40:60 e 60:40, entre 45:55 e 55:45, ou cerca de 50:50 ou 50:50. Em concretizações particulares, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou pelo menos 90% das composições de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm uma relação entre 3:1 e 1:3, entre 2,5: 1 e 1: 2,5, entre 2: 1 e 1: 2, entre 1,5: 1 e 1: 1,5, entre 1,4: 1 e 1: 1,4, entre 1,3: 1 e 1: 1,3, entre 1,2: 1 e 1: 1,2, ou entre 1,1 : 1 e 1: 1.1 células T CD4+ para células T CD8+. Em certas concretizações, pelo menos 90% das composições de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm uma proporção de células T CD4+ para células T CD8+ entre 1: 2 e 2: 1. Em concretizações particulares, pelo menos 90% das composições de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm uma proporção de células T CD4+ para células T CD8+ entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,25:1 e 1:1,25, entre 1,1: 1 e 1: 1,1.

[00517] Em algumas concretizações, a composição de saída contém uma relação entre 3:1 e 1:3, entre 2,5:1 e 1:2,5, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5: 1 e 1: 1,5, entre 1,4: 1 e 1: 1,4, entre 1,3: 1 e 1: 1,3, entre 1,2: 1 e 1: 1,2, ou entre 1,1: 1 e 1: 1,1 células T CD4+ que expressam o receptor recombinante, por exemplo, CAR, para células T CD8+ que expressam o receptor recombinante, por exemplo, o CAR. Em algumas concretizações, a composição de células tem uma relação de, ou de cerca de 3:1, 2,8:1, 2,5:1, 2,25:1, 2:1, 1,8:1, 1,6:1, 1,5:1 , 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1,1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1: 1,6, 1:1,8, 1:2, 1:2,25, 1:2,5, 1:2,8, 1:3.

[00518] Em concretizações particulares, pelo menos 80%, pelo me-

nos 85% ou pelo menos 90% das composições de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm uma relação entre 3:1 e 1:3, entre 2,5:1 e 1:2,5, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,4:1 e 1:1,4, entre 1,3:1 e 1:1,3, entre 1,2:1 e 1:1,2, ou entre 1,1:1 e 1:1,1 células T CD4+ que expressam o receptor recombinante, por exemplo, o CAR, para células T CD8+ que expressam o receptor recombinante, por exemplo, o CAR. Em certas concretizações, pelo menos 90% das composições de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm uma proporção de células T CD4+ para células T CD8+ entre 1:2 e 2:1. Em concretizações particulares, pelo menos 90% das composições de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm uma relação de células T CD4+ para células T CD8+ entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,25:1 e 1:1,25, entre 1,1:1 e 1:1,1.

[00519] Em algumas concretizações, uma composição de saída gerada ou produzida em conexão com os métodos fornecidos contém células que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um TCR ou um CAR. Em algumas concretizações, a expressão de um receptor recombinante pode incluir, mas não está limitada a, ter uma ou mais proteínas receptoras recombinantes localizadas na membrana celular e/ou superfície celular, tendo uma quantidade detectável de proteína receptora recombinante, tendo uma quantidade detectável de mRNA que codifica o receptor recombinante, tendo ou contendo um polinucleotídeo recombinante que codifica o receptor recombinante, e/ou tendo ou contendo um mRNA ou proteína que é um marcador substituto para a expressão do receptor recombinante. Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca

de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 99%, ou mais que 99% das células da composição de saída expressam o receptor recombinante. Em certas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50% das células da composição de saída expressam o receptor recombinante. Em certas concretizações, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 99%, ou mais que 99% de células T CD3+ da composição de saída expressam o receptor recombinante. Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50% de células T CD3+ da composição de saída expressam o receptor recombinante. Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 99%, ou mais que 99% de células T CD4+ da composição de saída expressam o receptor recombinante. Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de 50% de células T CD4+ da composição de saída expressam o receptor recombinante. Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca

de 60%, pelo menos, ou cerca de 65%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 97%, pelo menos, ou cerca de 99%, ou mais que 99% das células T CD8+ da composição de saída expressam o receptor recombinante. Em certas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50% das células T CD8+ da composição de saída expressam o receptor recombinante.

[00521] Em concretizações particulares, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% células viáveis. Em algumas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 75% células viáveis. Em certas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% células viáveis. Em algumas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% de células T CD3+ viáveis. Em concretizações particulares, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 75% de células T CD3+ viáveis. Em certas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de células T CD3+ viáveis. Em algumas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%,

pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% de células T CD4+ viáveis. Em certas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 75% de células T CD4+ viáveis. Em concretizações particulares, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de células T CD4+ viáveis. Em concretizações particulares, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% de células T CD8+ viáveis. Em algumas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 75% de células T CD8+ viáveis. Em certas concretizações, a composição de saída contém pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de células T CD8+ viáveis.

[00522] Em concretizações particulares, as células de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células que estão passando por apoptose e/ou são preparadas, imprimadas, e/ou estão entrando em sofrendo e/ou são preparadas, preparadas, e/ou entrando em apoptose. Em concretizações particulares, as células de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células positivas para um marcador apoptótico. Em algumas concretizações, menos que, ou cerca de 40%, menos que, ou cerca de 35%, menos que, ou cerca de 30%, menos que, ou cerca de 25%, menos que, ou cerca de 20%, menos que, ou cerca de 15%, menos que, ou cerca de 10%, menos que, ou cerca de 5%, ou menos que, ou cerca de 1% das células da composição de saída

expressam, contêm, e/ou são positivos para um marcador apoptótico. Em certas concretizações, menos que, ou cerca de 25% das células da composição de saída expressam, contêm, e/ou são positivos para um marcador de apoptose. Em certas concretizações, menos que, ou cerca de menos que, ou cerca de 10% de células da composição de saída expressam, contêm, e/ou são positivos para um marcador apoptótico.

[00523] Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% de células que expressam o receptor recombinante (por exemplo, CAR+) da composição da saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em certas concretizações, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, ou pelo menos, ou cerca de 95% das células que expressam o receptor recombinante (por exemplo, CAR+) da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 90% das células que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos,

ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, ou pelo menos da , ou cerca de 99,9% de células T CD3+ da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em certas concretizações, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de células T CD3+ da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de 90% de células T CD3+ da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, ou pelo menos, ou cerca de 99,9% de células T CD3+ que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em concretizações particulares, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de células T CD3+ que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em certas concretizações, pelo menos, ou cerca de 90% de células T CD3+ que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) da composição de saída são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como

uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada).

[00524] Em concretizações particulares, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% de células que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em certas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de expressão de receptor recombinante (por exemplo, CAR+) células de composições de saída de uma pluralidade produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 90% das células que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método divulgado aqui são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% de células T CD3+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal

como uma caspase (por exemplo, uma caspase ativada -3). Em certas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95% de células T CD3+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em concretizações particulares, em média, pelo menos, ou cerca de 90% de células T CD3+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75% de menos, cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, pelo menos, ou cerca de 99%, pelo menos, ou cerca de 99,9% de células T CD3+ que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em concretizações particulares, em média, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de células T CD3+ que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) de uma pluralidade de composições produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, células negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em certas concretizações, em média, pelo menos 90% de células T CD3+ que expressam receptor recombinante (por exemplo, CAR+) de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método aqui descrito são células viáveis, por exemplo, célu-

las negativas para um marcador apoptótico, tal como uma caspase (por exemplo, uma caspase-3 ativada). Em qualquer uma das concretizações que seguem, a pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui pode ser originária do mesmo ou de diferentes doadores. Em alguns aspectos, pelo menos duas da pluralidade de composições de saída são originárias de diferentes doadores. Em alguns aspectos, cada uma das várias composições de saída é originada de um dentre vários doadores diferentes, por exemplo, de cerca de 2, cerca de 5, cerca de 10, 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 ou mais do que cerca de 60 doadores diferentes, por exemplo, pacientes com necessidade de terapia celular, tal como uma terapia de célula T-CAR.

[00525] Em concretizações particulares, a maioria das células da composição de saída são ingênuas, memória central e/ou células efetoras de memória. Em concretizações particulares, a maioria das células da composição de saída são células ingênuas ou de memória central. Em algumas concretizações, a maioria das células da composição de saída são células de memória central. Em alguns aspectos, células menos diferenciadas, por exemplo, células de memória central, têm vida mais longa e esgotam-se menos rapidamente, desse modo aumentando a persistência e a durabilidade. Em alguns aspectos, um respondedor a uma terapia celular, tal como uma terapia de célula T-CAR, aumentou a expressão dos genes da memória central. Veja, por exemplo, Fraietta *et al.* (2018) Nat Med. 24 (5): 563-571.

[00526] Em certas concretizações, as células da composição de saída têm uma alta porção e/ou frequência de células de memória central. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca

de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos ou a, ou cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% das células da composição de saída são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em certas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% das células da composição de saída são células T de memória central. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65% das células da composição de saída são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos ou a, ou cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% das células T da composição de saída são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em certas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% das células T da composição de saída são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de

45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65% das células T da composição de saída são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos ou a, ou cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% de células T CD4+ da composição de saída são células T CD4+ de memória central. Em certas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% de células T CD4+ da composição de saída são células T CD4+ de memória central. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65% de células T CD4+ da composição de saída são células T CD4+ de memória central. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos ou a, ou cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% das células T CAR+ CD4+ da composição de saída são células T CAR+ CD4+ de memória central. Em certas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca

de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% das células T CAR+ CD4+ da composição de saída são células T CAR+ CD4+ de memória central. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65% das células T CAR+ CD4+ da composição de saída são células T CAR+ CD4+ de memória central. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos ou a, ou cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% das células T CD8+ da composição de saída são células de memória central T CD8+. Em certas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% das células T CD8+ da composição de saída são células de memória central T CD8+. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65% das células T CD8+ da composição de saída são células de memória central T CD8+. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos ou a, ou

cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% das células T CAR+ CD8+ da composição de saída são células T CAR+ CD8+ de memória central. Em certas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% das células T CAR+ CD8+ da composição de saída são células T CAR+ CD8+ de memória central. Em certas concretizações, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65% das células T CAR+ CD8+ da composição de saída são células T CAR+ CD8+ de memória central. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos ou a, ou cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% de células T CAR+ (por exemplo, as células T CD4+ e células T CD8+) da composição de saída são células T CD4+ ou CD8+ de memória central. Em certas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% das células T CAR+ (por exemplo, células T CD4+ e células T CD8+) da composição de saída são células T CD4+ ou CD8+ de memória central. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 30%, pelo menos ou a, ou cerca de 40%, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, pelo menos ou a, ou cerca de 70%, pelo menos ou a, ou cerca de 75%, pelo menos

ou a, ou cerca de 80%, pelo menos ou a, ou cerca de 85%, pelo menos ou a, ou cerca de 90%, pelo menos ou a, ou cerca de 95%, ou mais que 95% das células na composição são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+. Em algumas concretizações, pelo menos ou a, ou cerca de 50%, pelo menos ou a, ou cerca de 55%, pelo menos ou a, ou cerca de 60%, ou pelo menos ou a, ou cerca de 65% das células T CAR+ na composição são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+.

[00527] Em algumas concretizações, iterações do método produzem uma pluralidade das composições de saída, opcionalmente de amostras biológicas humanas em que o método é realizado entre uma pluralidade de diferentes pacientes individuais. Em algumas concretizações, a percentagem média (isto é, média) ou mediana de células de um fenótipo de memória na pluralidade das composições de saída é entre, ou cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65%. Em algumas concretizações, a percentagem média (isto é, média) ou mediana de células de um fenótipo de memória central na pluralidade das composições de saída é entre, ou cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65%. Em algumas concretizações, a percentagem média (isto é, média) ou mediana de células que são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+ na pluralidade das composições de saída é entre, ou cerca de 40% e a, ou

cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65%. Em algumas concretizações, a percentagem média (isto é, média) ou mediana de células que são CCR7+/CD45RA- or CCR7+/CD45RO+ na pluralidade das composições de saída é entre, ou cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65%. Em algumas concretizações, a percentagem média (isto é, média) ou mediana de células T CD4+ de memória central nas células T CD4+ modificadas (por exemplo, células T CD4+ CAR+) da pluralidade das composições de saída é entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65%. Em algumas concretizações, a percentagem média (isto é, média) ou mediana de células de memória central T CD8+ nas células T CD8+ modificadas (por exemplo, células T CD8+ CAR+) da pluralidade das composições de saída é entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65%. Em algumas concretizações, a percentagem média (isto é, média) ou mediana de células T de memória central (por exemplo, CD4+ células T de memória central e CD8+ células T de memória central) nas células T modificadas (por exemplo, células T CAR+) da pluralidade das com-

posições de saída é entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 65%, entre, ou de cerca de 40% e a, ou cerca de 45%, entre, ou de cerca de 45% e a, ou cerca de 50%, entre, ou de cerca de 50% e a, ou cerca de 55%, entre, ou de cerca de 55% e a, ou cerca de 60%, ou entre, ou de cerca de 60% e a, ou cerca de 65%.

[00528] Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, ou mais que a, ou cerca de 95% das células de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em certas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65% das células de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, ou mais que a, ou cerca de 95% das células de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+. Em algumas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65% das células de uma

pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+. Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, ou mais que a, ou cerca de 95% das células T de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em certas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65% das células T de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são de um fenótipo de memória, são de um fenótipo de memória central, ou são células T de memória central. Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, ou mais que a, ou cerca de 95% de células T CD4+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são células T CD4+ de memória central. Em certas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65% de células T CD4+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são células T CD4+ de memória central. Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%,

pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, ou mais que a, ou cerca de 95% das células T CD8+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são células de memória central T CD8+. Em certas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65% das células T CD8+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são células de memória central T CD8+. Em algumas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 75%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, ou mais que a, ou cerca de 95% das células T CD4+ e células T CD8+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são células T CD4+ ou CD8+ de memória central. Em certas concretizações, em média, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 65% das células T CD4+ e células T CD8+ de uma pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui são células T CD4+ ou CD8+ de memória central. Em qualquer uma das concretizações que seguem, a pluralidade de composições de saída produzidas pelo método descrito aqui pode ser originada do mesmo ou diferentes doadores. Em alguns aspectos, pelo menos duas da pluralidade de composições de saída são originadas de diferentes doadores. Em alguns aspectos, cada da pluralidade de composições de saída é originada de um dos vários diferentes doadores, por exemplo, de cerca de 2, 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, ou mais que cerca de 60 diferentes doadores, por exemplo, pacientes em necessidade de uma terapia celular, tal como uma terapia de célula T CAR.

[00529] Em certas concretizações, as células da composição de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células que são esgotadas e/ou senescentes. Em concretizações particulares, as células da composição de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células que são esgotadas e/ou senescentes. Em algumas concretizações, menos do que a, ou cerca de 40%, menos do que a, ou cerca de 35%, menos do que a, ou cerca de 30%, menos do que a, ou cerca de 25%, menos do que a, ou cerca de 20%, menos do que a, ou cerca de 15%, menos do que a, ou cerca de 10%, menos do que a, ou cerca de 5%, ou menos do que a, ou cerca de 1% das células da composição de saída são esgotados e/ou senescentes. Em certas concretizações, menos do que a, ou cerca de 25% das células da composição de saída são esgotados e/ou senescentes. Em certas concretizações, menos do que a, ou cerca de menos do que a, ou cerca de 10% das células da composição de saída são esgotados e/ou senescentes.

[00530] Em algumas concretizações, as células da composição da saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células negativas para a expressão de CD27 e CD28, por exemplo, expressão de superfície. Em concretizações particulares, como as células da composição de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células CD27-CD28. Em algumas concretizações, menos que, ou cerca de 40%, menos que, ou cerca de 35%, menos que, ou cerca de 30%, menos que, ou cerca de 25%, menos que, ou cerca de 20%, menos que, ou cerca de 15%, menos que, ou cerca de 10%, menos que, ou cerca de 5%, ou menos que, ou cerca de 1% das células da composição de saída são

células CD27-CD28-. Em certas concretizações, menos que, ou cerca de 25% das células da composição de saída são células CD27-CD28-. Em certas concretizações, menor que a, ou aproximadamente menor que, ou cerca de 10% das células da composição de saída são células CD27-CD28-. Em concretizações, menos que, ou cerca de 5% das células da composição de saída são células CD27-CD28-.

[00531] Em certas concretizações, as células da composição de saída têm uma alta porção e/ou frequência de células positivas para a expressão de CD27 e CD28, por exemplo, expressão de superfície. Em algumas concretizações, as células da composição de saída têm uma porção alta e/ou frequência de células CD27+ CD28+. Em algumas concretizações, pelo menos ou cerca de 50%, pelo menos ou cerca de 60%, pelo menos ou cerca de 70%, pelo menos ou cerca de 75%, pelo menos ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 85%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%, ou mais que, ou cerca de 95% das células da composição de saída são células CD27+ CD28+. Em certas concretizações, menos que, ou cerca de 25% das células da composição de saída são células CD27-CD28-. Em certas concretizações, pelo menos, ou cerca de 50% das células da composição de saída são células CD27+ CD28+. Em concretizações, pelo menos, ou cerca de 75% das células da composição de saída são células CD27+ CD28+.

[00532] Em concretizações particulares, as células da composição de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células que são células T_{EMRA} células. Em concretizações particulares, as células da composição de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células T_{EMRA}. Em algumas concretizações, menos que, ou cerca de 40%, menos que, ou cerca de 35%, menos que, ou cerca de 30%, menos que, ou cerca de 25%, menos que, ou cerca de 20%, menos que, ou cerca de 15%, menos que, ou cerca de 10%, menos que, ou cerca de

5%, ou menos que, ou cerca de 1% das células da composição de saída são células T_{EMRA} células. Em algumas concretizações, menos que, ou cerca de 25% das células da composição de saída são células T_{EMRA}. Em algumas concretizações, menos que 10% das células da composição da saída são células T_{EMRA}. Em algumas concretizações, menos que, ou cerca de 5% das células da composição de saída são células T_{EMRA}.

[00533] Em certas concretizações, as células da composição de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células que são negativas para CCR7 e positivas para expressão de CD45RA, por exemplo, expressão de superfície. Em algumas concretizações, as células da composição de saída têm uma baixa porção e/ou frequência de células CCR7-CD45RA+. Em concretizações particulares, menos que, ou cerca de 40%, menos que, ou cerca de 35%, menos que, ou cerca de 30%, menos que, ou cerca de 25%, menos que, ou cerca de 20%, menos que, ou cerca de 15%, menos que, ou cerca de 10%, menos que, ou cerca de 5%, ou menos que, ou cerca de 1% das células da composição de saída são células CCR7-CD45RA+. Em algumas concretizações menos que, ou cerca de 25% das células da composição de saída são as células CCR7-CD45RA+. Em concretizações particulares, menos que, ou cerca de menos que, ou cerca de 10% das células da composição de saída são células CCR7-CD45RA+. Em certas concretizações, menos que, ou cerca de 5% das células da composição de saída são as células CCR7-CD45RA+.

[00534] Em certas concretizações, as células da composição de saída têm uma produção de citocinas similar em resposta à estimulação de antígenos, às células da composição de saída produzidas por um processo alternativo. Em algumas concretizações, as células da composição da saída têm uma produção similar de uma citocina, por exemplo, TNF-alfa, IFN-gama e/ou IL-2, em resposta à estimulação de

antígeno às células da composição de saída produzidas processo alternativo e exemplar. Em algumas concretizações, as células da composição de saída, têm cerca de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1 vez, duas vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes na produção de uma ou mais citocinas em resposta à estimulação por um antígeno em comparação com um processo alternativo. Em algumas concretizações, a produção de uma citocina pode ser medida ou avaliada por técnicas conhecidas padrão, incluindo, mas não limitadas ao ELISA e/ou métodos de detecção com base em anticorpo.

[00535] Em concretizações particulares, as células da composição de saída têm uma porção, percentagem e/ou quantidade similar de células que produzem uma ou mais citocinas em resposta à estimulação do antígeno como a porção, percentagem e/ou quantidade das células de saída produzidas por um processo alternativo. Em certas concretizações, cerca de ou pelo menos 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou 100% das células da composição de saída produzem as referidas uma ou mais citocinas, por exemplo, TNF-alfa, IFN-gama e/ou IL-2, em resposta à estimulação de antígeno. Em concretizações particulares, a porção, percentagem e/ou quantidade de células da composição de saída que produzem como as referidas uma ou mais citocinas é cerca de, ou pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, ou 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, maior que a porção, percentagem, e/ou quantidade de células de saída produzidas pelo processo alternativo que produz as referidas uma ou mais citocinas. Em certas concretizações, a porção, percentagem e/ou quantidade de células que produzem uma citocina podem ser medidas ou avaliadas por qualquer técnica conhecida ou padrão, incluindo ensaios de manchamento de citocina intracelular (ICS).

[00536] Em concretizações particulares, a composição de saída

contém células funcionais que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um CAR. Em algumas concretizações, pelo menos uma parte das células que expressam um receptor recombinante produz uma ou mais citocinas em resposta à estimulação do antígeno. Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas incluem, mas não estão limitadas a, IL-2, TNF-alfa e/ou IFN-gama. Em algumas concretizações, as células da composição de saída, por exemplo, uma amostra e/ou uma porção das células de saída, são testadas, avaliadas e/ou medidas quanto à função estimulada por antígeno e/ou atividade. Em certas concretizações, as células são testadas quanto à produção de citocinas após ou durante a estimulação do antígeno por qualquer ensaio conhecido capaz de medir a produção, expressão e secreção de citocinas. Em algumas concretizações, as células são testadas com o ensaio de manchamento de citocina interno (ICS). Em concretizações particulares, pelo menos 25% de células CD4+ e menos que 15% de células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para IL-2 após a estimulação do antígeno, conforme medido por ICS. Em algumas concretizações, pelo menos 5% de células CD4+ e pelo menos 5% de células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para IFN-gama após a estimulação do antígeno, conforme medido por ICS. Em certas concretizações, pelo menos 40% de células CD4+ e pelo menos 20% de células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para TNF-alfa após a estimulação do antígeno, conforme medido por ICS. Em certas concretizações, pelo menos 2,5% das células CD4+ e pelo menos 2% das células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para todas as IL-2, IFN-gama e TNF-alfa após a estimulação do antígeno, conforme medido por ICS.

[00537] Em certas concretizações, pelo menos uma parte das células que expressam um receptor recombinante produz uma ou mais ci-

tocinas em resposta à ativação ou estimulação, por exemplo, ativação ou estimulação geral, ativação ou estimulação de células T e/ou ativação ou estimulação por PMA e ionomicina. Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas incluem, mas não estão limitadas à, IL-2, TNF-alfa e/ou IFN-gama. Em certas concretizações, as células da composição de saída, por exemplo, uma amostra e/ou uma porção das células de saída, são testadas, avaliadas e/ou medidas quanto à função e/ou atividade por ativação ou estimulação, por exemplo, com PMA e ionomicina. Em certas concretizações, as células são testadas quanto à produção de citocinas após ou durante a ativação ou estimulação por qualquer ensaio conhecido, capaz de medir a produção, expressão, e/ou secreção de citocinas, como com um ensaio ICS. Em algumas concretizações, as células são estimuladas com PMA e ionomicina e são avaliadas com um ensaio de ICS. Em algumas concretizações, pelo menos 50% de células CD4+ e pelo menos 25% de células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para IL-2 após estimulação ou ativação com PMA e ionomicina, conforme medido por ICS. Em algumas concretizações, pelo menos 30% de células CD4+ e menos 10% de células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para IFN-gama após estimulação ou ativação com PMA e ionomicina, conforme medido por ICS. Em certas concretizações, pelo menos 50% de células CD4+ e pelo menos 15% de células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para TNF-alfa após estimulação ou ativação com PMA e ionomicina, conforme medido por ICS. Em certas concretizações, pelo menos 10% das células CD4+ e pelo menos 5% das células CD8+ que expressam um receptor recombinante são positivas para todas as IL-2, IFN-gama e TNF-alfa após estimulação ou ativação com PMA e ionomicina, conforme medido por ICS.

[00538] Em algumas concretizações, administrar as células da

composição de saída a um indivíduo, por exemplo, um indivíduo com uma doença ou condição tal como um câncer, melhora a probabilidade e/ou possibilidade de sobrevivência. Por exemplo, em algumas concretizações, as células da composição da saída são administradas a um indivíduo com doença ou condição, a probabilidade e/ou possibilidade de sobrevivência em mais que, mais que de cerca de, ou mais que pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses ou mais que 1, 2, 3, 4, 5, 10 ou mais que 10 anos, e de pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100%. Em certas concretizações, a administração com células da composição de saída fornece pelo menos 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100 %, 125%, 150%, ou pelo menos, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes maior probabilidade e/ou possibilidade de sobrevivência do que a administração com células de saída de um processo alternativo.

[00539] Em certas concretizações, as células da composição de saída são administradas um indivíduo. Em algumas concretizações, como células da composição de saída são administradas para tratar uma doença ou condição. Em algumas concretizações, uma doença ou condição é câncer. Em algumas concretizações, as células, das composições de saída são administradas ao indivíduo, e o indivíduo experimenta uma redução em células cancerígenas e/ou volume do tumor. Em algumas concretizações, o indivíduo tem, tem cerca de, ou tem pelo menos 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100% de redução da quantidade de células cancerígenas e/ou redução de tumor após administração das células da composição de saída, por exemplo, em comparação com a quantidade de células cancerígenas e/ou o volume do tumor no indivíduo antes da administração. Em algumas concretizações, a administração de células da composição de saída resulta em uma redução aumentada do volume do tumor e/ou na quantidade de células cancerígenas no indi-

víduo em comparação com a redução no volume do tumor e/ou na quantidade de células cancerígenas no indivíduo após a administração de células de saída produzidas por um processo alternativo exemplar. Em concretizações particulares, a administração de células da composição de saída resulta em um aumento na redução do volume do tumor e/ou da quantidade de células cancerígenas no indivíduo de, de cerca de, ou de pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, de 5 vezes, em comparação com a redução do volume do tumor e/ou a quantidade de células cancerígenas no indivíduo após a administração de células produzidas pelo processo alternativo exemplar.

[00540] Em concretizações particulares, células da composição de saída, por exemplo, uma porção e/ou uma dose de células da composição de saída, são administradas a um indivíduo. Em algumas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem uma probabilidade e/ou possibilidade de obter e/ou experimentar uma resposta completa (CR). Em certas concretizações, a probabilidade e/ou possibilidade de obter e/ou experimentar CR é pelo menos de, ou cerca de 10%, pelo menos, ou cerca de 15%, pelo menos, ou cerca de 20%, pelo menos, ou cerca de 25%, pelo menos, ou cerca de 30%, pelo menos, ou cerca de 35%, pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%. Em certas concretizações, a probabilidade e/ou possibilidade de obter e/ou experimentar CR é pelo menos de, ou cerca de 25%. Em concretizações particulares, a probabilidade e/ou possibilidade de obter CR é pelo menos de, ou cerca de 50%.

[00541] Em certas concretizações, o indivíduo ao qual são adminis-

tradas as células da composição de saída tem uma probabilidade e/ou possibilidade de atingir e/ou experimentar ORR. Em certas concretizações, a probabilidade e/ou possibilidade de obter e/ou experimentar ORR é de pelo menos, ou cerca de pelo menos, ou cerca de 40%, pelo menos, ou cerca de 45%, ou pelo menos, ou cerca de 50%, pelo menos, ou cerca de 55%, pelo menos, ou cerca de 60%, pelo menos, ou cerca de 70%, pelo menos, ou cerca de 80%, pelo menos, ou cerca de 90%, pelo menos, ou cerca de 95%. Em certas concretizações, a probabilidade e/ou possibilidade de obter e/ou experimentar ORR é pelo menos de, ou cerca de 80%. Em concretizações particulares, a probabilidade e/ou possibilidade de atingir ORR é pelo menos de, ou cerca de 90%. Em certas concretizações, a probabilidade e/ou possibilidade de atingir ORR é de, ou é de cerca de 100%.

[00542] Em algumas concretizações, a eficácia das células de saída, por exemplo, a probabilidade de um indivíduo obter e/ou experimentar CR ou ORR após a administração de células da composição de saída é maior que a de uma composição celular terapêutica contendo células que expressam um receptor recombinante que são produzidas por um processo alternativo. Em certas concretizações, existe uma probabilidade de pelo menos, ou cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 %, 100%, 125%, 150%, 1 vez, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 50 vezes, ou 100 vezes maior de obter CR ou ORR após a administração das células de saída em comparação com a administração das células da composição celular terapêutica produzidas pelo processo alternativo.

[00543] Em concretizações particulares, as células da composição de saída têm uma atividade citolítica similar em relação às células que expressam um antígeno ligado por e/ou reconhecido pelo receptor recombinante (por exemplo, células alvo) como células de saída produ-

zidas por um processo alternativo exemplar. Em algumas concretizações, quando as células da composição da saída são expostas a células que expressam o antígeno, por exemplo, as células alvo, as células da composição da saída matam, matam cerca de, ou matam pelo menos, ou cerca de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% das células que expressam o antígeno. Em certas concretizações, as células da composição de saída matam pelo menos, ou cerca de 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, ou 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes ou 5 vezes mais células que expressam o antígeno, por exemplo, células alvo, do que as células produzidas por um processo alternativo exemplar sob condições similares ou iguais.

[00544] Em algumas concretizações, as células de saída produzidas pelos métodos aqui fornecidos têm um alto e/ou relativamente alto grau de segurança. Em algumas concretizações, células da composição de saída, por exemplo, uma porção e/ou uma dose de células da composição de saída, são administradas a um indivíduo. Em algumas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem risco, probabilidade e/ou possibilidade de experimentar uma toxicidade, por exemplo, CRS ou neurotoxicidade, que é menor que, ou cerca de 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5%. Em algumas concretizações, a toxicidade é qualquer grau de neurotoxicidade ou CRS. Em certas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem um risco, probabilidade e/ou possibilidade de menos que 80% de experimentar qualquer grau de CRS ou neurotoxicidade. Em concretizações particulares, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem um risco, probabilidade e/ou possibilidade de menos que 80% de experimentar qualquer grau de CRS ou neurotoxicidade.

[00545] Em algumas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição da saída tem um risco, probabilidade, e/ou possibilidade de experimentar um CRS de grau 3 ou superior que seja menor que, ou cerca de 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5%. Em algumas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem um risco, probabilidade, e/ou probabilidade menor que 10% de experimentar um CRS de grau 3 ou superior. Em algumas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem um risco, probabilidade e/ou possibilidade menor que 5% de experimentar um CRS de grau 3 ou superior.

[00546] Em certas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem um risco, probabilidade e/ou possibilidade de experimentar uma neurotoxicidade de grau 3 ou superior, menor que, ou cerca de 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou 5%, ou que é de, ou é de cerca de 0%, e/ou é desprezível. Em algumas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem um risco, probabilidade e/ou possibilidade de menos que 5% para experimentar uma neurotoxicidade de grau 3 ou superior. Em algumas concretizações, o indivíduo ao qual são administradas células da composição de saída tem um risco, probabilidade, e/ou possibilidade de cerca de 0% e/ou insignificante de experimentar uma neurotoxicidade de grau 3 ou superior.

I. Formulações de Meios Livres de Soro e Componentes Relacionados

[00547] O presente pedido fornece um meio livre de soro contendo um aminoácido sintético (por exemplo, uma forma dipeptídica de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina), uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) e pelo menos uma proteína. O presente pedido também fornece um meio basal líquido compreendendo pelo

menos um aminoácido sintético (por exemplo, uma forma dipeptídica de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina), em que o meio basal é livre de uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) e uma proteína. O presente pedido também fornece um suplemento congelado que compreende uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) e, em alguns casos, pelo menos uma proteína, tal como uma proteína de substituição de soro. Um ou mais outros suplementos podem ser adicionados, incluindo um ou mais suplementos que contenham menos uma proteína, tal como uma proteína de substituição de soro ou um ou mais outros componentes que apoiam o crescimento e a expansão das células. Em algumas concretizações, uma concentração do aminoácido sintético (por exemplo, uma forma dipeptídica de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina) é de, ou de cerca de 0,5 mM a ou cerca de 5 mM (tal como 2 mM). Em algumas concretizações, uma concentração de L-glutamina é de, ou de cerca de 0,5 mM a ou cerca de 5 mM (tal como 2 mM). Em algumas concretizações, pelo menos uma proteína é uma proteína humana ou uma proteína recombinante, tal como uma proteína de substituição de soro, por exemplo, albumina. Em algumas concretizações, o meio livre de soro também compreende uma ou mais citocinas (tais como IL-2, IL-7 ou IL-15). Em algumas concretizações, o meio livre de soro não compreende vermelho fenol.

[00548] Em algumas concretizações, o meio livre de soro fornecido é produzido ou preparado a partir de um meio basal líquido e um ou mais suplementos.

[00549] Em algumas concretizações, é fornecido um meio basal líquido contendo um aminoácido sintético capaz de ser convertido em L-glutamina em uma cultura celular, tal como um aminoácido sintético que é uma forma dipeptídica de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina. Em alguns casos, o meio basal é livre de L-glutamina e

uma proteína. Em algumas concretizações, uma concentração do aminoácido sintético (por exemplo, uma forma dipeptídica de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina) é de, ou de cerca de 0,5 mM a, ou cerca de 5 mM (tal como 2 mM). Em algumas concretizações, pelo menos uma proteína é uma proteína derivada de humanos, uma proteína recombinante ou ambas. Em algumas concretizações, o meio basal não compreende vermelho fenol.

[00550] Em algumas concretizações, é fornecido um suplemento compreendendo pelo menos uma proteína e uma forma livre de glutamina, por exemplo, L-glutamina, em que o suplemento está congelado ou foi congelado após a L-glutamina se tornar um componente mesmo. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina no suplemento é menor que 200 mM, tal como menor que 150 mM, 100 mM ou menor, tal como 20 mM a 120 mM ou 40 mM a 100 mM ou cerca de 80 mM. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina após o suplemento ter sido combinado com o meio basal é de cerca de 0,5 mM a cerca de 5 mM (tal como 2 mM). Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína não é de origem não mamífera. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína é uma proteína humana ou uma proteína derivada de humanos ou é recombinante. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína inclui albumina, por exemplo, albumina humana ou humana recombinante.

A. Meio basal

[00551] Em algumas concretizações, o meio basal compreende um aminoácido. Em algumas concretizações, o aminoácido compreende ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, serina, glutamina, histidina, glicina, treonina, arginina, alanina, tirosina, cisteína, valina, metionina, norvalina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, hidroxiprolina, sarcosina e/ou prolina.

[00552] Em algumas concretizações, o meio basal compreende pelo menos um aminoácido sintético. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é capaz de ser convertido em uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) em uma cultura celular compreendendo uma célula. Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula humana. Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula imune. Em algumas concretizações, a célula é uma célula geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é geneticamente modificada para expressar um receptor recombinante (por exemplo, um receptor de antígeno quimérico). Em algumas concretizações, a célula é um receptor de antígeno químico (CAR) que expressa células T.

[00553] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é uma forma estabilizada de glutamina (isto é, L-glutamina). Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é mais estável que a glutamina (isto é, L-glutamina) em uma solução aquosa (por exemplo, um meio basal). Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina no meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) durante pelo menos cerca de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ou 14 dias no meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) por pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas no meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) durante pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses no meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) durante pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 anos no meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos cerca de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ou 14 dias no meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas no meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses em meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 anos no meio basal.

[00554] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é solúvel em uma solução aquosa (por exemplo, um meio basal). Em algumas concretizações, a solubilidade do aminoácido sintético na solução aquosa é maior que uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina).

[00555] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é capaz de ser transportado para uma célula, onde pode ser convertido em uma forma livre de glutamina (ou seja, L-glutamina). Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula imune. Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é geneticamente modificada para expressar um receptor recombinante (por exemplo, um receptor de antígeno quimérico). Em algumas concretizações, a célula é um recep-

tor de antígeno quimérico (CAR) que expressa células T.

[00556] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é um dipeptídeo. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é um tripeptídeo. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é uma forma dipeptídica de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina).

[00557] Em algumas concretizações, a concentração da forma dipeptídica de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio basal é de cerca de 0,5 mM-5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma dipeptídica de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio basal é de, ou de cerca de 2 mM. Em algumas concretizações, uma concentração da forma dipeptídica de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) é de, ou de cerca de 0,5mM-1mM, 0,5mM-1,5mM, 0,5mM-2mM, 0,5mM-2,5mM, 0,5mM-3mM, 0,5mM-3,5mM, 0,5mM-4mM, 0,5mM-4,5mM, 0,5mM-5mM, 1mM-1,5mM, 1mM-2mM, 1mM-2,5mM, 1mM-3mM, 1mM-3,5mM, 1mM-4mM, 1mM-4,5mM, 1mM-5mM, 1,5mM-2mM, 1,5mM-2,5mM, 1,5mM-3mM, 1,5mM-3,5mM, 1,5mM-4mM, 1,5mM-4,5mM, 1,5mM-5mM, 2mM-2,5mM, 2mM-3mM, 2mM-3,5mM, 2mM-4mM, 2mM-4,5mM, 2mM-5mM, 2,5mM-3mM, 2,5 mM-3,5mM, 2,5mM-4mM, 2,5mM-4,5mM, 2,5mM-5mM, 3mM-3,5mM, 3mM-4mM, 3mM-4,5mM, 3mM-5mM, 3,5mM-4mM, 3,5mM-4,5mM, 3,5mM-5mM, 4mM-4,5mM, 4mM-5mM ou 4,5mM-5mM, cada um inclusive. Em algumas concretizações, a concentração da forma dipeptídica de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio basal é de, ou de cerca de 5mM-7,5mM, 5mM-10mM, 5mM-12,5mM, 5mM-15mM, 5mM-17,5mM, 5mM-20mM, 7,5mM-10mM, 7,5mM-12,5mM, 7,5mM-15mM, 7,5mM-17,5mM, 7,5mM-20mM, 10mM-12,5mM, 10mM-15mM, 10mM-17,5mM, 10mM-20mM, 12,5mM-15mM, 12,5mM-17,5mM, 12,5mM-20mM, 15mM-17,5mM, 15mM-20mM ou 17,5mM-20mM, cada um in-

clusive. Em algumas concretizações, uma forma de concentração de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio basal é menor que cerca de 0,5mM, 1mM, 1,5mM, 2mM, 2,5 mM, 3mM, 3,5mM, 4mM, 4,5mM ou 5mM. Em algumas concretizações, uma concentração da forma dipeptídica de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio basal é de, ou de cerca de 2 mM. Em algumas concretizações, uma concentração da forma dipeptídica de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio basal é no máximo a, ou cerca de 2mM, 2,5mM, 3mM, 3,5mM, 4mM, 4,5mM, 5mM, 5,5mM, 6mM, 6,5mM, 7mM, 7,5mM, 8mM, 8,5mM, 9mM, 9,5mM, 10mM, 12,5mM, 15mM, 17,5mM ou 20mM.

[00558] Em algumas concretizações, o meio basal não compreende L-glutamina ou não compreende uma quantidade significativa de L-glutamina. Em algumas concretizações, o meio basal compreende L-glutamina. Em algumas concretizações, a concentração da L-glutamina no meio basal é de, ou cerca de ou menor que, ou cerca de 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, ou 0,5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da L-glutamina no meio basal é de, ou de cerca ou menor que, ou cerca de 1mM, 2mM, 3mM, 4mM ou 5mM.

[00559] Em algumas concretizações, os referidos um ou mais aminoácidos, incluindo pelo menos um aminoácido sintético capaz de ser convertido em uma forma livre de glutamina (ou seja, L-glutamina), por exemplo, forma dipeptídica de L-glutamina, tal como L-alanil-L-glutamina, é fornecida em um meio básico. Em algumas concretizações, o meio basal é um meio artificial ou sintético. Em algumas concretizações, o meio basal é uma solução salina balanceada (por exemplo, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). Em algumas concretizações, o meio basal é selecionado de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimal Essential Medium (MEM), Basal Medium Eagle (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, Glasgow's Minimal Essential Medium

(GMEM), alfa Minimal Essential Medium (alfa MEM), Iscove's Modified Dulbecco's Medium e M199. Em algumas concretizações, o meio basal é um meio complexo (por exemplo, RPMI-1640, IMDM). Em algumas concretizações, o meio basal é o OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion Basal Medium (ThermoFisher).

[00560] Em algumas concretizações, o meio basal compreende uma mistura de nutrientes de sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, opcionalmente também contém vitaminas, ácidos orgânicos, antioxidantes e/ou tampões.

[00561] Em algumas concretizações, o meio basal compreende CO_3 e HCO_3 . Em algumas concretizações, o teor de CO_3/HCO_3 do meio basal é balanceado com CO_2 gasoso (por exemplo, 5-10%), desse modo mantendo um pH ideal no meio. Em algumas concretizações, o meio basal compreende um zuitérion, HEPES. Em algumas concretizações, o meio basal compreende o vermelho de fenol. Em algumas concretizações, o meio basal não compreende vermelho fenol.

[00562] Em algumas concretizações, o meio basal compreende um sal inorgânico. Em algumas concretizações, o sal inorgânico promove o equilíbrio osmótico. Em algumas concretizações, o sal inorgânico regula o potencial da membrana, fornecendo íons sódio, potássio e cálcio.

[00563] Em algumas concretizações, o meio basal compreende um ou mais carboidratos. Em algumas concretizações, o carboidrato compreende glicose. Em algumas concretizações, o carboidrato compreende galactose. Em algumas concretizações, o carboidrato compreende maltose. Em algumas concretizações, o carboidrato compreende frutose.

[00564] Em algumas concretizações, o meio basal compreende ácido graxo. Em algumas concretizações, o meio basal compreende lipídios. Em algumas concretizações, o meio basal compreende vita-

mina (por exemplo, vitamina A, vitamina B7, vitamina B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina E). Em algumas concretizações, o meio basal compreende um elemento de traço. Em algumas concretizações, o elemento de traço compreende cobre. Em algumas concretizações, o elemento de traço compreende zinco. Em algumas concretizações, o elemento de traço compreende selênio. Em algumas concretizações, o elemento de traço compreende intermediário do ácido tricarbóxico.

[00565] Em algumas concretizações, o meio basal contém uma mistura de sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos e, opcionalmente, vitaminas, ácidos orgânicos e/ou tampões ou outros nutrientes de cultura celular bem conhecidos. Além de nutrientes, o meio também ajuda a manter o pH e a osmolaridade. Em alguns aspectos, os reagentes do meio basal sustentam o crescimento, proliferação e/ou expansão celular. Uma grande variedade de meios basais comercialmente disponíveis é bem conhecida por alguém versado na técnica e inclui Dulbeccos' Modified Eagles Medium (DMEM), o Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Iscove modified Dulbeccos' médium e Hams médium. Em algumas concretizações, o meio basal é o Iscove modified Dulbeccos' médium, RPMI-1640 ou α -MEM.

[00566] Em algumas concretizações, o meio basal está livre de uma proteína. Em algumas concretizações, o meio basal está livre de uma proteína humana (por exemplo, uma proteína sérica humana). Em algumas concretizações, o meio basal é livre de soro. Em algumas concretizações, o meio basal é livre de soro derivado de ser humanos. Em algumas concretizações, o meio basal é livre de uma proteína recombinante. Em algumas concretizações, o meio basal é livre de uma proteína humana e de uma proteína recombinante.

[00567] Em algumas concretizações, o meio basal compreende uma proteína ou um peptídeo. Em algumas concretizações, a proteína é uma albumina ou substituto de albumina. Em algumas concretiza-

ções, a albumina é uma albumina derivada de humano. Em algumas concretizações, uma albumina é uma albumina recombinante. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina de soro humano natural. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina sérica humana recombinante. Em algumas concretizações, uma albumina é uma albumina recombinante de uma fonte não humana. Os substitutos da albumina podem ser qualquer fonte de proteína ou polipeptídeo. Exemplos de tais amostras de proteínas ou polipeptídeos incluem, mas não estão limitados a um extrato hipofisário bovino, hidrolisado de plantas (por exemplo, hidrolisado de arroz), albumina fetal de bezerro (fetuina), albumina de ovo, albumina sérica humana (HSA) ou outras albuminas derivadas de animal, extrato de pintinho, extrato de embrião bovino, AlbuMAX® I e AlbuMAX® II. Em algumas concretizações, a proteína ou peptídeo compreende uma transferrina. Em algumas concretizações, a proteína ou peptídeo compreende uma fibronectina. Em algumas concretizações, a proteína ou peptídeo compreende aprotinina. Em algumas concretizações, a proteína compreende fetuina.

[00568] Em algumas concretizações, o meio basal (por exemplo, um meio basal) é uma formulação líquida. Em algumas concretizações, o meio basal (por exemplo, um meio basal) não foi congelado ou é instruído a não ser congelado (por exemplo, de acordo com seu protocolo) antes do uso pretendido. Em algumas concretizações, o meio basal é armazenado entre 2°C a 8°C. Em algumas concretizações, o meio basal é armazenado em temperatura ambiente. Em algumas concretizações, o meio basal é estável durante pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 semanas, quando armazenado entre 2°C a 8°C. Em algumas concretizações, o meio basal é estável durante pelo menos que 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 meses quando armazenado entre 2°C e 8°C.

B. Suplemento

[00569] Em algumas concretizações, é aqui fornecido um suple-

mento, tal como, um primeiro suplemento, compreendendo uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina). Em algumas concretizações, esse suplemento é congelado antes do uso e/ou incorporação em um meio de base. Em algumas concretizações, o suplemento, tais como, estes aqui descritos destina-se a ser usado como um suplemento de meio (por exemplo, um suplemento de meio para um meio basal). Em algumas concretizações, o primeiro suplemento destina-se a ser usado como um suplemento para a manutenção, expansão e/ou ativação de uma célula. Em algumas concretizações, o primeiro suplemento destina-se a ser usado como um suplemento para a expansão de uma célula. Em algumas concretizações, o primeiro suplemento compreende um suplemento congelado que compreende pelo menos uma proteína e uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina), em que um meio de cultura celular basal suplementado com o primeiro suplemento é capaz de apoiar a expansão de uma célula. Em algumas concretizações, a célula é uma célula primária. Em algumas concretizações, a célula é uma célula imune. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T CD4 ou célula T CD8. Em algumas concretizações, a célula é uma célula do ser humano. Em algumas concretizações, a célula é uma célula imune do ser humano. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T do ser humano. Em algumas concretizações, a célula é uma célula imune primária do ser humano. Em algumas concretizações, a célula é uma célula geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é uma célula geneticamente modificada derivada de humanos. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T geneticamente modificada (por exemplo, uma célula T que expressa um receptor de antígeno quimérico (CAR)) de humanos.

[00570] Em algumas concretizações, o primeiro suplemento é armazenado ou recomenda-se que seja armazenado em ou cerca de -20

°C a em ou cerca de 0 °C antes do uso pretendido. Em algumas concretizações, o suplemento é armazenado ou é recomendado que seja armazenado a menos de cerca de 0 °C. Em algumas concretizações, o suplemento é congelado imediatamente ou rapidamente após a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) se tornar um componente do mesmo até o momento em que o suplemento é usado para o uso pretendido. Em algumas concretizações, o suplemento é congelado a maior parte do tempo após a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) se tornar um componente do mesmo até o momento em que o suplemento é usado para o uso pretendido. Em algumas concretizações, o suplemento não é mantido como líquido por mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias após a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) se tornar um componente do mesmo até o momento em que o suplemento é usado para o uso pretendido. Em algumas concretizações, o suplemento não é mantido como líquido por mais do que ou mais do que cerca de 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 horas após a forma livre de glutamina (ou seja, L-glutamina) se tornar um componente do mesmo até o momento em que o suplemento é utilizado para o uso pretendido. Em algumas concretizações, o suplemento é congelado na maior parte do tempo, antes e depois da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) se tornar um componente do mesmo até o momento em que o suplemento é usado para o uso pretendido. Em algumas concretizações, o suplemento está em temperatura ambiente ou abaixo dela (por exemplo, a temperatura do suplemento está abaixo ou abaixo de cerca de 20 °C, 15 °C, 10 °C, 5 °C ou 0 °C) quando a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) se torna um componente do suplemento.

[00571] Em algumas concretizações, a L-glutamina no suplemento não precipita quando o suplemento é descongelado. Em algumas concretizações, a L-glutamina no suplemento não precipita quando o suplemento é um líquido. Em algumas concretizações, a L-glutamina no

suplemento não precipita quando o suplemento é descongelado sob temperatura ambiente. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina no suplemento é de, ou de cerca de ou menos do que ou menos que cerca de 200 mM, 180 mM, 160 mM, 140 mM, 120 mM, 100 mM ou 80 mM. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina no suplemento é de, ou de cerca de 10 mM a de ou cerca de 30 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 50 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 70 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 50 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 70 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 70 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 110 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 110 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 110 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 130 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 130 mM a de ou cerca

de 170 mM, ou de ou a cerca de 150 mM a de ou cerca de 170 mM. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina no suplemento é cerca de 80 mM.

[00572] Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no suplemento é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio é de, ou de cerca de 0,5 mM-5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio basal é de, ou de cerca de 2 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) é de, ou de cerca de 0,5 mM-1 mM, 0,5 mM-1,5 mM, 0,5 mM-2 mM, 0,5 mM-2,5 mM, 0,5 mM-3 mM, 0,5 mM-3,5 mM, 0,5 mM-4 mM, 0,5 mM-4,5 mM, 0,5 mM-5 mM, 1 mM-1,5 mM, 1 mM-2 mM, 1 mM-2,5 mM, 1 mM-3 mM, 1 mM-3,5 mM, 1 mM-4 mM, 1 mM-4,5 mM, 1 mM-5 mM, 1,5 mM-2 mM, 1,5 mM-2,5 mM, 1,5 mM-3 mM, 1,5 mM-3,5 mM, 1,5 mM-4 mM, 1,5 mM-4,5 mM, 1,5 mM-5 mM, 2 mM-2,5 mM, 2 mM-3 mM, 2 mM-3,5 mM, 2 mM-4 mM, 2 mM-4,5 mM, 2 mM-5 mM, 2,5 mM-3 mM, 2,5 mM-3,5 mM, 2,5 mM-4 mM, 2,5 mM-4,5 mM, 2,5 mM-5 mM, 3 mM-3,5 mM, 3 mM-4 mM, 3 mM-4,5 mM, 3 mM-5 mM, 3,5 mM-4 mM, 3,5 mM-4,5 mM, 3,5 mM-5 mM, 4 mM-4,5 mM, 4 mM-5 mM, ou 4,5 mM-5 mM, cada inclusiva. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio basal é de, ou de cerca de 5 mM-7,5 mM, 5 mM-10 mM, 5 mM-12,5 mM, 5 mM-15 mM, 5 mM-17,5 mM, 5 mM-20 mM, 7,5 mM-10 mM, 7,5 mM-12,5 mM, 7,5 mM-15 mM, 7,5 mM-17,5 mM, 7,5 mM-20 mM, 10 mM-12,5 mM, 10 mM-15 mM, 10 mM-17,5 mM, 10 mM-20 mM, 12,5 mM-15 mM, 12,5 mM-17,5 mM, 12,5 mM-20 mM, 15 mM-17,5 mM, 15 mM-20 mM, ou 17,5 mM-20 mM, cada inclusiva. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-

glutamina) no meio basal é pelo menos a, ou cerca de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM ou 5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio basal é no máximo a, ou cerca de 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM, 5,5 mM, 6 mM, 6,5 mM, 7mM, 7,5 mM, 8 mM, 8,5 mM, 9 mM, 9,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 17,5 mM, ou 20 mM.

[00573] Em algumas concretizações, o primeiro suplemento contém um ou mais componentes adicionais. Em algumas concretizações, um outro suplemento, tal como, um segundo suplemento, é fornecido para fornecer um ou mais componentes adicionais. Em algumas concretizações, os suplementos, o primeiro suplemento e opcionalmente um ou mais outros suplementos, por exemplo, segundo suplemento, são combinados com o meio basal para fornecer um ou mais componentes adicionais ao meio basal.

[00574] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem pelo menos uma proteína. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína não é de origem não mamífera. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína é humana ou derivada de humano. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína é recombinante. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína inclui albumina, transferrina, insulina, fibronectina, aprotinina ou fetuína. Em algumas concretizações, a proteína compreende uma ou mais de albumina, insulina ou transferrina, opcionalmente uma ou mais de uma albumina, insulina ou transferrina humana ou recombinante.

[00575] Em algumas concretizações, a proteína é uma albumina ou substituto de albumina. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina derivada de humano. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina recombinante. Em algumas concretizações, a al-

bumina é uma albumina de soro humana natural. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina de soro humana recombinante. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina recombinante de uma fonte não humana. Substitutos de albumina podem ser qualquer fonte de polipeptídeo ou proteína. Exemplos de tais amostras de proteína ou polipeptídeo incluem, mas não estão limitados a, extrato de hipófise bovina, hidrolisado de planta (por exemplo, hidrolisado de arroz), albumina fetal da panturrilha (fetuína), albumina de ovo, albumina de soro humano (HSA) ou outras albuminas derivadas de animal, extrato de pinto, extrato de embrião bovino, AlbuMAX® I e AlbuMAX® II.

[00576] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem uma albumina. Em algumas concretizações, a albumina é albumina humana ou derivada de albumina humana. Em algumas concretizações, a albumina é derivada de soro humano ou plasma humano. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina recombinante. Em algumas concretizações, a albumina recombinante é derivada de humano. Em algumas concretizações, a albumina recombinante não é derivada de humano. Em algumas concretizações, o suplemento compreende uma albumina natural. Em algumas concretizações, a albumina natural é derivada de humano. Em algumas concretizações, a albumina natural não é derivada de humano. Em algumas concretizações, a concentração da albumina no suplemento é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a ou cerca da concentração da albumina no meio é de, ou de cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 2 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 4 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 6 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL,

a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 4 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 6 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 4mg/mL até, ou até cerca de 6 mg/mL, a ou a cerca de 4 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 4 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 4 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 6 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 6 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 6 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 8mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 8 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 10 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, ou a, ou a cerca de 10mg/mL até, ou até cerca de 15 mg/mL cada inclusiva. Em algumas concretizações, a, ou cerca da albumina no meio é de, ou de cerca de 5 mg/mL.

[00577] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem uma transferrina ou substituto de transferrina. Em algumas concretizações, um substituto de transferrina é um composto que pode substituir a transferrina no suplemento para fornecer substancialmente resultados similares à transferrina. Exemplos de substitutos de transferrina incluem, mas não estão limitados a, qualquer composto de quelato de ferro. Compostos de quelato de ferro que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a, quelatos de ferro de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido etileno glicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), mesilato de deferoxamina, dimercaptopropanol, ácido dietilenotriaminapentaacético (DPTA) e ácido trans-1,2-diaminociclo-hexano-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA), bem como, um quelato de citrato férrico e um quelato de sulfato ferroso. Em algumas concretizações, a transferrina é transferrina saturada de ferro. Em algumas concretizações, a transferrina é transferrina hu-

mana saturada de ferro.

[00578] Em algumas concretizações, a transferrina ou substituto de transferrina é transferrina humana ou é derivada de transferrina humana. Em algumas concretizações, a transferrina ou substituto de transferrina é derivada de soro humano ou plasma. Em algumas concretizações, a transferrina ou substituto de transferrina é transferrina recombinante. Em algumas concretizações, a concentração da transferrina é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a concentração da transferrina no meio é de, ou de cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 50 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 100 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 100 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de

650 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca

de 400 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até

cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 600 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 600 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, ou a, ou a cerca de 650 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração da transferrina é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a concentração da transferrina no meio é de, ou de cerca de 100 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração da transferrina é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a concentração da transferrina no meio é de, ou de cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L.

[00579] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem insulina ou substituto de insulina. Em algumas concretizações, um substituto de insulina é um composto contendo zinco que pode ser usado no lugar de insulina para fornecer substancialmente resultados similares à insulina. Exemplos de substitutos de insulina incluem, mas não estão limitados a, cloreto de zinco, nitrato de zinco, brometo de zinco e sulfato de zinco. Algumas insulinas são conhecidas por aqueles versados na técnica. Veja, Gilman, A.G. *et al*, Eds., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Pergamon Press, Nova Iorque, 1990, pp. 1463-1495. Em algumas concretizações, insulina, ao invés de um substituto de insulina, é usada no suplemento e no meio. Em algumas concretizações, a insulina é insulina de zinco. Em algumas concretizações, a insulina é insulina de zinco humana.

[00580] Em algumas concretizações, a insulina é uma insulina humana ou derivada de insulina humana. Em algumas concretizações, a

insulina é uma insulina recombinante. Em alguma concretização, a insulina é uma insulina humana recombinante. Em alguma concretização, a concentração da insulina (ou substituto de insulina) é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a, ou cerca da concentração da insulina (ou substituto de insulina) no meio é cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 2,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 7,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 7,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 7,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 5

mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L

até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 22,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 22,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 22,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 25 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, ou a, ou a cerca de 27,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração de insulina ou substituto de insulina no meio é de, ou de cerca de 10 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração de insulina ou substituto de insulina no meio é de, ou de cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L.

[00581] Em algumas concretizações, o suplemento, por exemplo, primeiro suplemento, é preparado adicionando ou misturando L-glutamina com suplementos existentes contendo um ou mais componentes desejados. Em algumas concretizações, L-glutamina é adicionada ou misturada com um suplemento de substituição de soro, por exemplo, *Immune Cell Serum Replacement* (ThermoFisher, #A2598101). Em algumas concretizações, a L-glutamina é adicionada ou misturada com um suplemento que inclui uma substituição de soro de célula imune descrita em Smith *et al. Clin Transl Immunology*. 2015 Jan; 4(1): e31. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina no suplemento é de, ou de cerca de 10 mM a de ou cerca de 30 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 50 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 70 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 50 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 70 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou

cerca de 30 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 30 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 70 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 50 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 90 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 70 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 110 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 90 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 110 mM a de ou cerca de 130 mM, de ou cerca de 110 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 110 mM a de ou cerca de 170 mM, de ou cerca de 130 mM a de ou cerca de 150 mM, de ou cerca de 130 mM a de ou cerca de 170 mM, ou a, ou a cerca de 150 mM a de ou cerca de 170 mM. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina no suplemento é de, ou de cerca de 80 mM.

[00582] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais usam um fator de desenvolvimento. Em algumas concretizações, o fator de desenvolvimento compreende o fator de desenvolvimento epidérmico (EGF). Em algumas concretizações, o fator de desenvolvimento compreende o fator de desenvolvimento de fibroblastos (FGF). Em algumas concretizações, o fator de desenvolvimento compreende fator de desenvolvimento semelhante à insulina (IGF). Em algumas concretizações, o fator de desenvolvimento compreende o fator de desenvolvimento nervoso (NGF). Em algumas concretizações, o fator de desenvolvimento compreende o fator de desenvolvimento derivado de plaquetas (PDGF). Em algumas concretizações, o fator de

desenvolvimento compreende fator de desenvolvimento transformador (TGF).

[00583] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem um hormônio (por exemplo, hormônio do desenvolvimento, insulina, hidrocortisona, tri-iodotironina, estrogênio, androgênio, progesterona, prolactina, hormônio folículo estimulante, peptídeo liberador de gastrina). Em alguma concretização, um ou mais componentes adicionais incluem alfa-globulina ou beta-globulina. Em alguma concretização, um ou mais componentes adicionais incluem um peptídeo ou fração peptídica (por exemplo, hidrolisado de proteína derivado de animal, micro-organismo ou planta).

[00584] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem um lipídio. Em algumas concretizações, o lipídio compreende colesterol. Em algumas concretizações, o lipídio compreende esteroide. Em algumas concretizações, o lipídio compreende ácido graxo (por exemplo, palmitato, estearato, oleato, linoleato). Em algumas concretizações, o lipídio compreende etanolamina. Em algumas concretizações, o lipídio compreende colina. Em algumas concretizações, o lipídio compreende inositol.

[00585] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais compreende um metal de transição. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende ferro. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende zinco. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende cobre. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende cromo. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende iodo. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende cobalto. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende selênio. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende magnésio. Em algumas concretizações, o metal de transição compreende molibdênio.

[00586] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem uma vitamina. Em algumas concretizações, a vitamina compreende uma vitamina solúvel em gordura (por exemplo, Vitamina A, Vitamina D, Vitamina E, Vitamina K). Em algumas concretizações, a vitamina compreende uma vitamina solúvel em água (por exemplo, B1, B2, B6, B₁₂, C, folato).

[00587] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem uma poliamina. Em algumas concretizações, a poliamina compreende putrescina. Em algumas concretizações a poliamina compreende espermidina. Em algumas concretizações, a poliamina compreende espermina.

[00588] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem um redutor. Em algumas concretizações, o redutor compreende um 2-mercaptoetanol. Em algumas concretizações, o redutor inclui um alfa-tioglicerol. Em algumas concretizações, o redutor compreende glutathione reduzido.

[00589] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem um aditivo de proteção. Em algumas concretizações, o aditivo de proteção compreende carboximetil celulose. Em algumas concretizações, o aditivo de proteção compreende polivinil pirrolidona. Em algumas concretizações, o aditivo de proteção compreende F-68 plurônico. Em algumas concretizações, o aditivo de proteção compreende Tween 80.

[00590] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem um fator de adesão. Em algumas concretizações, o fator de adesão compreende fibronectina. Em algumas concretizações, o fator de adesão compreende laminina.

[00591] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais é um ou mais de um ou mais antioxidantes, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais agentes de lipídeo,

uma ou mais insulinas ou substitutos de insulina, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais elementos de traço, e um ou mais glucocorticoides. Em algumas concretizações, os antioxidantes incluem N-acetil-L-cisteína, 2-mercaptoetanol, ou acetato de D,L-tocoferol, ou derivados ou misturas dos mesmos. Em algumas concretizações, a albumina é albumina de soro humano. Em algumas concretizações, os agentes de lipídio incluem Ex-Cite® humano ou etanolamina ou derivados e misturas dos mesmos. Em algumas concretizações, a insulina é insulina de zinco humana. Em algumas concretizações, transferrina é transferrina saturada por ferro humana. Em algumas concretizações, o elemento de traço é Se⁴⁺. Em algumas concretizações, glucocorticoide é hidrocortisona. Em algumas concretizações, o suplemento é concentrado.

[00592] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais compreendem um ou mais antioxidantes, e um ou mais ingredientes selecionados do grupo consistindo em uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais agentes de lipídeo, uma ou mais insulinas ou substitutos de insulina, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais elementos de traço, e um ou mais glucocorticoides

[00593] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais compreendem uma ou mais de N-acetil-L cisteína, albumina de soro humana, Ex-Cyte® humano, etanolamina, insulina de zinco humana, transferrina saturada de ferro humana, Se⁴⁺, hidrocortisona, acetato de D,L-tocoferol, e/ou 2-mercaptoetanol.

[00594] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem N-acetil-L-cisteína (NAC). Em algumas concretizações, a concentração de NAC é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a concentração de NAC no meio basal é de, ou de cerca de 10 mg/L até,

ou até cerca de 50 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 100 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 100 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 650

mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de

600 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 600 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 60 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L, ou a, ou a cerca de 650 mg/L até, ou até cerca de 700 mg/L.

[00595] Em algumas concretizações, a concentração de NAC no meio basal é de, ou de cerca de 0 mM a de ou cerca de 1 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou cerca de 2 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou cerca de 3 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou cerca de 4 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou cerca de 5 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou

cerca de 6 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou cerca de 7 mM, de ou
cerca de 0 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou
cerca de 9 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou cerca de 10 mM, de ou
cerca de 0 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou
cerca de 14 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou
cerca de 0 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 0 mM a de ou
cerca de 20 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou cerca de 2 mM, de ou
cerca de 1 mM a de ou cerca de 3 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou
cerca de 4 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou cerca de 5 mM, de ou
cerca de 1 mM a de ou cerca de 6 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou
cerca de 7 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou
cerca de 1 mM a de ou cerca de 9 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou
cerca de 10 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou
cerca de 1 mM a de ou cerca de 14 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou
cerca de 16 mM, de ou cerca de 1 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou
cerca de 1 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou
cerca de 3 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou cerca de 4 mM, de ou
cerca de 2 mM a de ou cerca de 5 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou
cerca de 6 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou cerca de 7 mM, de ou
cerca de 2 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou
cerca de 9 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou cerca de 10 mM, de ou
cerca de 2 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou
cerca de 14 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou
cerca de 2 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 2 mM a de ou
cerca de 20 mM, de ou cerca de 3 mM, a de ou cerca de 4 mM, de ou
cerca de 3 mM a de ou cerca de 5 mM, de ou cerca de 3 mM a de ou
cerca de 6 mM, de ou cerca de 3 mM a de ou cerca de 7 mM, de ou
cerca de 3 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou cerca de 3 mM a de ou
cerca de 9 mM, de ou cerca de 3 mM a de ou cerca de 10 mM, de ou
cerca de 3 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 3 mM a de ou

cerca de 14 mM, de ou cerca de 3 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou
cerca de 3 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 3 mM a de ou
cerca de 20 mM, de ou cerca de 4 mM a de ou cerca de 5 mM, de ou
cerca de 4 mM a de ou cerca de 6 mM, de ou cerca de 4 mM a de ou
cerca de 7 mM, de ou cerca de 4 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou
cerca de 4 mM a de ou cerca de 9 mM, de ou cerca de 4 mM a de ou
cerca de 10 mM, de ou cerca de 4 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou
cerca de 4 mM a de ou cerca de 14 mM, de ou cerca de 4 mM a de ou
cerca de 16 mM, de ou cerca de 4 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou
cerca de 4 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 5 mM a de ou
cerca de 6 mM, de ou cerca de 5 mM a de ou cerca de 7 mM, de ou
cerca de 5 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou cerca de 5 mM a de ou
cerca de 9 mM, de ou cerca de 5 mM a de ou cerca de 10 mM, de ou
cerca de 5 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 5 mM a de ou
cerca de 14 mM, de ou cerca de 5 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou
cerca de 5 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 5 mM a de ou
cerca de 20 mM, de ou cerca de 6 mM a de ou cerca de 7 mM, de ou
cerca de 6 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou cerca de 6 mM a de ou
cerca de 9 mM, de ou cerca de 6 mM a de ou cerca de 10 mM, de ou
cerca de 6 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 6 mM a de ou
cerca de 14 mM, de ou cerca de 6 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou
cerca de 6 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 6 mM a de ou
cerca de 20 mM, de ou cerca de 7 mM a de ou cerca de 8 mM, de ou
cerca de 7 mM a de ou cerca de 9 mM, de ou cerca de 7 mM a de ou
cerca de 10 mM, de ou cerca de 7 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou
cerca de 7 mM a de ou cerca de 14 mM, de ou cerca de 7 mM a de ou
cerca de 16 mM, de ou cerca de 7 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou
cerca de 7 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 8 mM a de ou
cerca de 9 mM, de ou cerca de 8 mM a de ou cerca de 10 mM, de ou
cerca de 8 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 8 mM a de ou

cerca de 14 mM, de ou cerca de 8 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou cerca de 8 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 8 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 9 mM a de ou cerca de 10 mM, de ou cerca de 9 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 9 mM a de ou cerca de 14 mM, de ou cerca de 9 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou cerca de 9 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 9 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 12 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 14 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 10 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 12 mM a de ou cerca de 14 mM, de ou cerca de 12 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou cerca de 12 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 12 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 14 mM a de ou cerca de 16 mM, de ou cerca de 14 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 14 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 16 mM a de ou cerca de 18 mM, de ou cerca de 16 mM a de ou cerca de 20 mM, de ou cerca de 18 mM a de ou cerca de 20 mM.

[00596] Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem etanolamina. Em algumas concretizações, a concentração de etanolamina é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a concentração de etanolamina no meio basal é de, ou de cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 2 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 4 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 6 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 8 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 12 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a

cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 0 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 4 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 6 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 8 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 12 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 2 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 6 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 8 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 12 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 4 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 8 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 12 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até,

ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 6 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 12 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 12 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 8 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 12 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 14 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a

cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 12 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 16 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 14 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 16 mg/L até, ou até cerca de 18 mg/L, a ou a cerca de 16 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 16 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 16 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 16 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 16 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 16 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 18 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 18 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 18 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 18 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 18 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 18 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 22 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 22 mg/L até, ou até cerca de 24 mg/L, a ou a cerca de 22 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 22 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 22 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 24 mg/L até, ou até cerca de 26 mg/L, a ou a cerca de 24 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 24 mg/L até, ou até

cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 26 mg/L até, ou até cerca de 28 mg/L, a ou a cerca de 26 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, ou a, ou a cerca de 28 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L.

[00597] Em algumas concretizações, o suplemento é líquido. Em algumas concretizações, o suplemento não é congelado, ou não recomendado ser congelado para a armazenagem. Em algumas concretizações, o suplemento compreende uma albumina, N-acetila-L-cisteína (NAC) e etanolamina. Em algumas concretizações, o suplemento compreende uma albumina, N-acetila-L-cisteína (NAC) e etanolamina, em que a concentração de albumina, NAC e/ou etanolamina é de tal modo que após o suplemento ser combinado com um meio basal (tais como estes descritos aqui), a concentração de albumina, NAC e/ou etanolamina é substancialmente a mesma como descrito aqui. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina derivada de humano. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina derivada de humano, de plasma humano ou soro. Em algumas concretizações, o suplemento é um líquido e não inclui ou não incluem uma significativa quantidade da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina).

[00598] Em algumas concretizações, um outro suplemento, por exemplo, segundo suplemento, é combinado com o meio basal para fornecer um ou mais componentes adicionais. Em algumas concretizações, o outro suplemento, por exemplo, segundo suplemento, é um suplemento de expansão de célula. Em algumas concretizações, o outro suplemento, por exemplo, segundo suplemento é ou compreende suplemento OpTmizer® (Thermofisher, parte de A1048503).

[00599] Em algumas concretizações, o suplemento é concentrado a, ou cerca de 2 a de ou cerca de 100 vezes. Em algumas concretizações, o suplemento é de, ou de cerca de uma formulação a 40X. Em algumas concretizações, um litro do meio basal é suplementado com

a, ou cerca de 20 a 30 mililitros, tal como, 25 ± 2 mililitro de pelo menos um suplemento, incluindo o primeiro suplemento e, em alguns casos, um ou mais outro suplemento.

C. Meio livre de soro

[00600] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um aminoácido sintético (por exemplo, uma forma de dipeptídeo de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina), a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina). Em algumas concretizações, o aminoácido sintético (por exemplo, uma forma de dipeptídeo de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina) é capaz de ser convertido em uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) em uma cultura celular compreendendo uma célula, em que o meio é livre de soro. Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula humana. Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula imune. Em algumas concretizações, a célula é uma célula geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é geneticamente modificada para expressar um receptor recombinante (por exemplo, um receptor de antígeno quimérico). Em algumas concretizações, a célula é um receptor de antígeno quimérico (CAR) expressando células T.

[00601] Em algumas concretizações, o meio livre de soro também compreende pelo menos uma proteína. Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um aminoácido sintético, em que o aminoácido sintético (por exemplo, uma forma de dipeptídeo de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina) é capaz de ser convertido em uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) em uma cultura celular compreendendo uma célula, a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina), e pelo menos uma proteína, em que o meio é livre de soro.

[00602] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é uma forma estabilizada de glutamina (isto é, L-glutamina). Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é mais estável do que glutamina (isto é, L-glutamina) em uma solução aquosa (por exemplo, um meio livre de soro). Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) durante pelo menos em, ou cerca de 1, 3, 5, 7, 9, 11 13, ou 14 dias no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) durante pelo menos em ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 semanas no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) durante pelo menos em, ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 meses no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de glutamina (isto é, L-glutamina) durante pelo menos em, ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 meses no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos em, ou cerca de 1, 3, 5, 7, 9, 11 13, ou 14 dias no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos em, ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 semanas no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos em, ou cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, ou 12 meses no meio livre de soro. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético não produz uma quantidade significativa de ácido pirrolidona carboxílico ou amônia durante pelo menos em, ou cerca de 1, 2, 3, 4, ou 5 anos no meio livre de soro.

[00603] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é solúvel em uma solução aquosa (por exemplo, um meio livre de soro). Em algumas concretizações, a solubilidade do aminoácido sintético na solução aquosa é maior do que a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina).

[00604] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é capaz de ser transportado em uma célula, em que ele pode ser convertido na forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina). Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula imune. Em algumas concretizações, a célula é uma célula geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T. Em algumas concretizações, a célula é uma célula T geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula é geneticamente modificada para expressar um receptor recombinante (por exemplo, um receptor de antígeno quimérico). Em algumas concretizações, a célula é um receptor de antígeno quimérico (CAR) expressando células T.

[00605] Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é um dipeptídeo. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é um tripeptídeo. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é uma forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina).

[00606] Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio livre de soro é de, ou de cerca de 0,5 mM-5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio livre de soro é de, ou de cerca

de 2 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) é de, ou de cerca de 0,5 mM-1 mM, 0,5 mM-1,5 mM, 0,5 mM-2 mM, 0,5 mM-2,5 mM, 0,5 mM-3 mM, 0,5 mM-3,5 mM, 0,5 mM-4 mM, 0,5 mM-4,5 mM, 0,5 mM-5 mM, 1 mM-1,5 mM, 1 mM-2 mM, 1 mM-2,5 mM, 1 mM-3 mM, 1 mM-3,5 mM, 1 mM-4 mM, 1 mM-4,5 mM, 1 mM-5 mM, 1,5 mM-2 mM, 1,5 mM-2,5 mM, 1,5 mM-3 mM, 1,5 mM-3,5 mM, 1,5 mM-4 mM, 1,5 mM-4,5 mM, 1,5 mM-5 mM, 2 mM-2,5 mM, 2 mM-3 mM, 2 mM-3,5 mM, 2 mM-4 mM, 2 mM-4,5 mM, 2 mM-5 mM, 2,5 mM-3 mM, 2,5 mM-3,5 mM, 2,5 mM-4 mM, 2,5 mM-4,5 mM, 2,5 mM-5 mM, 3 mM-3,5 mM, 3 mM-4 mM, 3 mM-4,5 mM, 3 mM-5 mM, 3,5 mM-4 mM, 3,5 mM-4,5 mM, 3,5 mM-5 mM, 4 mM-4,5 mM, 4 mM-5 mM, ou 4,5 mM-5 mM, cada inclusiva. Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio livre de soro é de, ou de cerca de 5 mM-7,5 mM, 5 mM-10 mM, 5 mM-12,5 mM, 5 mM-15 mM, 5 mM-17,5 mM, 5 mM-20 mM, 7,5 mM-10 mM, 7,5 mM-12,5 mM, 7,5 mM-15 mM, 7,5 mM-17,5 mM, 7,5 mM-20 mM, 10 mM-12,5 mM, 10 mM-15 mM, 10 mM-17,5 mM, 10 mM-20 mM, 12,5 mM-15 mM, 12,5 mM-17,5 mM, 12,5 mM-20 mM, 15 mM-17,5 mM, 15 mM-20 mM, ou 17,5 mM-20 mM, cada inclusiva. Em algumas concretizações, a concentração de forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio livre de soro é pelo menos a, ou cerca de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, ou 5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio livre de soro é de, ou de cerca de 2 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina) no meio livre de soro é no máximo a, ou cerca de 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM, 5,5 mM, 6 mM, 6,5 mM, 7 mM, 7,5 mM, 8 mM, 8,5 mM, 9

mM, 9,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 17,5 mM ou 20 mM.

[00607] Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio livre de soro é cerca de 0,5 mM-5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio livre de soro é de, ou de cerca de 2 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio livre de soro é de, ou de cerca de 0,5 mM-1 mM, 0,5 mM-1,5 mM, 0,5 mM-2 mM, 0,5 mM-2,5 mM, 0,5 mM-3 mM, 0,5 mM-3,5 mM, 0,5 mM-4 mM, 0,5 mM-4,5 mM, 0,5 mM-5 mM, 1 mM-1,5 mM, 1 mM-2 mM, 1 mM-2,5 mM, 1 mM-3 mM, 1 mM-3,5 mM, 1 mM-4 mM, 1 mM-4,5 mM, 1 mM-5 mM, 1,5 mM-2 mM, 1,5 mM-2,5 mM, 1,5 mM-3 mM, 1,5 mM-3,5 mM, 1,5 mM-4 mM, 1,5 mM-4,5 mM, 1,5 mM-5 mM, 2 mM-2,5 mM, 2 mM-3 mM, 2 mM-3,5 mM, 2 mM-4 mM, 2 mM-4,5 mM, 2 mM-5 mM, 2,5 mM-3 mM, 2,5 mM-3,5 mM, 2,5 mM-4 mM, 2,5 mM-4,5 mM, 2,5 mM-5 mM, 3 mM-3,5 mM, 3 mM-4 mM, 3 mM-4,5 mM, 3 mM-5 mM, 3,5 mM-4 mM, 3,5 mM-4,5 mM, 3,5 mM-5 mM, 4 mM-4,5 mM, 4 mM-5 mM, ou 4,5 mM-5 mM, cada inclusiva. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio livre de soro é de, ou de cerca de 5 mM-7,5 mM, 5 mM-10 mM, 5 mM-12,5 mM, 5 mM-15 mM, 5 mM-17,5 mM, 5 mM-20 mM, 7,5 mM-10 mM, 7,5 mM-12,5 mM, 7,5 mM-15 mM, 7,5 mM-17,5 mM, 7,5 mM-20 mM, 10 mM-12,5 mM, 10 mM-15 mM, 10 mM-17,5 mM, 10 mM-20 mM, 12,5 mM-15 mM, 12,5 mM-17,5 mM, 12,5 mM-20 mM, 15 mM-17,5 mM, 15 mM-20 mM, ou 17,5 mM-20 mM, cada inclusiva. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio é pelo menos a, ou cerca de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, ou 5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) no meio livre de soro é no máximo a, ou cerca de 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5

mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM, 5,5 mM, 6mM, 6,5 mM, 7mM, 7,5 mM, 8mM, 8,5 mM, 9mM, 9,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 17,5 mM ou 20 mM.

[00608] Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina, tal como, L-alanil-L-glutamina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 0,5 mM a de ou cerca de 5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina, tal como, L-alanil-L-glutamina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 2 mM. Em algumas concretizações, a concentração de L-glutamina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 0,5 mM a de ou cerca de 5 mM. Em algumas concretizações, a concentração da L-glutamina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 2 mM.

[00609] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende pelo menos uma proteína. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína não é de origem não mamífera. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína é humana ou derivada de humano. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína é recombinante. Em algumas concretizações, um ou mais componentes adicionais incluem pelo menos uma proteína. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína não é de origem não mamífera. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína é humana ou derivada de humano. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína é recombinante. Em algumas concretizações, a referida pelo menos uma proteína inclui albumina, transferrina, insulina, fibronectina, aprotinina ou fetuína. Em algumas concretizações, a proteína compreende uma ou mais de albumina, insulina ou transferrina, opcionalmente uma ou mais de uma albumina, insulina ou transferrina humana ou recombinante.

[00610] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende uma albumina. Em algumas concretizações, a albumina é deri-

vada de humano. Em algumas concretizações, a albumina é derivada de soro humano ou plasma humano. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina recombinante. Em algumas concretizações, a albumina recombinante é derivada de humano. Em alguma concretização, a albumina recombinante não é derivada de humano. Em algumas concretizações, o suplemento compreende uma albumina natural. Em algumas concretizações, a albumina natural é derivada de humano. Em algumas concretizações, a albumina natural não é derivada de humano. Em algumas concretizações, a concentração da albumina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 2 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 4 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 6 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 0 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 4 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 6 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 2 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 4 mg/mL até, ou até cerca de 6 mg/mL, a ou a cerca de 4 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 4 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 4 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 6 mg/mL até, ou até cerca de 8 mg/mL, a ou a cerca de 6 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 6 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 8 mg/mL até, ou até cerca de 10 mg/mL, a ou a cerca de 8 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, a ou a cerca de 10 mg/mL até, ou até cerca de 12 mg/mL, ou a, ou a cerca de 10 mg/mL até, ou até cerca de 15 mg/mL cada inclusive. Em algumas concretizações, a albumina no meio é de, ou de cerca de 5 mg/mL.

[00611] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compre-

ende uma transferrina ou substituto de transferrina (tais como estes descritos aqui). Em algumas concretizações, a transferrina ou substituto de transferrina é derivado de ser humano. Em algumas concretizações, a transferrina ou substituto de transferrina é derivado de soro humano ou plasma. Em algumas concretizações, a concentração da transferrina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 50 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 100 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 100 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 50 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 150 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até,

ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 100 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 200 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 150 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 250 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 200 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 300 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L

até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 250 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 350 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 300 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 400 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 350 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 450 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 400 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 500 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 450 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 550 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 500 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até cerca de 600 mg/L, a ou a cerca de 550 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 550

mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, a ou a cerca de 600 mg/L até, ou até cerca de 650 mg/L, a ou a cerca de 600 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L, ou a, ou a cerca de 650 mg/L até, ou até cerca de 750 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração da transferrina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 100 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração da transferrina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 50 mg/L a 150 mg/L.

[00612] Em algumas concretizações, o suplemento compreende insulina ou substituto de insulina (tais como estes descritos aqui). Em algumas concretizações, a insulina é derivada de humano. Em algumas concretizações, a insulina é uma insulina recombinante. Em alguma concretização, a insulina é uma insulina humana recombinante. Em alguma concretização, a concentração da insulina (ou substituto de insulina) no meio livre de soro é de, ou de cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 2,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 7,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 1 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 7,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de

25 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 2,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 7,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 10 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 10 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 15 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 12,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 17,5 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L

até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 15 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 20 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 17,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 22,5 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 20 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 22,5 mg/L até, ou até cerca de 25 mg/L, a ou a cerca de 22,5 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, a ou a cerca de 22,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L, a ou a cerca de 25 mg/L até, ou até cerca de 27,5 mg/L, ou a, ou a cerca de 27,5 mg/L até, ou até cerca de 30 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração de insulina ou substituto de insulina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 10 mg/L. Em algumas concretizações, a concentração de insulina ou substituto de insulina no meio livre de soro é de, ou de cerca de 7,5 mg/L até, ou até cerca de 12,5 mg/L.

[00613] Em algumas concretizações, o meio livre de soro não compreende fenol vermelho. Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende fenol vermelho.

[00614] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende uma mistura nutriente de sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, opcionalmente também contendo vitaminas, ácidos orgânicos, antioxidantes, lipídeos, fatores de desenvolvimento, N-acetilcisteína, etanolamina e/ou tampões. Exemplos incluem aqueles descritos aqui, tal como, na seção acima, incluindo sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, antioxidantes, lipídeos, fatores

de desenvolvimento, N-acetilcisteína, etanolamina e/ou tampões.

[00615] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um ou mais ingredientes selecionados de um ou mais de um ou mais antioxidantes, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais agentes de lipídeo, uma ou mais insulinas ou substitutos de insulina, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais elementos de traço, um ou mais glicocorticoides, um ou mais sais inorgânicos, uma ou mais fontes de energia, um ou mais agentes de tamponamento, um ou mais sais de piruvato, um ou mais indicadores de pH, um ou mais aminoácidos, e uma ou mais vitaminas. Em algumas concretizações, os antioxidantes são selecionados do grupo consistindo em N-acetil-L-cisteína, 2-mercaptoetanol e acetato de D,L-tocoferol, ou derivados ou misturas dos mesmos. Em algumas concretizações, a albumina é albumina de soro humano. Em algumas concretizações, os agentes de lipídeo são Ex-Cyte® humano e etanolamina. Em algumas concretizações, a insulina é insulina de zinco humana. Em algumas concretizações, a transferrina é transferrina saturada por ferro humana. Em algumas concretizações, o glucocorticoide é hidrocortisona. Em algumas concretizações, ingrediente de sal inorgânico compreende um ou mais sais inorgânicos selecionados do grupo consistindo em um ou mais sais de cálcio, um ou mais sais de potássio, um ou mais sais de magnésio, um ou mais sais de sódio, um ou mais sais de carbonato, e um ou mais sais de fosfato. Em algumas concretizações, a fonte de energia é D-glicose. Em algumas concretizações, o agente de tamponamento é HEPES. Em algumas concretizações, o sal de piruvato é piruvato de sódio. Em algumas concretizações, o indicador de pH é fenol vermelho. Em algumas concretizações, ingrediente de aminoácido compreende um ou mais aminoácidos selecionados do grupo consistindo em glicina, L-alanina, L-asparagina, L-cisteína, ácido L-aspártico, ácido L-glutâmico, L-fenilalanina, L-

histidina, L-isoleucina, L-lisina, L-leucina, L-glutamina, L-arginina HCL, L-metionina, L-prolina, L-hidroxi prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina e L-valina e sais and derivados dos mesmos. Em algumas concretizações, um ingrediente de vitamina compreende uma ou mais vitaminas selecionadas do grupo consistindo em biotina, pantotenato de D-cálcio, cloridrato de colina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, HCl piridoxal, riboflavina, HCl de tiamina e vitamina B12 e derivados dos mesmos. Em algumas concretizações, ingredientes compreendem N-acetil-L-cisteína, 2-mercaptoetanol, albumina de soro humano, acetato de D,L-tocoferol, Ex-Cyte® humano, etanolamina, insulina de zinco humano, transferrina saturada de ferro, Se^{4+} , hidrocortisona, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , D-glicose, HEPES, piruvato de sódio, fenol vermelho, glicina, L-alanina, L-asparagina, L-cisteína, ácido L-aspártico, ácido L-glutâmico, L-fenilalanina, L-histidina, L-isoleucina, L-lisina, L-leucina, L-glutamina, HCL de L-arginina, L-metionina, L-prolina, L-hidroxi prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina e L-valina, biotina, pantotenato de D-cálcio, cloreto de colina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, HCl piridoxal, riboflavina, HCl de tiamina e vitamina B12.

[00616] Em algumas concretizações, é fornecido um meio livre de soro compreendendo um meio basal e pelo menos um suplemento. Vários exemplos de meio basal e suplementos são descritos aqui, tal como na seção acima.

[00617] Em algumas concretizações, a formulação de meio livre de soro compreende a, ou cerca de 90% a de ou cerca de 97,5% (v/v) do meio basal, a, ou cerca de 2,5% a de ou cerca de 10% (v/v) de um suplemento, por exemplo, um primeiro suplemento e/ou um segundo suplemento. Em algumas concretizações, a formulação de meio livre de soro compreende a, ou cerca de 90% a de ou cerca de 97,5% (v/v) do meio basal, a, ou cerca de 1,25% a de ou cerca de 5% (v/v) de um

primeiro suplemento, e a, ou cerca de 1,25% a de ou cerca de 5% (v/v) de um segundo suplemento.

[00618] Em algumas concretizações, é fornecido um meio livre de soro compreendendo um meio basal, um primeiro suplemento e um segundo suplemento. Em algumas concretizações, o meio basal compreende um líquido compreendendo um aminoácido sintético (por exemplo, uma forma de dipeptídeo de L-glutamina, por exemplo, L-alanil-L-glutamina), e em que o meio basal é livre, ou substancialmente livre da forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina) e/ou uma proteína. Em algumas concretizações, o primeiro suplemento compreende a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina), em que o primeiro suplemento é congelado ou armazenado em uma temperatura sob temperatura ambiente (por exemplo, sob 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15, ou -20°C) na maioria das vezes após glutamina tornar-se um componente do mesmo e antes do uso pretendido (por exemplo, usado como um suplemento para um meio basal). Em algumas concretizações, o primeiro suplemento compreende a forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina), em que o primeiro suplemento é congelado ou armazenado em uma temperatura sob temperatura ambiente (por exemplo, sob 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15, ou -20°C) antes de imediatamente combinar com um meio (por exemplo, um meio basal). Em algumas concretizações, o segundo suplemento compreende uma albumina, N-acetil-L-cisteína (NAC) e/ou etanolamina. Em algumas concretizações, o segundo suplemento compreende um ou mais ingredientes selecionados do grupo consistindo em um ou mais antioxidantes, uma ou mais albuminas ou substitutos de albumina, um ou mais agentes de lipídeo, uma ou mais insulinas ou substitutos de insulina, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais elementos de traço, e um ou mais glucocorticoides.

[00619] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compre-

ende uma ou mais citocina. Em certas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes humanas. Em certas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas ligam-se a e/ou são capazes de ligarem-se aos receptores que são expressados por e/ou são endógenos às células T. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas é ou inclui um membro da família feixe 4-alfa-hélice de citocinas. Em algumas concretizações, membros da família feixe 4-alfa-hélice de citocinas incluem, porém não são limitados a, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-7 (IL-7), interleucina-9 (IL-9), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF) e fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF). Em algumas concretizações, as referidas uma ou mais citocinas é ou inclui IL-15. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas é ou inclui IL-7. Em concretizações particulares, as referidas uma ou mais citocinas é ou inclui IL-2 recombinante. Em algumas concretizações, a citocina compreende IL-2. Em algumas concretizações, uma ou mais citocina é selecionada de IL-2, IL-7 or IL-15.

[00620] Em algumas concretizações, a concentração da citocina é cerca de entre, ou de cerca de 1 IU/mL e a, ou cerca de 2.000 IU/ml, entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 100 IU/ml, entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml, entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/ml, entre, ou de cerca de 500 IU/mL e a, ou cerca de 1400 IU/ml, entre, ou de cerca de 250 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml, ou entre, ou de cerca de 500 IU/mL e a, ou cerca de 2.500 IU/ml.

[00621] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende IL-2. Em algumas concretizações, a concentração de IL-2 (por

exemplo, IL-2 recombinante humano) é entre, ou de cerca de 2 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml, entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 250 IU/ml, entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml, ou entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 400 IU/ml. Em concretizações particulares, a concentração de IL-2 é a ou a cerca de 50 IU/ml, 75 IU/ml, 100 IU/ml, 125 IU/ml, 150 IU/ml, 175 IU/ml, 200 IU/ml, 225 IU/ml, 250 IU/ml, 300 IU/ml, ou 400 IU/ml. Em algumas concretizações, a concentração de IL-2 é de, ou de cerca de 100 IU/ml. Em algumas concretizações, a concentração de IL-2 é de, ou de cerca de 200 IU/ml.

[00622] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende IL-7. Em algumas concretizações, a concentração de IL-7, por exemplo, IL-7 recombinante humano, é cerca de entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 5.000 IU/ml, entre, ou de cerca de 500 IU/mL e a, ou cerca de 2.000 IU/ml, entre, ou de cerca de 600 IU/mL e a, ou cerca de 1.500 IU/ml, entre, ou de cerca de 500 IU/mL e a, ou cerca de 2.500 IU/ml, entre, ou de cerca de 750 IU/mL e a, ou cerca de 1.500 IU/ml, ou entre, ou de cerca de 1.000 IU/mL e a, ou cerca de 2.000 IU/ml. Em concretizações particulares, a concentração de IL-7 a ou a cerca de 100 IU/ml, 200 IU/ml, 300 IU/ml, 400 IU/ml, 500 IU/ml, 600 IU/ml, 700 IU/ml, 800 IU/ml, 900 IU/ml, 1.000 IU/ml, 1.200 IU/ml, 1.400 IU/ml ou 1.600 IU/ml. Em algumas concretizações, a concentração de IL-7 é cerca de a 600 IU/ml. Em algumas concretizações, a concentração de IL-7 é cerca de a 1.200 IU/ml.

[00623] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende IL-15. Em algumas concretizações, a concentração de IL-15, por exemplo, IL-15 recombinante humano, é entre, ou de cerca de 2 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml, entre, ou de cerca de 0,1 IU/mL e a, ou cerca de 200 IU/ml, entre, ou de cerca de 1 IU/mL e a, ou cerca de 50 IU/ml, entre, ou de cerca de 5 IU/mL e a, ou cerca de 25 IU/ml, entre,

ou de cerca de 25 IU/mL e a, ou cerca de 50IU/ml, entre, ou de cerca de 5 IU/mL e a, ou cerca de 15 IU/ml, ou entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 50 IU/ml. Em concretizações particulares, a concentração de IL-15 é a ou a cerca de 1 IU/ml, 2 IU/ml, 3 IU/ml, 4 IU/ml, 5 IU/ml, 6 IU/ml, 7 IU/ml, 8 IU/ml, 9 IU/ml, 10 IU/ml, 11 IU/ml, 12 IU/ml, 13 IU/ml, 14 IU/ml, 15 IU/ml, 20 IU/ml, 25 IU/ml, 30 IU/ml, 40 IU/ml, 50 IU/ml, 100 IU/ml, ou 200 IU/ml. Em concretizações particulares, a concentração de IL-15 é cerca de 20 IU/ml. Em algumas concretizações, a concentração de IL-15 é de, ou de cerca de 100 IU/ml. Em algumas concretizações, a concentração de IL-15 é de, ou de cerca de 200 IU/ml.

[00624] Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um meio basal suplementado com um IL-2 recombinante, um IL-7 recombinante e/ou um IL-15 recombinante, por exemplo, IL-2 recombinante humano, IL-7 recombinante humano e/ou IL-15 recombinante humano. Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um IL-2 recombinante entre, ou de cerca de 2 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml, um IL-7 recombinante entre, ou de cerca de 10 IU/mL e a, ou cerca de 5.000 IU/ml, e um IL-15 recombinante entre, ou de cerca de 2 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml. Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um IL-2 recombinante entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml, um IL-7 recombinante entre, ou de cerca de 100 IU/mL e a, ou cerca de 2,000 IU/ml, e um IL-15 recombinante entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 500 IU/ml. Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um IL-2 recombinante entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 150 IU/ml, um IL-7 recombinante entre, ou de cerca de 500 IU/mL e a, ou cerca de 1.000 IU/ml, e um IL-15 recombinante entre, ou de cerca de 50 IU/mL e a, ou cerca de 150 IU/ml, por exemplo, para uso na estimulação/ativação e/ou modificação de uma composição ce-

lular. Em algumas concretizações, o meio livre de soro compreende um IL-2 recombinante entre, ou de cerca de 150 IU/mL e a, ou cerca de 250 IU/ml, um IL-7 recombinante entre, ou de cerca de 1000 IU/mL e a, ou cerca de 1,500 IU/ml, e um IL-15 recombinante entre, ou de cerca de 150 IU/mL e a, ou cerca de 250 IU/ml, por exemplo, para uso no cultivo ou expansão de uma composição celular. Em algumas concretizações, o meio livre de soro usado no cultivo ou expansão de uma composição celular contém concentrações mais elevadas de uma ou mais citocinas do que o meio livre de soro usado na estimulação/ativação e/ou modificação da composição celular. Em algumas concretizações, o meio livre de soro usado no cultivo ou expansão de uma composição celular contém cerca de ou pelo menos cerca de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 ou 3,0 vezes as concentrações de uma ou mais citocinas do que o meio livre de soro usado na estimulação/ativação e/ou modificação da composição celular.

[00625] Em algumas concretizações, o meio livre de soro é uma formulação de meio concentrado. Em algumas concretizações, o meio livre de soro não é uma formulação de meio concentrado. Em algumas concretizações, o meio livre de soro é de a, ou cerca de 2X a de ou cerca de 100X concentrado. Em algumas concretizações, o meio livre de soro é de, ou de cerca de 10X formulação. Em algumas concretizações, o meio livre de soro pode ser armazenado a, ou cerca de 2°C a 8°C.

[00626] Em algumas concretizações, o meio é capaz de cultivar as células durante pelo menos 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias ou mais sem um suplemento adicional de uma L-glutamina, uma forma de dipeptídeo de glutamina ou outra forma de glutamina.

[00627] Em algumas concretizações, o meio livre de soro é capaz

de promover expansão celular durante pelo menos 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias ou mais sem um suplemento adicional de uma L-glutamina, uma forma de dipeptídeo de glutamina ou outra forma de glutamina.

[00628] Em algumas concretizações, o meio livre de soro suporta ou promove a expansão de uma célula. Em algumas concretizações, o meio suporta ou promove a viabilidade de uma célula. Em algumas concretizações, o meio suporta ou promove a ativação de uma célula.

[00629] Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula imune. Em algumas concretizações, a célula compreende uma célula imune primária. Em algumas concretizações, a célula imune primária compreende uma célula geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula imune primária compreende uma célula T. Em algumas concretizações, a célula imune primária compreende célula T CD4 e/ou CD8. Em algumas concretizações, a célula T CD4 e/ou CD8 é uma célula T geneticamente modificada. Em algumas concretizações, a célula T é geneticamente modificada para expressar um receptor recombinante (por exemplo, um receptor de antígeno quimérico). Em algumas concretizações, a célula T compreende um receptor de antígeno quimérico (CAR) expressando células T.

[00630] Em algumas concretizações, o meio livre de soro suporta ou promove a viabilidade, expansão e/ou ativação de células, em que as células cultivadas com o meio livre de soro ativa propriedade funcional comparável (por exemplo, viabilidade, expansão e produção de citocina ou citocinas) como células cultivadas com meio contendo soro, tal como, meio contendo cerca de 5 a 10% (v/v) de soro humano.

D. Métodos de Preparação de Meios Sem Soro

[00631] Em algumas concretizações, é fornecido um método para preparar uma formulação de meio sem soro, ou o método compreendendo combinar: (a) um meio basal que compreende um aminoácido

sintético capaz de ser convertido em uma forma livre de glutamina (por exemplo, L-glutamina) em uma cultura celular; (b) um primeiro suplemento compreendendo uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina), em que o primeiro suplemento foi congelado por pelo menos uma parte do tempo após a L-glutamina se tornar um componente do mesmo e antes da combinação. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é a forma dipeptídica da L-glutamina (por exemplo, L-alanil-L-glutamina). Em algumas concretizações, o meio basal é livre de soro. Em algumas concretizações, o meio basal é uma formulação líquida e/ou não foi congelada antes da combinação e/ou não recomendada em um protocolo comercial a ser congelada quando mantida em armazenamento. Em algumas concretizações, o primeiro suplemento foi congelado durante a maior parte do tempo após a L-glutamina se tornar um componente do mesmo e antes de combinar com o meio basal. Em algumas concretizações, o primeiro suplemento foi congelado e descongelado antes da combinação.

[00632] Em algumas concretizações, o primeiro suplemento é descongelado como uma formulação líquida não mais que, ou cerca de uma semana, tal como não mais que, ou cerca de 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 dia, geralmente não mais do que, ou cerca de 12 horas, 6 horas, 2 horas, 1 hora ou 30 minutos antes de ser combinado com o meio basal. Em algumas concretizações, o primeiro suplemento contendo L-glutamina é mantido congelado em breve (como dentro de 6, 12, 16, 24, 36, 48 horas) ou imediatamente antes da combinação. Em algumas concretizações, o primeiro suplemento contendo L-glutamina foi uma formulação líquida durante menos de 48, 24, 16, 12, 8, 4 ou 2 horas antes de ser combinado com o meio basal. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é um dipeptídeo da L-glutamina. Em algumas concretizações, o aminoácido sintético é L-alanil-L-glutamina.

[00633] Em algumas concretizações, a formulação de meio sem

soro compreende a, ou cerca de 90% a 98,75% (v/v) do meio basal e a, ou cerca de 1,25% a 10% (v/v) do primeiro suplemento. Em algumas concretizações, a formulação do meio sem soro compreende a, cerca de 90% a 97,5% (v/v) do meio basal e a, ou cerca de 1,25% a 5% (v/v) do primeiro suplemento. Em algumas concretizações, a formulação do meio sem soro compreende a, ou cerca de 95% (v/v) do meio basal e a, ou cerca de 2,5% \pm 0,2% (v/v) do primeiro suplemento, tal como a, ou cerca de 2,5% (v/v). Em algumas concretizações, um litro do meio basal é suplementado com um ou cerca de 25 mililitros do primeiro suplemento.

[00634] Em algumas concretizações, o método também inclui a combinação de um segundo suplemento. Em algumas concretizações, o segundo suplemento compreende um ou mais componentes adicionais, como os descritos acima, incluindo um ou mais antioxidantes, uma ou mais albuminas ou substitutos da albumina, um ou mais agentes lipídicos, uma ou mais insulinas ou substitutos de insulina, uma ou mais transferrinas ou substitutos de transferrina, um ou mais elementos de traço e um ou mais glicocorticoides. Componentes exemplares de um segundo suplemento são descritos acima.

[00635] Em algumas concretizações, o segundo suplemento compreende uma albumina, N-acetilcisteína (NAC) e etanolamina. Em algumas concretizações, o segundo suplemento compreende uma albumina, N-acetilcisteína (NAC) e etanolamina, em que a concentração de albumina, NAC e/ou etanolamina é tal que, após o segundo suplemento ser combinado com um meio basal (como aqui descrito), a concentração de albumina, NAC e/ou etanolamina é substancialmente a mesma descrita aqui. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina derivada de humano. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina derivada de humano de plasma ou soro humano. Em algumas concretizações, o segundo suplemento é um líquido e

não inclui, ou não inclui uma quantidade significativa de uma forma livre de glutamina (isto é, L-glutamina).

[00636] Em algumas concretizações, o segundo suplemento compreende o suplemento OpTmizer® (Thermofisher, parte de A1048503).

[00637] Em algumas concretizações, o segundo suplemento é líquido. Em algumas concretizações, o segundo suplemento não é congelado ou não é recomendado que seja congelado para o armazenamento. Em algumas concretizações, a formulação do meio sem soro compreende cerca de 1,25% a 5% (v/v) do segundo suplemento, tal como ou a cerca de 2,5% \pm 0,2%, tal como ou a cerca de 2,5% ou 2,6%. Em algumas concretizações, um litro do meio basal é suplementado com cerca de 26 mililitros do segundo suplemento.

[00638] Em algumas concretizações, a formulação do meio sem soro compreende cerca de 90% a 97,5% (v/v) do meio basal, cerca de 1,25% a 5% (v/v) do primeiro suplemento, e cerca de 1,25% a 5% (v/v) do segundo suplemento. Em algumas concretizações, a formulação do meio sem soro compreende cerca de 95% (v/v) do meio basal, cerca de 2,5% \pm 0,2% (v/v) do primeiro suplemento, e cerca de 2,5 % \pm 0,2% (v/v) do segundo suplemento.

III. RECEPTORES RECOMBINANTES

[00639] Em algumas concretizações, as células que são tratadas, processadas, modificadas e/ou produzidas pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo, os métodos descritos na Seção I, contêm ou expressam, ou são modificados para conter ou expressar, uma proteína recombinante, como um receptor recombinante, por exemplo, um receptor de antígeno quimérico (CAR), ou um receptor de células T (TCR). Em certas concretizações, os métodos aqui fornecidos produzem e/ou são capazes de produzir células, ou populações ou composições contendo e/ou enriquecidas para células, que são modificadas para expressar ou conter uma proteína recombinante. Em algumas

concretizações, células T, ou populações ou composições de células T, são tratadas, processadas, modificadas e/ou produzidas.

[00640] Em algumas concretizações, as células incluem um ou mais ácidos nucleicos introduzidos por engenharia genética e, desse modo, expressam produtos recombinantes ou geneticamente modificados desses ácidos nucleicos. Em algumas concretizações, a transferência de genes é realizada estimulando-se primeiro as células, como combinando-as com um estímulo que induz uma resposta como proliferação, sobrevivência, e/ou ativação, por exemplo, como medida pela expressão de uma citocina ou marcador de ativação, seguido de transdução das células ativadas e expansão em cultura para números suficientes para aplicações clínicas.

[00641] Entre os receptores estão receptores de antígenos e receptores contendo um ou mais componentes dos mesmos. Os receptores recombinantes podem incluir receptores quiméricos, como os domínios de ligação ao ligante ou fragmentos de ligação dos mesmos e regiões ou domínios de sinalização intracelulares, receptores de antígeno não TCR funcionais, receptores de antígeno quimérico (CARs) e receptores de célula T (TCRs), como TCRs recombinantes ou transgênicos, receptor de autoanticorpo quimérico (CAAR) e componentes de qualquer um dos anteriores. O receptor recombinante, tal como um CAR, geralmente inclui o domínio de ligação ao antígeno extracelular (ou ligante) ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelulares, em alguns aspectos por meio de ligantes e/ou domínio(s) de transmembrana.

1. Receptores de Antígeno Quiméricos (CARs)

[00642] Em algumas concretizações, células modificadas, como células T, são fornecidas as quais expressam um CAR com especificidade para um antígeno particular (ou marcador ou ligante), como um antígeno expresso na superfície de um tipo de célula específico. Em al-

gumas concretizações, o antígeno é um polipeptídeo. Em algumas concretizações, é um carboidrato ou outra molécula. Em algumas concretizações, o antígeno é seletivamente expresso ou superexpresso nas células da doença ou condição, por exemplo, o tumor ou células patogênicas, em comparação às células ou tecidos normais ou não direcionados. Em outras concretizações, o antígeno é expresso nas células normais e/ou é expresso nas células modificadas.

[00643] Em concretizações particulares, o receptor recombinante, tal como receptor quimérico, contém uma região de sinalização intracelular, que inclui um domínio ou região de sinalização citoplasmática (também alternadamente chamada de uma região ou domínio de sinalização intracelular), como uma região citoplasmática (intracelular) capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, por exemplo, uma região ou domínio de sinalização citoplasmática ou região de um componente do receptor de célula T (TCR) (por exemplo, uma região ou domínio de sinalização citoplasmática de uma cadeia zeta de uma cadeia CD3 -Zeta (CD3 ζ) ou uma variante funcional ou porção de sinalização do mesmo) e/ou que compreende um motivo de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[00644] Em algumas concretizações, o receptor quimérico contém ainda um domínio de ligação ao ligante extracelular que se liga ao antígeno ligante (por exemplo, antígeno). Em algumas concretizações, o receptor quimérico é um CAR que contém um domínio de reconhecimento de antígeno extracelular que se liga a um antígeno. Em algumas concretizações, o ligante, tal como um antígeno, é uma proteína expressa na superfície das células. Em algumas concretizações, o CAR é um CAR tipo TCR e o antígeno é um antígeno peptídico processado, tal como um antígeno peptídico de uma proteína intracelular, que, como um TCR, é reconhecido na superfície celular no contexto de uma molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC).

[00645] Receptores de antígeno exemplares, incluindo CARs, e métodos para modificação e introdução de tais receptores em células, incluem aqueles descritos, por exemplo, nos números de publicação do pedido de patente internacional WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, números de publicação do pedido de patente Norte Americano US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patente Norte-americana Nos.: 6.451.995, 7.446.190, 8.252.592, 8.339.645, 8.398.282, 7.446.179, 6.410.319, 7.070.995, 7.265.209, 7.354.762, 7.446.191, 8.324.353 e 8.479.118, e pedido de patente Europeia número EP2537416, e/ou aqueles descritos por Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4):388-398; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75. Em alguns aspectos, os receptores de antígeno incluem um CAR, como descrito na Patente Norte-americana No.: 7.446.190, e aqueles descritos na Publicação do Pedido de Patente Internacional No.: WO/2014055668 A1. Exemplos de CARs incluem CARs, conforme descrito em qualquer uma das publicações mencionadas, como WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente Norte-americana No.: 7.446.190, Patente Norte-americana No.: 8.389.282, Kochenderfer *et al.*, 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang *et al.* (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; e Brentjens *et al.*, *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Veja, também WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente Norte-americana No. 7.446.190 e Patente Norte-americana No.: 8.389.282.

[00646] Em algumas concretizações, o CAR é construído com uma especificidade para um antígeno (ou marcador ou ligante) particular, como um antígeno expresso em um tipo de célula particular a ser dire-

cionada por terapia adotiva, por exemplo, um marcador de câncer, e/ou um antígeno destinado a induzir uma resposta diminuída, como um antígeno expresso em um tipo de célula normal ou não doente. Desse modo, o CAR inclui tipicamente em sua porção extracelular uma ou mais moléculas de ligação ao antígeno, como um ou mais fragmentos de ligação ao antígeno, domínio, ou porção, ou um ou mais domínios variáveis de anticorpo, e/ou moléculas de anticorpo. Em algumas concretizações, o CAR inclui uma porção ou porções de ligação ao antígeno de uma molécula de anticorpo, como um fragmento de anticorpo de cadeia única (scFv) derivado das cadeias pesada variável (VH) e leve variável (VL) de um monoclonal anticorpo (mAb).

[00647] Em algumas concretizações, o anticorpo ou a porção de ligação ao antígeno do mesmo é expresso nas células como parte de um receptor recombinante, como um receptor de antígeno. Entre os receptores de antígeno estão os receptores de antígeno não TCR funcionais, como receptores de antígeno quiméricos (CARs). Geralmente, um CAR contendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que exhibe especificidade tipo TCR direcionada contra complexos peptídeo-MHC também pode ser referido como um CAR tipo TCR. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno extracelular específico para um complexo MHC-peptídeo de um CAR tipo TCR é ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelular, em alguns aspectos através de ligantes e/ou domínio(s) de transmembrana. Em algumas concretizações, essas moléculas podem tipicamente imitar ou aproximar um sinal através de um receptor de antígeno natural, como um TCR, e, opcionalmente, um sinal através desse receptor em combinação com um receptor coestimulador.

[00648] Em algumas concretizações, o receptor recombinante, como um receptor quimérico (por exemplo, CAR), inclui um domínio de ligação ao ligante que se liga, tal como especificamente, a um antíge-

no (ou um ligante). Entre os antígenos direcionados pelos receptores quiméricos estão os expressos no contexto de uma doença, condição ou tipo de célula a ser direcionada através da terapia celular adotiva. Entre as doenças e condições estão doenças e distúrbios proliferativos, neoplásicos e malignos, incluindo cânceres e tumores, incluindo cânceres hematológicos, cânceres do sistema imunológico, como linfomas, leucemias, e/ou mielomas, como B, T e leucemias mieloides, linfomas e mieloma múltiplos.

[00649] Em algumas concretizações, o antígeno (ou um ligante) é um polipeptídeo. Em algumas concretizações, é um carboidrato ou outra molécula. Em algumas concretizações, o antígeno (ou um ligante) é seletivamente expresso ou superexpresso nas células de uma doença ou condição, por exemplo, o tumor ou células patogênicas, em comparação às células ou tecidos normais ou não direcionados. Em outras concretizações, o antígeno é expresso nas células normais e/ou é expresso nas células modificadas.

[00650] Em algumas concretizações, o CAR contém um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, scFv) que reconhece especificamente um antígeno, como um antígeno intacto, expresso na superfície de uma célula.

[00651] Em algumas concretizações, o antígeno (ou um ligante) é um antígeno de tumor ou marcador de câncer. Em algumas concretizações, o antígeno (ou um ligante) é ou inclui a integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha\beta 6$), antígeno de maturação de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno câncer-testículo, antígeno $1B$ câncer/testículo (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, Ligante de Quimiocina de Motivo C-C 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171,

proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR VIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo do receptor Fc 5 ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), uma proteína de ligação ao folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipecano-3 (GPC3), membro D do grupo 5 do receptor acoplado à proteína G classe C (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinase receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros de erbB, antígeno associado ao melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície de hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R α), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve capa, molécula de adesão celular L1 (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, Membro A da Família 8 Contendo Repetição Rica em Leucina (LRRRC8A), Lewis Y, antígeno associado ao melanoma (MAGE) -A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligantes do membro D grupo 2 exterminador natural (NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de células neurais (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferivelmente expresso de melanoma (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico da próstata, antígeno de células-tronco de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), Receptor Órfão Tipo Tirosina Cinase Receptora 1 (ROR1), survivina, glicoproteína associada ao tumor 72 (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína associada a tumores (TAG72), proteína relacionada à tirosinase 1

(TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína relacionada à tirosinase 2 (TRP2, também conhecido como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), tumor de Wilms 1 (WT-1), um patógeno expresso por patógeno ou específico de patógeno, ou um antígeno associado a um marcador universal, e/ou moléculas biotiniladas, e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos. Os antígenos direcionados pelos receptores em algumas concretizações incluem antígenos associados a uma malignidade de células B, como qualquer um de vários marcadores de células B conhecidos. Em algumas concretizações, o antígeno é ou inclui CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igcapa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30.

[00652] Em algumas concretizações, o CAR é um CAR anti-BCMA que é específico para BCMA, por exemplo, BCMA humano. Receptores de antígeno quiméricos contendo anticorpos anti-BCMA, incluindo anticorpos BCMA anti-humanos de camundongo e anticorpos anti-humanos humanos, e células que expressam esses receptores quiméricos foram descritas anteriormente. Veja, Carpenter *et al.*, Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060, WO 2016/090320, WO2016090327, WO2010104949A2 e WO2017173256. Em algumas concretizações, o antígeno ou o domínio de ligação ao antígeno é o BCMA. Em algumas concretizações, o scFv contém uma V_H e uma V_L derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para BCMA. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga ao BCMA é ou contém uma V_H e uma V_L de um anticorpo ou fragmento de anticorpo estabelecido nos Pedidos de Patente Internacionais, Número de Publicação WO 2016/090327 e WO 2016/090320.

[00653] Em algumas concretizações, o CAR anti-BCMA contém um

domínio de ligação ao antígeno, como um scFv, que contém uma região pesada variável (V_H) e/ou uma região leve variável (V_L) derivada de um anticorpo descrito em WO 2016/090320 ou WO2016090327. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno, tal como um scFv, contém uma V_H mencionada em SEQ ID NO: 30 e uma V_L mencionada em SEQ ID NO: 31. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno, tal como um scFv, contém uma V_H mencionada em SEQ ID NO: 32 e uma V_L mencionada em SEQ ID NO: 33. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno, tal como um scFv, contém uma V_H mencionada em SEQ ID NO: 34 e uma V_L mencionada em SEQ ID NO: 35. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno, tal como um scFv, contém uma V_H mencionada em SEQ ID NO: 27 e uma V_L mencionada em SEQ ID NO: 28. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno, tal como um scFv, contém uma V_H mencionada em SEQ ID NO: 41 e uma V_L mencionada em SEQ ID NO: 42. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno tal como um scFv, contém uma V_H mencionada em SEQ ID NO: 43 e uma V_L mencionada em SEQ ID NO: 44. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno, tal como um scFv, contém uma V_H mencionada em SEQ ID NO: 45 e uma V_L mencionada em SEQ ID NO: 46. Em algumas concretizações, a V_H ou V_L tem uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para qualquer uma das sequências V_H ou V_L anteriores, e mantém a ligação ao BCMA . Em algumas concretizações, a região V_H é amino-terminal à região V_L . Em algumas concretizações, a região V_H é carbóxi-terminal para a região V_L .

[00654] Em algumas concretizações, o antígeno ou o domínio de ligação ao antígeno é CD19. Em algumas concretizações, o scFv con-

têm uma V_H e uma V_L derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD19. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga ao CD19 é um anticorpo derivado de camundongo como FMC63 e SJ25C1. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo humano, por exemplo, como descrito na Publicação de Patente Norteamericana No. US 2016/0152723.

[00655] Em algumas concretizações, o CAR é um CAR anti-CD19 específico para CD19, por exemplo, CD19 humano. Em algumas concretizações, os domínios scFv e/ou V_H são derivados de FMC63. FMC63 geralmente refere-se a um anticorpo IgG1 monoclonal de camundongo aumentado contra células Nalm-1 e -16 que expressam CD19 de origem humana (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Em algumas concretizações, o anticorpo FMC63 compreende CDR-H1 e CDR-H2 mencionadas em SEQ ID NOS: 50 e 51 respectivamente, e CDR-H3 mencionada em SEQ ID NO: 52 ou 66 e CDR-L1 mencionada em SEQ ID NO: 47 e CDR-L2 mencionada em SEQ ID NO: 48 ou 67 e CDR-L3 mencionada em SEQ ID NO: 49 ou 68. Em algumas concretizações, o anticorpo FMC63 compreende a região da cadeia pesada variável (V_H) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 e a região da cadeia leve variável (V_L) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

[00656] Em algumas concretizações, o scFv compreende uma cadeia leve variável que contém a sequência CDR-L1 de SEQ ID NO: 47, uma sequência CDR-L2 de SEQ ID NO: 48 e uma sequência CDR-L3 de SEQ ID NO: 49 e/ou uma cadeia pesada variável contendo uma sequência CDR-H1 de SEQ ID NO: 50, uma sequência CDR-H2 de SEQ ID NO: 51 e uma sequência CDR-H3 de SEQ ID NO: 52. Em algumas concretizações, o scFv compreende uma região da cadeia pesada variável mencionada em SEQ ID NO: 53 e uma região da cadeia

leve variável mencionada em SEQ ID NO: 54. Em algumas concretizações, as cadeias pesada variável e leve variável são conectadas por um ligante. Em algumas concretizações, o ligante é mencionado em SEQ ID NO: 70. Em algumas concretizações, o scFv compreende, em ordem, uma V_H , um ligante e uma V_L . Em algumas concretizações, o scFv compreende, em ordem, uma V_L , um ligante e uma V_H . Em algumas concretizações, o scFv é codificado por uma sequência de nucleotídeos mencionada em SEQ ID NO: 69 ou uma sequência que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência para SEQ ID NO: 69. Em algumas concretizações, o scFv compreende a sequência de aminoácidos mencionada em SEQ ID NO: 55 ou uma sequência que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência para SEQ ID NO: 55.

[00657] Em algumas concretizações, o scFv é derivado de SJ25C1. SJ25C1 é um anticorpo IgG1 monoclonal de camundongo criado contra células Nalm-1 e -16 que expressam CD19 de origem humana (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Em algumas concretizações, o anticorpo SJ25C1 compreende CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 mencionada em SEQ ID NOS: 59-61, respectivamente, e as sequências CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 mencionadas em SEQ ID NOS: 56-58, respectivamente. Em algumas concretizações, o anticorpo SJ25C1 compreende a região da cadeia pesada variável (V_H) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 e a região da cadeia leve variável (V_L) compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

[00658] Em algumas concretizações, o scFv compreende uma cadeia leve variável contendo uma sequência CDR-L1 de SEQ ID NO: 56, uma sequência CDR-L2 de SEQ ID NO: 57 e uma sequência CDR-

L3 de SEQ ID NO: 58 e/ou uma cadeia pesada variável contendo uma sequência CDR-H1 de SEQ ID NO: 59, uma sequência CDR-H2 de SEQ ID NO: 60 e uma sequência CDR-H3 de SEQ ID NO: 61. Em algumas concretizações, o scFv compreende uma região da cadeia pesada variável mencionada em SEQ ID NO: 62 e uma região da cadeia leve variável mencionada em SEQ ID NO: 63. Em algumas concretizações, a cadeia pesada variável e leve variável são conectadas por um ligante. Em algumas concretizações, o ligante é mencionado em SEQ ID NO: 64. Em algumas concretizações, o scFv compreende, em ordem, uma V_H , um ligante e uma V_L . Em algumas concretizações, o scFv compreende, em ordem, uma V_L , um ligante e uma V_H . Em algumas concretizações, o scFv compreende a sequência de aminoácidos mencionada em SEQ ID NO: 65 ou uma sequência que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência para SEQ ID NO: 65.

[00659] Em algumas concretizações, o antígeno é CD20. Em algumas concretizações, o scFv contém uma V_H e uma V_L derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD20. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga o CD20 é um anticorpo que é ou é derivado de Rituximabe, tal como o Rituximabe scFv.

[00660] Em algumas concretizações, o antígeno é CD22. Em algumas concretizações, o scFv contém uma V_H e uma V_L derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD22. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que liga o CD22 é um anticorpo que é ou é derivado de m971, tal como é m971 scFv.

[00661] Em algumas concretizações, o antígeno ou o domínio de ligação ao antígeno é o GPRC5D. Em algumas concretizações, o scFv

contém uma V_H e uma V_L derivadas de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para GPRC5D. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a GPRC5D é ou contém uma V_H e uma V_L de um anticorpo ou fragmento de anticorpo mencionado nos Pedidos de Patente Internacionais, Número de Publicação WO 2016/090329 e WO 2016/090312.

[00662] Em algumas concretizações, o anticorpo é um fragmento de ligação ao antígeno, como um scFv, que inclui um ou mais ligantes que unem dois domínios ou regiões de anticorpo, como uma região da cadeia pesada variável (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L). O ligante é tipicamente um ligante peptídico, por exemplo, um ligante peptídico flexível e/ou solúvel. Entre os ligantes estão os ricos em glicina e serina e/ou em alguns casos treonina. Em algumas concretizações, os ligantes incluem ainda resíduos carregados como a lisina e/ou glutamato, que podem melhorar a solubilidade. Em algumas concretizações, os ligantes incluem ainda uma ou mais prolina. Em alguns aspectos, os ligantes ricos em glicina e serina (e/ou treonina) incluem pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% desse(s) aminoácido(s). Em algumas concretizações, eles incluem pelo menos em ou cerca de 50%, 55%, 60%, 70% ou 75%, glicina, serina e/ou treonina. Em algumas concretizações, o ligante é compreendido substancialmente inteiramente de glicina, serina e/ou treonina. Os ligantes geralmente têm entre cerca de 5 e cerca de 50 aminoácidos no comprimento, geralmente entre ou cerca de 10 e em ou cerca de 10 e 30, por exemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30, e em alguns exemplos entre 10 e 25 aminoácidos no comprimento. Ligantes exemplares incluem ligantes tendo vários números de repetições da sequência GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 36) ou GGGS (3GS; SEQ ID NO: 37), tal como 2, 3, 4 e 5 repetições de uma tal sequência. Ligantes

exemplares incluem aqueles tendo ou consistindo em uma sequência mencionada em SEQ ID NO: 38 (GGGGSGGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 39 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) ou SEQ ID NO: 40 (SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA).

[00663] Em algumas concretizações, o antígeno é ou inclui um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno. Em algumas concretizações, o antígeno é um antígeno viral (como um antígeno viral de HIV, HCV, HBV etc.), antígenos bacterianos e/ou antígenos parasitários. Em algumas concretizações, o CAR contém um anticorpo tipo TCR, como um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, scFv) que reconhece especificamente um antígeno intracelular, como um antígeno associado a um tumor, apresentado na superfície celular como um complexo MHC-peptídeo. Em algumas concretizações, um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno que reconhece um complexo MHC-peptídeo pode ser expresso em células como parte de um receptor recombinante, como um receptor de antígeno. Entre os receptores de antígeno estão os receptores de antígeno não TCR funcionais, como receptores de antígeno quiméricos (CARs). Geralmente, um CAR contendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que exhibe especificidade tipo TCR direcionada contra complexos peptídeo-MHC também pode ser referido como um CAR tipo TCR.

[00664] A referência a "Complexo de histocompatibilidade principal" (MHC) refere-se a uma proteína, geralmente uma glicoproteína, que contém um sítio de ligação ao peptídeo polimórfico ou um sulco de ligação que pode, em alguns casos, complexar com antígenos peptídicos de polipeptídeos, incluindo antígenos peptídicos processados pelo maquinário celular. Em alguns casos, as moléculas de MHC podem ser exibidas ou expressas na superfície da célula, incluindo como um complexo com peptídeo, isto é, complexo MHC-peptídeo, para apre-

sentação de um antígeno em uma conformação reconhecível por um receptor de antígeno nas células T, como os TCRs ou anticorpo tipo TCR. Geralmente, as moléculas classe I de MHC são heterodímeros tendo uma membrana que abrange a cadeia α , em alguns casos com três domínios α e uma microglobulina β_2 não covalentemente associada. Geralmente, as moléculas classe II de MHC são compostas por duas glicoproteínas de transmembrana, α e β , ambas das quais tipicamente abrangem a membrana. Uma molécula de MHC pode incluir uma porção eficaz de um MHC que contém um sítio ou sítios de ligação ao antígeno para a ligação de um peptídeo e as sequências necessárias para o reconhecimento pelo receptor de antígeno apropriado. Em algumas concretizações, as moléculas classe I de MHC liberam peptídeos originados no citosol à superfície celular, onde um complexo MHC-peptídeo é reconhecido pelas células T, geralmente como células T CD8⁺, porém, em alguns casos, células T CD4⁺. Em algumas concretizações, as moléculas classe II de MHC liberam peptídeos originados no sistema vesicular à superfície celular, onde são tipicamente reconhecidos pelas células T CD4⁺. Geralmente, as moléculas de MHC são codificadas por um grupo de loci ligados, que são coletivamente denominados H-2 no camundongo e antígeno leucocitário humano (HLA) em humanos. Portanto, o MHC tipicamente humano também pode ser referido como antígeno leucocitário humano (HLA).

[00665] O termo "complexo MHC-peptídeo" ou "complexo peptídeo-MHC" ou variações do mesmo refere-se a um complexo ou associação de um antígeno peptídico e uma molécula de MHC, como, geralmente, por interações não covalentes do peptídeo no sulco de ligação ou fenda da molécula de MHC. Em algumas concretizações, o complexo MHC-peptídeo está presente ou exibido na superfície das células. Em algumas concretizações, o complexo MHC-peptídeo pode ser reconhecido especificamente por um receptor de antígeno, como um TCR,

um CAR tipo TCR ou porções de ligação a antígenos.

[00666] Em algumas concretizações, um peptídeo, tal como um antígeno peptídico ou epítipo, de um polipeptídeo pode associar-se a uma molécula de MHC, tal como para o reconhecimento por um receptor de antígeno. Geralmente, o peptídeo é derivado de ou com base em um fragmento de uma molécula biológica mais longa, tal como um polipeptídeo ou proteína. Em algumas concretizações, o peptídeo normalmente tem cerca de 8 a cerca de 24 aminoácidos no comprimento. Em algumas concretizações, um peptídeo tem um comprimento de cerca de ou de cerca de 9 a 22 aminoácidos para reconhecimento no complexo Classe II de MHC. Em algumas concretizações, um peptídeo tem um comprimento de ou de cerca de 8 a 13 aminoácidos para o reconhecimento no complexo Classe I de MHC. Em algumas concretizações, no reconhecimento do peptídeo no contexto de uma molécula de MHC, como o complexo MHC-peptídeo, o receptor de antígeno, tal como TCR ou CAR tipo TCR, produz ou dispara um sinal de ativação para a célula T que induz uma resposta de células T, como a proliferação de células T, produção de citocinas, uma resposta de células T citotóxicas ou outra resposta.

[00667] Em algumas concretizações, um anticorpo tipo TCR ou uma porção de ligação ao antígeno é conhecido ou pode ser produzido por métodos conhecidos (veja, por exemplo, Pedido Publicado Norte Americano Nos. US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; e Publicação PCT Internacional No. WO 03/068201).

[00668] Em algumas concretizações, um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a um complexo MHC-peptídeo, pode ser produzido por imunização de um hospedeiro com uma quantidade eficaz de um imunógeno contendo um complexo MHC-peptídeo específico. Em alguns casos, o peptídeo do

complexo MHC-peptídeo é um epítopo do antígeno capaz de se ligar ao MHC, como um antígeno tumoral, por exemplo, um antígeno de tumor universal, antígeno de mieloma ou outro antígeno, conforme descrito abaixo. Em algumas concretizações, uma quantidade eficaz do imunógeno é, então, administrada a um hospedeiro para eliciar uma resposta imune; em que o imunógeno mantém uma forma tridimensional do mesmo por um período de tempo suficiente para eliciar uma resposta imune contra a apresentação tridimensional do peptídeo no sulco de ligação da molécula de MHC. O soro coletado do hospedeiro é, então, analisado para determinar se os anticorpos desejados que reconhecem uma apresentação tridimensional do peptídeo no sulco de ligação da molécula de MHC estão sendo produzidos. Em algumas concretizações, os anticorpos produzidos podem ser avaliados para confirmar que o anticorpo pode diferenciar o complexo MHC-peptídeo da molécula de MHC sozinha, o peptídeo de interesse sozinho e um complexo MHC e peptídeo irrelevante. Os anticorpos desejados podem, então, ser isolados.

[00669] Em algumas concretizações, um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a um complexo MHC-peptídeo pode ser produzido empregando métodos de exibição de bibliotecas de anticorpos, tais como bibliotecas de anticorpos de fagos. Em algumas concretizações, bibliotecas de exibição de fagos de Fab mutante, scFv ou outras formas de anticorpo podem ser geradas, por exemplo, em que os membros da biblioteca são mutados em um ou mais resíduos de uma CDR ou CDRs. Veja por exemplo, pedido publicado Norte Americano No. US20020150914, US2014/0294841; e Cohen CJ. *et al.* (2003) *J. Mol. Recogn.* 16:324-332.

[00670] O termo "anticorpo" aqui é usado no sentido mais amplo e inclui anticorpos policlonais e monoclonais, incluindo anticorpos intac-

tos e fragmentos de anticorpos funcionais (ligação ao antígeno), incluindo os fragmentos, fragmentos de de ligação ao antígeno (Fab), fragmento F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinantes (rIgG), regiões de cadeia pesada variável (V_H) capazes de se ligar especificamente ao antígeno, fragmentos de anticorpos de cadeia única, incluindo fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) e fragmentos de anticorpos de domínio único (por exemplo, sdAb, sdFv, nanocorpo). O termo abrange formas geneticamente modificadas e/ou de outra maneira modificadas de imunoglobulinas, como intracorpos, pepticorpos, anticorpos quiméricos, anticorpos totalmente humanos, anticorpos humanizados e anticorpos de heteroconjugado, anticorpos multiespecíficos, por exemplo, biespecíficos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos, di-scFv em tandem, tri-scFv em tandem. A menos que de outra maneira declarado, o termo "anticorpo" deve ser entendido como abrangendo fragmentos de anticorpos funcionais do mesmo. O termo também abrange anticorpos intactos ou de tamanho natural, incluindo anticorpos de qualquer classe ou subclasse, incluindo IgG e subclases do mesmo, IgM, IgE, IgA e IgD.

[00671] Os termos "região de determinação da complementaridade" e "CDR", sinônimo de "região hipervariável" ou "HVR", são conhecidos na técnica por se referirem a sequências não contíguas de aminoácidos dentro das regiões variáveis de anticorpos, que conferem especificidade de antígeno e/ou afinidade de ligação. Em geral, existem três CDRs em cada região da cadeia pesada variável (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) e três CDRs em cada região da cadeia leve variável (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). "Regiões de estrutura" e "FR" são conhecidas na técnica por se referirem às porções não CDR das regiões variáveis das cadeias pesada e leve. Em geral, existem quatro FRs em cada região variável de cadeia pesada de tamanho natural (FR-H1, FR-H2, FR-H3 e FR-H4) e quatro FRs em cada região variável de cadeia leve

de tamanho natural (FR- L1, FR-L2, FR-L3 e FR-L4).

[00672] Os limites de sequência de aminoácido precisos de uma determinada CDR ou FR podem ser facilmente determinados usando qualquer um de vários esquemas bem conhecidos, incluindo os descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeração "Kabat"); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273, 927-948 (esquema de numeração "Chothia"); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745. (Esquema de numeração "Contact"); Lefranc MP *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan; 27(1):55-77 (esquema de numeração "IMGT"); Honegger A and Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8; 309(3):657-70 (esquema de numeração "Aho"); e Martin *et al.*, "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272 (esquema de numeração "AbM").

[00673] Os limites de uma determinada CDR ou FR podem variar dependendo do esquema usado para identificação. Por exemplo, o esquema Kabat é baseado em alinhamentos estruturais, enquanto o esquema Chothia é baseado em informações estruturais. A numeração para ambos os esquemas de Kabat e Chothia baseia-se nos comprimentos de sequência da região de anticorpo mais comuns, com inserções acomodadas por letras de inserção, por exemplo, "30a" e deleções que aparecem em alguns anticorpos. Os dois esquemas colocam determinadas inserções e deleções ("indels") em posições diferentes, resultando em numeração diferencial. O esquema de Contact é

baseado na análise de estruturas cristalinas complexas e é semelhante em muitos aspectos ao esquema de numeração de Chothia. O esquema de AbM é um compromisso entre as definições de Kabat e Chothia, com base no usado pelo software de modelagem de anticorpos AbM da Oxford Molecular.

[00674] A **Tabela 1**, abaixo, alista os limites de posição exemplares de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 e CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, conforme identificados pelos esquemas de Kabat, Chothia, AbM e Contact, respectivamente. Para CDR-H1, a numeração de resíduos é listada usando os esquemas de numeração Kabat e Chothia. As FRs estão localizadas entre CDRs, por exemplo, com FR-L1 localizado antes de CDR-L1, FR-L2 localizado entre CDR-L1 e CDR-L2, FR-L3 localizado entre CDR-L2 e CDR-L3 e assim por diante. Note-se que, como o esquema de numeração Kabat mostrado coloca inserções em H35A e H35B, o final da alça de CDR-H1 de Chothia quando numerado usando a convenção de numeração Kabat mostrada varia entre H32 e H34, dependendo do comprimento da alça.

Tabela 1. Limites de CDRs de acordo com vários esquemas de numeração.

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contacto
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Numeração ¹ Kabat)	H31--H35B	H26-- H32.34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Numeração ² Chothia)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

1 - Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5a. Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2 - Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948

[00675] Desse modo, a menos que de outra maneira especificado, uma "CDR" ou "região de determinação da complementaridade" ou CDRs especificadas individuais (por exemplo, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) de um determinado anticorpo ou região do mesmo, tal como uma região variável do mesmo, deve ser entendida como abrangendo uma (ou a específica) região de determinação da complementaridade, conforme definido por qualquer um dos esquemas mencionados acima, ou outros esquemas conhecidos. Por exemplo, onde se afirma que uma CDR particular (por exemplo, uma CDR-H3) contém a sequência de aminoácidos de uma CDR correspondente em uma determinada sequência de aminoácidos da região V_H ou V_L , entende-se que essa CDR tem uma sequência da CDR correspondente (por exemplo, CDR-H3) dentro da região variável, conforme definido por qualquer um dos esquemas anteriormente mencionados, ou outros esquemas conhecidos. Em algumas concretizações, as sequências de CDR específicas são especificadas. Sequências de CDR exemplares de anticorpos são descritas usando vários esquemas de numeração, embora seja entendido que um anticorpo pode incluir CDRs como descrito de acordo com qualquer um dos outros esquemas de numeração anteriormente mencionados ou outros esquemas de numeração conhecidos por uma pessoa versada.

[00676] Da mesma forma, a menos que outro maneira especificado, uma FR ou FR(s) especificada(s) individual(ais) (por exemplo, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) de um determinado anticorpo ou região do mesmo, tal como uma região variável do mesmo, deve ser entendida(s) como abrangendo uma região de estrutura (ou a específica) conforme definido por qualquer um dos esquemas conhecidos. Em alguns casos, o esquema para identificação de uma CDR, FR, ou FR ou CDR específicas é especificado, como o CDR, conforme definido pelo mé-

todo de Kabat, Chothia, AbM ou Contact, ou outros esquemas conhecidos. Em outros casos, a sequência de aminoácido particular de uma CDR ou FR é determinada.

[00677] Em algumas concretizações, as proteínas de ligação ao antígeno, os anticorpos e os fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo reconhecem especificamente um antígeno de um anticorpo de tamanho natural. Em algumas concretizações, as cadeias pesada e leve de um anticorpo podem ser de tamanho natural ou podem ser uma porção de ligação ao antígeno (um fragmento Fab, F(ab')₂, Fv ou um Fv de cadeia única (scFv)). Em outras concretizações, a região constante da cadeia pesada do anticorpo é escolhida de, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, particularmente escolhida de, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, mais particularmente, IgG1 (por exemplo, IgG1 humana). Em outra concretização, a região constante da cadeia leve do anticorpo é escolhida de, por exemplo, kappa ou lambda, particularmente kappa.

[00678] Entre os anticorpos estão os fragmentos de anticorpos. Um "fragmento de anticorpo" refere-se a uma molécula que não seja um anticorpo intacto que compreende uma porção de um anticorpo intacto que liga o antígeno ao qual o anticorpo intacto se liga. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, porém, não estão limitados a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacorpos; anticorpos lineares; regiões de cadeia pesada variáveis (VH), moléculas de anticorpo de cadeia única como scFvs e anticorpos únicos de V_H de domínio único; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo. Em concretizações particulares, os anticorpos são fragmentos de anticorpos de cadeia única compreendendo uma região da cadeia pesada variável e/ou uma região da cadeia leve variável, como scFvs.

[00679] O termo "região variável" ou "domínio variável" refere-se ao domínio de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo que está envolvi-

do na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve (V_H e V_L , respectivamente) de um anticorpo nativo geralmente têm estruturas similares, com cada domínio compreendendo quatro regiões de estrutura conservadas (FRs) e três CDRs. (Veja, por exemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Um único domínio de V_H ou V_L pode ser suficiente para conferir especificidade de ligação ao antígeno. Além disso, anticorpos que ligam um antígeno particular pode ser isolado usando um domínio V_H ou V_L de um anticorpo que liga o antígeno para rastrear uma biblioteca de domínios V_L ou V_H complementares, respectivamente. Veja, por exemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880- 887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

[00680] Anticorpos de domínio único são fragmentos de anticorpo que compreendem todo ou uma porção do domínio variável de cadeia pesada ou toda ou uma porção do domínio variável da cadeia leve de um anticorpo. Em certas concretizações, um anticorpo de domínio único é um anticorpo de domínio único humano. Em algumas concretizações, o CAR compreende um domínio de cadeia pesada de anticorpo que liga especificamente o antígeno, como um marcador de câncer ou antígeno de superfície celular de uma célula ou doença a ser direcionado, como uma célula tumoral ou uma célula de câncer, como qualquer um dos antígenos alvo aqui descritos ou conhecidos.

[00681] Os fragmentos de anticorpos podem ser feitos por várias técnicas, incluindo, porém, não limitados à digestão proteolítica de um anticorpo intacto, bem como a produção por células hospedeiras recombinantes. Em algumas concretizações, os anticorpos são fragmentos recombinantemente produzidos, como fragmentos compreendendo arranjos que não ocorrem naturalmente, como aqueles com duas ou mais regiões ou cadeias de anticorpos unidos por ligantes sintéticos, por exemplo, ligantes peptídicos, e/ou que são, não podem ser produ-

zidos pela digestão enzimática de um anticorpo intacto de ocorrência natural. Em algumas concretizações, os fragmentos de anticorpo são scFvs.

[00682] Um anticorpo "humanizado" é um anticorpo no qual todos ou substancialmente todos os resíduos de aminoácidos de CDR são derivados de CDR não humanas e todos ou substancialmente todos os resíduos de aminoácidos de FR são derivados de FRs humanas. Um anticorpo humanizado opcionalmente pode incluir pelo menos uma porção de uma região constante de anticorpo derivada de um anticorpo humano. Uma "forma humanizada" de um anticorpo não humano, refere-se a uma variante do anticorpo não humano que foi submetido à humanização, tipicamente para reduzir a imunogenicidade para seres humanos, enquanto mantendo a especificidade e afinidade do anticorpo não humano de origem. Em algumas concretizações, alguns resíduos de FR em um anticorpo humanizado são substituídos por resíduos correspondentes de um anticorpo não humano (por exemplo, o anticorpo do qual os resíduos de CDR são derivados), por exemplo, para restaurar ou melhorar a especificidade ou afinidade do anticorpo.

[00683] Desse modo, em algumas concretizações, o receptor de antígeno quimérico, incluindo CARs tipo TCR, inclui uma porção extracelular contendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento inclui um scFv. Em alguns aspectos, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo o anticorpo ou fragmento e uma região de sinalização intracelular. Em algumas concretizações, uma região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primária em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente de receptor de

célula T (TCR), e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[00684] Em algumas concretizações, o receptor recombinante como o CAR, como a porção de anticorpo do mesmo, inclui ainda um espaçador, que pode ser ou incluir pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina ou variante ou versão modificada da mesma, como uma região de articulação, por exemplo, uma região de articulação de IgG4 e/ou uma região de C_H1/C_L e/ou Fc. Em algumas concretizações, o receptor recombinante também compreende um espaçador e/ou uma região de articulação. Em algumas concretizações, a região constante ou porção é de uma IgG humana, como IgG4 ou IgG1. Em alguns aspectos, a porção da região constante serve como uma região de espaçador entre o componente de reconhecimento de antígeno, por exemplo, scFv e o domínio de transmembrana. O espaçador pode ter um comprimento que forneça responsividade aumentada da célula após a ligação ao antígeno, em comparação com a ausência do espaçador.

[00685] Em alguns exemplos, o espaçador é de, ou cerca de 12 aminoácidos no comprimento ou não tem mais de 12 aminoácidos no comprimento. Espaçadores exemplares incluem aqueles que têm pelo menos cerca de 10 a 229 aminoácidos, cerca de 10 a 200 aminoácidos, cerca de 10 a 175 aminoácidos, cerca de 10 a 150 aminoácidos, cerca de 10 a 125 aminoácidos, cerca de 10 até 100 aminoácidos, cerca de 10 a 75 aminoácidos, cerca de 10 a 50 aminoácidos, cerca de 10 a 40 aminoácidos, cerca de 10 a 30 aminoácidos, cerca de 10 a 20 aminoácidos, ou cerca de 10 a 15 aminoácidos e incluindo qualquer número inteiro entre os pontos finais de qualquer uma das faixas listadas. Em algumas concretizações, uma região de espaçador tem cerca de 12 aminoácidos ou menos, cerca de 119 aminoácidos ou menos, ou cerca de 229 aminoácidos ou menos. Espaçadores exemplares in-

cluem articulação de IgG4 sozinha, articulação de IgG4 ligada aos domínios C_{H2} e C_{H3}, ou articulação de IgG4 ligada ao domínio CH₃. Espaçadores exemplares incluem, porém, não estão limitados aos descritos em Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol Res.* 3(2): 125–135 ou número de publicação do pedido de patente internacional número WO2014031687, Patente Norte-americana 8.822.647 ou pedido publicado No. US2014/0271635. Em algumas concretizações, o espaçador inclui uma sequência de uma região de articulação de imunoglobulina, uma região de C_{H2} e C_{H3}. Em algumas concretizações, uma das mais articulações, C_{H2} e C_{H3} é derivada total ou em parte de IgG4 ou IgG2. Em alguns casos, a articulação, C_{H2} e C_{H3} é derivada de IgG4. Em alguns aspectos, uma ou mais das articulações, C_{H2} e C_{H3} é quimérico e contém sequência derivada de IgG4 e IgG2. Em alguns exemplos, o espaçador contém uma articulação quimérica de IgG4/2, uma região de IgG2/4 C_{H2} e uma de IgG4 C_{H3}.

[00686] Em algumas concretizações, o espaçador pode ser derivado total ou em parte de IgG4 e/ou IgG2 e pode conter mutações, como um ou mais aminoácidos mutados únicos em um ou mais domínios. Em alguns exemplos, a modificação de aminoácidos é uma substituição de uma prolina (P) por uma serina (S) na região de articulação de uma IgG4. Em algumas concretizações, a modificação de aminoácidos é uma substituição de uma glutamina (Q) por uma asparagina (N) para reduzir a heterogeneidade da glicosilação, tal como uma mutação N177Q na posição 177, na região CH₂, da sequência de Fc de IgG4 de tamanho natural ou um N176Q na posição 176, na região CH₂, da sequência de Fc de IgG4 de tamanho natural.

[00687] Em algumas concretizações, o espaçador tem a sequência ESKYGPPCPPCP (mencionada em SEQ ID NO: 1), e é codificado pela sequência mencionada em SEQ ID NO: 2. Em algumas concretiza-

ções, o espaçador tem a sequência mencionada em SEQ ID NO: 3. Em algumas concretizações, o espaçador tem a sequência mencionada em SEQ ID NO: 4. Em algumas concretizações, o espaçador codificado é ou contém a sequência mencionada em SEQ ID NO: 29. Em algumas concretizações, a região constante ou porção é de IgD. Em algumas concretizações, o espaçador tem a sequência mencionada em SEQ ID NO: 5. Em algumas concretizações, o espaçador tem uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 5 ou 29.

[00688] Em algumas concretizações, a região constante ou porção é de IgD. Em algumas concretizações, o espaçador tem a sequência mencionada em SEQ ID NO: 5. Em algumas concretizações, o espaçador tem uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87 %, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 3, 4 e 5.

[00689] O domínio de reconhecimento de antígeno geralmente está ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelular, como componentes de sinalização que imitam a ativação por meio de um complexo receptor de antígeno, como um complexo de TCR, no caso de um CAR, e/ou sinal por outro receptor de superfície celular. Desse modo, em algumas concretizações, o componente de ligação ao antígeno (por exemplo, anticorpo) está ligado a uma ou mais regiões de sinalização intracelular e de transmembrana. Em algumas concretizações, o domínio de transmembrana é fundido ao domínio extracelular. Em uma concretização, um domínio de transmembrana que naturalmente está associado a um dos domínios no receptor, por exemplo, CAR, é usado. Em alguns casos, o domínio de transmembrana é sele-

cionado ou modificado por substituição de aminoácidos para evitar a ligação de tais domínios aos domínios de transmembrana da mesma ou de diferentes proteínas da membrana de superfície para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor.

[00690] O domínio de transmembrana em algumas concretizações é derivado de uma fonte natural ou de uma fonte sintética. Onde a fonte é natural, o domínio em alguns aspectos é derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou transmembrana. As regiões de transmembrana incluem aquelas derivadas de (isto é, compreende pelo menos a(s) região(ões) de transmembrana de) cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, o domínio de transmembrana em algumas concretizações é sintético. Em alguns aspectos, o domínio de transmembrana sintético compreende predominantemente resíduos hidrofóbicos como leucina e valina. Em alguns aspectos, um triplete de fenilalanina, triptofano e valina será encontrado em cada extremidade de um domínio de transmembrana sintético. Em algumas concretizações, a ligação é feita por ligantes, espaçadores e/ou domínio(s) de transmembrana.

[00691] Entre uma região de sinalização intracelular estão aquelas que imitam ou aproximam um sinal através de um receptor de antígeno natural, um sinal através desse receptor em combinação com um receptor coestimulador, e/ou um sinal apenas através de um receptor coestimulador sozinho. Em algumas concretizações, um ligante curto de oligo- ou polipeptídeo, por exemplo, um ligante dentre 2 e 10 aminoácidos no comprimento, como aquele contendo glicinas e serinas, por exemplo, dupletos de glicina-serina, está presente e forma uma ligação entre o domínio de transmembrana e o domínio de sinalização citoplásmico do CAR.

[00692] O receptor, por exemplo, o CAR, geralmente inclui pelo menos um componente ou componentes de sinalização intracelular. Em algumas concretizações, o receptor inclui um componente intracelular de um complexo de TCR, como uma cadeia CD3 de CDR que media a ativação de células T e citotoxicidade, por exemplo, cadeia zeta CD3. Desse modo, em alguns aspectos, o anticorpo de ligação ao ROR1 está ligado a um ou mais módulos de sinalização celular. Em algumas concretizações, os módulos de sinalização celular incluem o domínio de transmembrana CD3, domínios de sinalização intracelular CD3 e/ou outros domínios de transmembrana CD. Em algumas concretizações, o receptor, por exemplo, CAR, inclui ainda uma porção de uma ou mais moléculas adicionais, como o receptor de Fc γ , CD8, CD4, CD25 ou CD16. Por exemplo, em alguns aspectos, o CAR inclui uma molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) ou receptor de Fc γ e CD8, CD4, CD25 ou CD16.

[00693] Em algumas concretizações, na ligação do CAR, o domínio citoplasmático ou a região de sinalização intracelular do CAR ativados pelo menos uma das funções efetoras normais ou respostas da célula imune, por exemplo, célula T modificada para expressar o CAR. Por exemplo, em alguns contextos, o CAR induz a função de uma atividade citolítica ou atividade da T auxiliar, como a secreção de citocinas ou outros fatores. Em algumas concretizações, uma porção truncada de uma região de sinalização intracelular de um componente de receptor de antígeno ou molécula coestimuladora é usada no lugar de uma cadeia imunoestimuladora intacta, por exemplo, se ela transduz o sinal da função efetora. Em algumas concretizações, as regiões de sinalização intracelulares, por exemplo, compreendendo o domínios ou domínio intracelulares, incluem as sequências citoplasmáticas do receptor de células T (TCR) e, em alguns aspectos, também os de correceptores que no contexto natural agem em conjunto com esse receptor para

iniciar a transdução sinal após o envolvimento do receptor de antígeno, e/ou qualquer derivado ou variante de tais moléculas, e/ou qualquer sequência sintética que tenha a mesma capacidade funcional.

[00694] No contexto de um TCR natural, a ativação total geralmente requer não apenas sinalização através do TCR, mas também um sinal coestimulador. Desse modo, em algumas concretizações, para promover a ativação completa, um componente para gerar sinal secundário ou coestimulador também é incluído no CAR. Em outras concretizações, o CAR não inclui um componente para gerar um sinal coestimulador. Em alguns aspectos, um CAR adicional é expresso na mesma célula e fornece o componente para gerar o sinal secundário ou coestimulador.

[00695] A ativação de células T é, em alguns aspectos, descrita como sendo mediada por duas classes de sequências de sinalização citoplasmáticas: aquelas que iniciam a ativação primária dependente de antígeno através do TCR (sequências de sinalização citoplasmáticas primárias) e aquelas que agem de maneira independente de antígeno para fornecer um sinal secundário ou coestimulador (sequências de sinalização citoplasmáticas secundárias). Em alguns aspectos, o CAR inclui um ou ambos os componentes de sinalização.

[00696] Em alguns aspectos, o CAR inclui uma sequência de sinalização citoplasmática primária que regula a ativação primária do complexo de TCR. As sequências de sinalização citoplasmáticas primárias que atuam de maneira estimuladora podem conter motivos de sinalização que são conhecidos como motivos de ativação com base em tirosina imunorreceptora ou ITAMs. Exemplos de sequências de sinalização citoplasmáticas primárias de ITAM incluem aquelas derivadas de TCR ou CD3 zeta, FcR gama ou FcR beta. Em algumas concretizações, a(s) molécula(s) de sinalização citoplasmática(s) no CAR contém(contêm) um domínio de sinalização citoplasmático, porção dos

mesmos, ou sequência derivada de CD3 zeta.

[00697] Em algumas concretizações, o CAR inclui uma região de sinalização e/ou porção de transmembrana de um receptor coestimulador, como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. Em alguns aspectos, o mesmo CAR inclui igualmente a região de sinalização e os componentes coestimuladores.

[00698] Em algumas concretizações, a região de sinalização está incluída em um CAR, enquanto o componente coestimulador é fornecido por outro CAR que reconhece outro antígeno. Em algumas concretizações, os CARs incluem CARs ativadores ou estimuladores e CARs coestimuladores, ambos expressos na mesma célula (*veja*, WO2014/055668).

[00699] Em certas concretizações, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização e de transmembrana de CD28 ligado a um domínio intracelular CD3 (por exemplo, CD3-zeta). Em algumas concretizações, a região de sinalização intracelular compreende os domínios coestimuladores quiméricos CD28 e CD137 (4-1BB, TNFRSF9), ligados a um domínio intracelular CD3 zeta.

[00700] Em algumas concretizações, o CAR abrange um ou mais, por exemplo, dois ou mais domínios coestimuladores e um domínio de ativação, por exemplo, domínio de ativação primário, na porção citoplasmática. CARs exemplares incluem componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 e 4-1BB.

[00701] Em alguns casos, os CARs são referidos como CARs de primeira, segunda e/ou terceira geração. Em alguns aspectos, um CAR de primeira geração é aquele que apenas fornece um sinal induzido pela cadeia CD3 na ligação ao antígeno; em alguns aspectos, um CAR de segunda geração é aquele que fornece esse sinal e sinal coestimulador, como aquele incluindo um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulador tal como CD28 ou CD137; Em al-

guns aspectos, um CAR de terceira geração em alguns aspectos é aquele que inclui múltiplos domínios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.

[00702] Em algumas concretizações, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo o anticorpo ou fragmento aqui descrito. Em alguns aspectos, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo o anticorpo ou fragmento aqui descrito e um domínio de sinalização intracelular. Em algumas concretizações, o anticorpo ou fragmento inclui um scFv ou um anticorpo V_H de domínio único e o domínio intracelular contém um ITAM. Em alguns aspectos, o domínio de sinalização intracelular inclui um domínio de sinalização de uma cadeia zeta de uma cadeia CD3-zeta (CD3ζ). Em algumas concretizações, o receptor de antígeno quimérico inclui um domínio de transmembrana disposto entre o domínio extracelular e uma região de sinalização intracelular.

[00703] Em alguns aspectos, o domínio de transmembrana contém uma porção de transmembrana de CD28. O domínio extracelular e a transmembrana podem ser ligados direta ou indiretamente. Em algumas concretizações, o domínio extracelular e a transmembrana estão ligados por um espaçador, como qualquer outro descrito aqui. Em algumas concretizações, o receptor de antígeno quimérico contém um domínio intracelular de uma molécula coestimuladora de células T, tal como entre o domínio de transmembrana e o domínio de sinalização intracelular. Em alguns aspectos, a molécula coestimuladora de células T é CD28 ou 4-1BB.

[00704] Em algumas concretizações, o CAR contém um anticorpo, por exemplo, um fragmento de anticorpo, um domínio de transmembrana que é ou contém uma porção de transmembrana de CD28 ou uma variante funcional da mesma e um domínio de sinalização intracelular contendo uma porção de sinalização de CD28 ou variante funcio-

nal da mesma e uma porção de sinalização de CD3 zeta ou variante funcional do mesmo. Em algumas concretizações, o CAR contém um anticorpo, por exemplo, fragmento de anticorpo, um domínio de transmembrana que é ou contém uma porção de transmembrana de CD28 ou uma variante funcional da mesma e um domínio de sinalização intracelular contendo uma porção de sinalização de um 4-1BB ou variante funcional do mesmo e uma porção de sinalização de CD3 zeta ou variante funcional da mesma. Em algumas dessas concretizações, o receptor inclui ainda um espaçador contendo uma porção de uma molécula de Ig, tal como uma molécula de Ig humana, tal como uma articulação de Ig, por exemplo, uma articulação de IgG4, tal como um espaçador apenas de articulação.

[00705] Em algumas concretizações, o domínio de transmembrana do receptor, por exemplo, o CAR é um domínio de transmembrana de CD28 humano ou uma variante do mesmo, por exemplo, um domínio de transmembrana de 27 aminoácidos de um CD28 humano (Acesso No.: P10747.1), ou é um domínio de transmembrana que compreende a sequência de aminoácidos mencionada em SEQ ID NO: 8 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais da identidade de sequência de SEQ ID NO: 8; em algumas concretizações, a porção contendo o domínio de transmembrana do receptor recombinante compreende a sequência de aminoácidos mencionada em SEQ ID NO: 9 ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência.

[00706] Em algumas concretizações, o receptor de antígeno quimérico contém um domínio intracelular de uma molécula coestimuladora de células T. Em alguns aspectos, a molécula coestimuladora de célu-

las T é CD28 ou 4-1BB.

[00707] Em algumas concretizações, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulador intracelular de CD28 humano ou uma variante funcional ou porção do mesmo, como um domínio de 41 aminoácidos do mesmo e/ou um domínio com uma substituição de LL para GG nas posições 186-187 de uma proteína CD28 nativa. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização intracelular pode compreender a sequência de aminoácidos mencionada em SEQ ID NO: 10 ou 11 ou uma sequência de aminoácidos que exhibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87 %, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 10 ou 11. Em algumas concretizações, a região intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulador intracelular de 4-1BB ou variante funcional ou porção do mesmo, tal como um domínio citoplasmático de 42 aminoácidos de um 4-1BB humano (Acesso No. Q07011.1) ou variante funcional ou porção do mesmo, tal como a sequência de aminoácidos mencionada em SEQ ID NO: 12 ou uma sequência de aminoácidos que exhibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 12.

[00708] Em algumas concretizações, a região de sinalização intracelular inclui uma cadeia CD3 humana, opcionalmente um domínio de sinalização estimulador CD3 zeta ou variante funcional do mesmo, como um domínio citoplasmático 112 AA da isoforma 3 da CD3 ζ humana (Acesso No.: P20963.2) ou um domínio de sinalização CD3 zeta, conforme descrito na Patente Norte-americana No. 7.446.190 ou Patente Norte-americana No. 8.911.993. Em algumas concretizações, a região de sinalização intracelular compreende a sequência de aminoácidos mencionada em SEQ ID NO: 13, 14 ou 15 ou uma sequência

de aminoácidos que exibe pelo menos ou pelo menos cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 13, 14 ou 15.

[00709] Em alguns aspectos, o espaçador contém apenas uma região de articulação de uma IgG, como apenas uma articulação de IgG4 ou IgG1, como o espaçador de articulação único mencionado em SEQ ID NO: 1. Em outras concretizações, o espaçador é uma articulação de Ig, por exemplo, e articulação de IgG4, ligada a um domínio C_{H2} e/ou C_{H3}. Em algumas concretizações, o espaçador é uma articulação de Ig, por exemplo, uma articulação de IgG4, ligada aos domínios C_{H2} e C_{H3}, tal como mencionados em SEQ ID NO: 3. Em algumas concretizações, o espaçador é uma articulação de Ig, por exemplo, uma articulação de IgG4, ligada apenas a um domínio C_{H3}, tal como mencionada em SEQ ID NO: 4. Em algumas concretizações, o espaçador é ou compreende uma sequência rica em glicina-serina ou outro ligante flexível tal como ligantes flexíveis conhecidos.

2. Receptores de Célula T (TCRs)

[00710] Em algumas concretizações, as células modificadas, como células T, são fornecidas as quais expressam um receptor de células T (TCR) ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que reconhece um epítipo peptídico ou epítipo de células T de um polipeptídeo alvo, tal como um antígeno de um tumor, proteína viral ou autoimune.

[00711] Em algumas concretizações, um "receptor de células T" ou "TCR" é uma molécula que contém uma cadeia α e β variável (também conhecida como TCR α e TCR β , respectivamente) ou uma cadeia γ e δ variável (também conhecida como TCR α e TCR β , respectivamente), ou porções de ligação a antígenos da mesma, e que é capaz de se ligar especificamente a um peptídeo ligado a uma molécula de MHC. Em algumas concretizações, o TCR está na forma $\alpha\beta$. Tipicamente, os

TCRs que existem nas formas $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ são geralmente estruturalmente semelhantes, porém, as células T que as expressam podem ter locais ou funções anatômicas distintas. Um TCR pode ser encontrado na superfície de uma célula ou na forma solúvel. Geralmente, um TCR é encontrado na superfície das células T (ou linfócitos T), onde geralmente é responsável pelo reconhecimento de antígenos ligados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC).

[00712] A menos que de outra maneira declarado, o termo "TCR" deve ser entendido como abrangendo TCRs completos, bem como porções de ligação ao antígeno ou fragmentos de ligação ao antígeno das mesmas. Em algumas concretizações, o TCR é um TCR intacto ou de tamanho natural, incluindo TCRs na forma $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Em algumas concretizações, o TCR é uma porção de ligação ao antígeno que é menor que um TCR de tamanho natural, porém, que se liga a um peptídeo específico ligado a uma molécula de MHC, tal como se liga a um complexo MHC-peptídeo. Em alguns casos, uma porção de ligação ao antígeno ou fragmento de um TCR pode conter apenas uma porção dos domínios estruturais de um TCR de tamanho natural ou intacto, porém, ainda é capaz de ligar o epítipo peptídico, tal como o complexo MHC-peptídeo, ao qual o TCR completo se liga. Em alguns casos, uma porção de ligação ao antígeno contém os domínios variáveis de um TCR, como cadeia α variável e cadeia β variável de um TCR, suficientes para formar um sítio de ligação para a ligação a um complexo MHC-peptídeo específico. Geralmente, as cadeias variáveis de um TCR contêm regiões de determinantes da complementaridade envolvidas no reconhecimento do complexo de peptídeo, MHC e/ou MHC-peptídeo.

[00713] Em algumas concretizações, os domínios variáveis do TCR contêm alças hipervariáveis ou regiões de determinação da complementaridade (CDRs), que geralmente são os principais contribuintes

para o reconhecimento de antígenos e capacidades e especificidade de ligação. Em algumas concretizações, uma CDR de um TCR ou combinação do mesmo forma todo ou substancialmente todo o sítio de ligação ao antígeno de uma dada molécula de TCR. As várias CDRs dentro de uma região variável de uma cadeia de TCR geralmente são separadas por regiões de estrutura (FRs), que geralmente exibem menos variabilidade entre as moléculas de TCR em comparação com as CDRs (veja, por exemplo, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7: 3745, 1988; veja, também Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). Em algumas concretizações, a CDR3 é a CDR principal responsável pela ligação ou especificidade do antígeno, ou é a mais importante entre as três CDRs em uma determinada região variável do TCR para reconhecimento do antígeno, e/ou para a interação com a porção peptídica processada do complexo peptídeo-MHC. Em alguns contextos, a CDR1 da cadeia alfa pode interagir com a parte N-terminal de certos peptídeos antigênicos. Em alguns contextos, a CDR1 da cadeia beta pode interagir com a parte C-terminal do peptídeo. Em alguns contextos, a CDR2 contribui mais fortemente para ou é a principal CDR responsável pela interação com ou reconhecimento da porção de MHC do complexo MHC-peptídeo. Em algumas concretizações, a região variável da cadeia β pode conter uma outra região hipervariável (CDR4 ou HVR4), que geralmente está envolvida na ligação a superantígenos e não no reconhecimento de antígenos (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[00714] Em algumas concretizações, um TCR também pode conter um domínio constante, um domínio de transmembrana e/ou uma cauda citoplasmática curta (veja, por exemplo, Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). Em alguns aspectos, cada cadeia do

TCR pode possuir um domínio variável da imunoglobulina N-terminal, um domínio constante da imunoglobulina, uma região de transmembrana e uma cauda citoplasmática curta na extremidade C-terminal. Em algumas concretizações, um TCR está associado a proteínas invariáveis do complexo CD3 envolvidas na mediação da transdução de sinal.

[00715] Em algumas concretizações, uma cadeia de TCR contém um ou mais domínios constantes. Por exemplo, a porção extracelular de uma determinada cadeia de TCR (por exemplo, cadeia α ou cadeia β) pode conter dois domínios do tipo imunoglobulina, como um domínio variável (por exemplo, $V\alpha$ ou $V\beta$; tipicamente os aminoácidos 1 a 116 com base na numeração Kabat, Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) e um domínio constante (por exemplo, domínio constante da cadeia α ou $C\alpha$, tipicamente posições 117 a 259 da cadeia com base na numeração Kabat ou domínio constante de cadeia β ou $C\beta$, tipicamente posições 117 a 295 da cadeia com base em Kabat) adjacente à membrana celular. Por exemplo, em alguns casos, a porção extracelular do TCR formada pelas duas cadeias contém dois domínios constantes proximais à membrana e dois domínios variáveis distais à membrana, cujos domínios variáveis contêm cada qual CDRs. O domínio constante do TCR pode conter sequências de conexão curtas nas quais um resíduo de cisteína forma uma ligação dissulfeto, ligando assim as duas cadeias do TCR. Em algumas concretizações, um TCR pode ter um resíduo de cisteína adicional em cada uma das cadeias α e β , de modo que o TCR contenha duas ligações de dissulfeto nos domínios constantes.

[00716] Em algumas concretizações, as cadeias de TCR contêm um domínio de transmembrana. Em algumas concretizações, o domínio de transmembrana é carregado positivamente. Em alguns casos, a

cadeia TCR contém uma cauda citoplasmática. Em alguns casos, a estrutura permite que o TCR se associe a outras moléculas tipo CD3 e subunidades das mesmas. Por exemplo, um TCR contendo domínios constantes com uma região de transmembrana pode ancorar a proteína na membrana celular e associar-se a subunidades invariantes do aparelho ou complexo de sinalização de CD3. As caudas intracelulares das subunidades de sinalização de CD3 (por exemplo, cadeias CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ e CD3 ζ) contêm um ou mais motivos de ativação com base em tirosina imunorreceptora ou ITAM que estão envolvidos na capacidade de sinalização do complexo de TCR.

[00717] Em algumas concretizações, o TCR pode ser um heterodímero de duas cadeias α e β (ou opcionalmente γ e δ) ou pode ser uma construção de TCR de cadeia única. Em algumas concretizações, o TCR é um heterodímero contendo duas cadeias separadas (cadeias α e β ou cadeias γ e δ) que estão ligadas, tal como por uma ligação dissulfeto ou ligações de dissulfeto.

[00718] Em algumas concretizações, o TCR pode ser gerado a partir de uma(s) sequência(s) de TCR conhecida(s), como sequências de cadeias V α , β , para as quais uma sequência de codificação substancialmente de tamanho natural está facilmente disponível. Os métodos para obter sequências de TCR de tamanho natural, incluindo sequências da cadeia V, de fontes celulares são bem conhecidos. Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos que codificam o TCR podem ser obtidos a partir de uma variedade de fontes, como por amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos ácidos nucleicos de codificação de TCR dentro ou isolados de uma determinada célula ou células, ou síntese de sequências de DNA do TCR publicamente disponíveis.

[00719] Em algumas concretizações, o TCR é obtido a partir de uma fonte biológica, como das células a partir de uma célula T (por

exemplo, célula T citotóxica), hibridomas de células T ou outra fonte publicamente disponível. Em algumas concretizações, as células T podem ser obtidas a partir de células isoladas *in vivo*. Em algumas concretizações, o TCR é um TCR timicamente selecionado. Em algumas concretizações, o TCR é um TCR restrito a neoepítipo. Em algumas concretizações, as células T podem ser um hibridoma ou clone de células T cultivadas. Em algumas concretizações, o TCR ou a porção de ligação ao antígeno do mesmo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser gerado sinteticamente a partir do conhecimento da sequência do TCR.

[00720] Em algumas concretizações, o TCR é gerado a partir de um TCR identificado ou selecionado a partir do rastreamento de uma biblioteca de TCRs candidatos contra um antígeno polipeptídico alvo, ou o epítipo da célula T alvo do mesmo. As bibliotecas de TCR podem ser geradas pela amplificação do repertório de V α e V β a partir de células T isoladas de um indivíduo, incluindo células presentes em PBMCs, baço ou outro órgão linfoide. Em alguns casos, as células T podem ser amplificadas a partir de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs). Em algumas concretizações, as bibliotecas de TCR podem ser geradas a partir de células CD4+ ou CD8+. Em algumas concretizações, os TCRs podem ser amplificados a partir de uma fonte de células T de uma biblioteca normal de indivíduo saudável, isto é, bibliotecas de TCR normais. Em algumas concretizações, os TCRs podem ser amplificados a partir de uma fonte de células T de um indivíduo doente, isto é, bibliotecas de TCR doentes. Em algumas concretizações, iniciadores degenerados são utilizados para amplificar o repertório gênico de V α e V β , tal como por RT-PCR em amostras, tais como células T, obtidas de seres humanos. Em algumas concretizações, as bibliotecas scTv podem ser montadas a partir de bibliotecas V α e V β naïve, nas quais os produtos amplificados são clonados ou montados para serem

separados por um ligante. Dependendo da fonte do indivíduo e das células, as bibliotecas podem ser específicas do alelo HLA. Alternativamente, em algumas concretizações, as bibliotecas de TCR podem ser geradas por mutagênese ou diversificação de uma molécula de TCR origem ou de andaime. Em alguns aspectos, os TCRs são submetidos à evolução direcionada, tal como por mutagênese, por exemplo, da cadeia α ou β . Em alguns aspectos, resíduos particulares dentro das CDRs do TCR são alterados. Em algumas concretizações, os TCRs selecionados podem ser modificados por maturação por afinidade. Em algumas concretizações, as células T específicas do antígeno podem ser selecionadas, como por rastreamento para avaliar a atividade de CTL contra o peptídeo. Em alguns aspectos, os TCRs, por exemplo, presentes nas células T específicas do antígeno, podem ser selecionados por atividade de ligação, por exemplo, afinidade ou avidéz particular para o antígeno.

[00721] Em algumas concretizações, os receptores de antígeno geneticamente modificados incluem receptores de células T recombinantes (TCRs) e/ou TCRs clonados a partir de células T de ocorrência natural. Em algumas concretizações, um clone de células T de alta afinidade para um antígeno alvo (por exemplo, um antígeno do câncer) é identificado, isolado de um paciente e introduzido nas células. Em algumas concretizações, o clone de TCR para um antígeno alvo foi gerado em camundongos transgênicos modificados com genes do sistema imunológico humano (por exemplo, o sistema de antígeno leucocitário humano, ou HLA). Veja, por exemplo, antígenos tumorais (veja, por exemplo, Parkhurst *et al.* (2009) *Clin Cancer Res.* 15: 169–180 e Cohen *et al.* (2005) *J Immunol.* 175: 5799–5808. Em algumas concretizações, a exibição de fagos é usada para isolar TCRs contra um antígeno alvo (veja, por exemplo, Varela-Rohena *et al.* (2008) *Nat Med.* 14:1390–1395 e Li (2005) *Nat Biotechnol.* 23:349–354.

[00722] Em algumas concretizações, o TCR ou a porção de ligação ao antígeno do mesmo é aquela que foi modificada ou construído. Em algumas concretizações, os métodos de evolução direcionada são usados para gerar TCRs com propriedades alteradas, com maior afinidade por um complexo MHC-peptídeo específico. Em algumas concretizações, a evolução direcionada é alcançada por métodos de exibição, incluindo, porém, não limitados a, exibição de leveduras (Holler *et al.* (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler *et al.* (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92), exibição de fagos (Li *et al.* (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54), ou exibição de células T (Chervin *et al.* (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84) Em algumas concretizações, os métodos de exibição envolvem engenharia, ou modificação, um TCR conhecido, origem ou de referência. Por exemplo, em alguns casos, um TCR do tipo selvagem pode ser usado como um padrão para produzir TCRs mutagenizados nos quais um ou mais resíduos das CDRs são mutados e mutantes com uma propriedade alterada desejada, como maior afinidade por um antígeno alvo desejado, são selecionados.

[00723] Em algumas concretizações, os peptídeos de um polipeptídeo alvo para uso na produção ou geração de um TCR de interesse são conhecidos ou podem ser facilmente identificados por uma pessoa versada. Em algumas concretizações, os peptídeos adequados para uso na geração de TCRs ou porções de ligação ao antígeno podem ser determinados com base na presença de um motivo restrito a HLA em um polipeptídeo alvo de interesse, tal como um polipeptídeo alvo descrito abaixo. Em algumas concretizações, os peptídeos são identificados usando os modelos de previsão de computador disponíveis. Em algumas concretizações, para prever os sítios de ligação classe I de MHC, esses modelos incluem, porém, não estão limitados a, ProPred1 (Singh e Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237, e SYFPEITHI (veja, Schuler *et al.* (2007) *Immunoinformatics Methods in*

Molecular Biology, 409(1):75-93, 2007. Em algumas concretizações, o epítipo restrito ao MHC é o HLA-A0201, que é expresso em aproximadamente 39-46% de todos os Caucasianos e, portanto, representa uma escolha adequada de antígeno de MHC para uso na preparação de um TCR ou outra molécula de ligação ao MHC-peptídeo.

[00724] Motivos de ligação ao HLA-A0201 e os sítios de clivagem para proteassomas e imunoproteassomas usando modelos de previsão de computador são conhecidos. Para prever os sítios de ligação classe I de MHC, esses modelos incluem, porém, não são limitados a ProPred1 (descrito em mais detalhes em Singh and Raghava, ProPred: previsão de sítios de ligação a HLA-DR. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001) e SYFPEITHI (veja, Schuler *et al.* SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409 (1): 75-93 2007).

[00725] Em algumas concretizações, a porção de ligação do TCR ou do antígeno pode ser uma proteína natural produzida de forma recombinante ou uma forma mutada da mesma na qual uma ou mais propriedades, característica de ligação tal como, foram alteradas. Em algumas concretizações, um TCR pode ser derivado de uma de várias espécies animais, como humanos, camundongos, ratos ou outros mamíferos. Um TCR pode estar ligado à célula ou na forma solúvel. Em algumas concretizações, para fins dos métodos definidos, o TCR está na forma ligada à célula, expressa na superfície de uma célula.

[00726] Em algumas concretizações, o TCR é um TCR de tamanho natural. Em algumas concretizações, o TCR é uma porção de ligação ao antígeno. Em algumas concretizações, o TCR é um TCR dimérico (dTCR). Em algumas concretizações, o TCR é um TCR de cadeia única (sc-TCR). Em algumas concretizações, um dTCR ou scTCR possui as estruturas descritas nos documentos WO 03/020763, WO

04/033685, WO2011/044186.

[00727] Em algumas concretizações, o TCR contém uma sequência correspondente à sequência transmembranar. Em algumas concretizações, o TCR contém uma sequência correspondente às sequências citoplasmáticas. Em algumas concretizações, o TCR é capaz de formar um complexo de TCR com CD3. Em algumas concretizações, qualquer um dos TCRs, incluindo um dTCR ou scTCR, pode ser ligado a domínios de sinalização que produzem um TCR ativo na superfície de uma célula T. Em algumas concretizações, o TCR é expresso na superfície das células.

[00728] Em algumas concretizações, o dTCR contém um primeiro polipeptídeo em que uma sequência correspondente a uma sequência da região variável da cadeia α do TCR é fundida ao terminal N de uma sequência correspondente a uma sequência extracelular da região constante da cadeia α do TCR e um segundo polipeptídeo, em que uma sequência correspondente a uma sequência da região variável da cadeia β do TCR é fundida ao terminal N uma sequência correspondente a uma sequência extracelular da região constante da cadeia β do TCR, sendo o primeiro e o segundo polipeptídeos ligados por uma ligação dissulfeto. Em algumas concretizações, a ligação pode corresponder à ligação dissulfeto intercadeia nativa presente nos TCRs $\alpha\beta$ diméricos nativos. Em algumas concretizações, as ligações dissulfeto intercadeia não estão presentes em um TCR nativo. Por exemplo, em algumas concretizações, uma ou mais cisteínas podem ser incorporadas nas sequências extracelulares da região constante do par de polipeptídeos de dTCR. Em alguns casos, uma ligação dissulfeto nativa e uma não nativa pode ser desejável. Em algumas concretizações, o TCR contém uma sequência transmembranar para ancorar na membrana.

[00729] Em algumas concretizações, um dTCR contém uma cadeia

α de TCR contendo um domínio α variável, um domínio α constante e um primeiro motivo de dimerização anexado ao terminal C do domínio α constante, e uma cadeia β de TCR compreendendo um domínio β variável, um domínio β constante e um primeiro motivo de dimerização anexado ao terminal C do domínio β constante, em que o primeiro e o segundo motivos de dimerização interagem facilmente para formar uma ligação covalente entre um aminoácido no primeiro motivo de dimerização e um aminoácido no segundo motivo de dimerização que liga a cadeia α do TCR e a cadeia β do TCR juntas.

[00730] Em algumas concretizações, o TCR é um scTCR. Tipicamente, um scTCR pode ser gerado usando métodos conhecidos, Veja por exemplo, Soo Hoo, W. F. *et al.* PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wulfig, C. e Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. *et al.* PNAS (EUA) 90 3830 (1993); PCT internacional publicado Nos. WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; e Schlueter, C.J. *et al.* J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). Em algumas concretizações, um scTCR contém uma ligação intercadeia dissulfeto não nativa introduzida para facilitar a associação das cadeias de TCR (veja por exemplo, o PCT Publicado Internacional No. WO 03/020763). Em algumas concretizações, um scTCR é um TCR truncado não ligado a dissulfeto, no qual zíperes de leucina heterólogos fundidos com os terminais C facilitam a associação de cadeias (veja por exemplo, o PCT Publicado Internacional No. WO99/60120). Em algumas concretizações, um scTCR contém um domínio variável de TCR α covalentemente ligado a um domínio variável de TCR β por meio de um ligante peptídico (veja por exemplo, o PCT Publicado Internacional No. WO99/18129).

[00731] Em algumas concretizações, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de aminoácidos correspondente a uma região variável da cadeia α do TCR, um segundo

segmento constituído por uma sequência de aminoácidos correspondente a uma sequência da região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N de uma sequência de aminoácidos correspondente a uma sequência extracelular de domínio constante da cadeia β do TCR e uma sequência ligante que liga o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento.

[00732] Em algumas concretizações, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de região variável da cadeia α fundida ao terminal N de uma sequência de domínio constante extracelular da cadeia α e um segundo segmento constituído por uma sequência de região variável da cadeia β fundida ao terminal N de uma constante extracelular da cadeia β da sequência e sequência transmembranar e, opcionalmente, uma sequência ligante que liga o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento.

[00733] Em algumas concretizações, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de região variável da cadeia β do TCR fundida ao terminal N de uma sequência de domínio constante extracelular da cadeia β e um segundo segmento constituído por uma sequência da região variável da cadeia α fundido ao terminal N de uma sequência constante extracelular da cadeia α e sequência transmembranar e, opcionalmente, uma sequência ligante que liga o terminal C do primeiro segmento ao terminal N do segundo segmento.

[00734] Em algumas concretizações, o ligante de um scTCRs que liga o primeiro e o segundo segmentos de TCR pode ser qualquer ligante capaz de formar uma única fita polipeptídica, mantendo a especificidade de ligação ao TCR. Em algumas concretizações, a sequência ligante pode, por exemplo, ter a fórmula -P-AA-P-, em que P é prolina e AA representa uma sequência de aminoácidos em que os aminoácidos são glicina e serina. Em algumas concretizações, o primeiro

e o segundo segmentos são emparelhados para que as sequências de regiões variáveis sejam orientadas para essa ligação. Portanto, em alguns casos, o ligante tem um comprimento suficiente para abranger a distância entre o terminal C do primeiro segmento e o terminal N do segundo segmento, ou vice-versa, mas não é muito longo para bloquear ou reduzir a ligação do scTCR para o ligante alvo. Em algumas concretizações, o ligante pode conter entre 10 e 45 aminoácidos, entre 10 e 30 aminoácidos ou 26 a 41 resíduos de aminoácidos, por exemplo, 29, 30, 31 ou 32 aminoácidos. Em algumas concretizações, o ligante tem a fórmula -PGGG-(SGGGG)₅-P-, em que P é prolina, G é glicina e S é serina (SEQ ID NO: 22). Em algumas concretizações, o ligante tem a sequência GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 23)

[00735] Em algumas concretizações, o scTCR contém uma ligação dissulfeto covalente que liga um resíduo da região de imunoglobulina do domínio constante da cadeia α a um resíduo da região de imunoglobulina do domínio constante da cadeia β . Em algumas concretizações, a ligação dissulfeto intercadeia em um TCR nativo não está presente. Por exemplo, em algumas concretizações, uma ou mais cisteínas podem ser incorporadas nas sequências extracelulares da região constante do primeiro e do segundo segmentos do polipeptídeo de scTCR. Em alguns casos, uma ligação dissulfeto nativa e uma não nativa pode ser desejável.

[00736] Em algumas concretizações de um dTCR ou scTCR, que introduziu ligações dissulfeto intercadeia, as ligações dissulfeto nativas não estão presentes. Em algumas concretizações, uma ou mais das cisteínas nativas que formam uma ligação dissulfeto intercadeia nativa são substituídas por outro resíduo, como uma serina ou alanina. Em algumas concretizações, uma ligação dissulfeto introduzida pode ser formada pela mutação de resíduos não cisteína no primeiro e no segundo segmentos em cisteína. Exemplos de ligações dissulfeto não

nativas de um TCR são descritas no PCT International No. WO2006/000830 publicado.

[00737] Em algumas concretizações, o TCR ou fragmento de ligação ao antígeno exibe uma afinidade com uma constante de ligação de equilíbrio para um antígeno alvo entre ou entre cerca de 10^{-5} e 10^{-12} M e todos os valores e faixas individuais aqui. Em algumas concretizações, o antígeno alvo é um complexo MHC-peptídeo ou ligante.

[00738] Em algumas concretizações, o ácido nucleico ou os ácidos nucleicos que codificam um TCR, tais como cadeias α e β , podem ser amplificados por PCR, clonagem ou outros meios adequados e clonados em um vetor ou vetores de expressão adequados. O vetor de expressão pode ser qualquer vetor de expressão recombinante adequado e pode ser usado para transformar ou transfectar qualquer hospedeiro adequado. Vetores adequados incluem aqueles concebidos para propagação e expansão ou para expressão ou ambos, plasmídeos e vírus tal como.

[00739] Em algumas concretizações, o vetor pode ser um vetor da série pUC (Fermentas Life Sciences), da série pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), da série pET (Novagen, Madison, Wis.), da série pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) ou da série pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). Em alguns casos, vetores de bacteriófagos, como λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 e λ NM1149, também podem ser utilizados. Em algumas concretizações, os vetores de expressão de plantas podem ser usados e incluem pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 e pBIN19 (Clontech). Em algumas concretizações, os vetores de expressão animal incluem pEUK-CI, pMAM e pMAMneo (Clontech). Em algumas concretizações, um vetor viral é usado, como um vetor retroviral.

[00740] Em algumas concretizações, os vetores de expressão recombinantes podem ser preparados usando técnicas padrão de DNA

recombinante. Em algumas concretizações, os vetores podem conter sequências reguladoras, como códons de iniciação e terminação da transcrição e tradução, específicos para o tipo de hospedeiro (por exemplo, bactéria, fungo, planta ou animal) no qual o vetor deve ser introduzido, conforme apropriado, e levando em consideração se o vetor é baseado em DNA ou RNA. Em algumas concretizações, o vetor pode conter um promotor não nativo operacionalmente ligado à sequência de nucleotídeos que codifica o TCR ou a porção de ligação ao antígeno (ou outra molécula de ligação ao peptídeo de MHC). Em algumas concretizações, o promotor pode ser um promotor não viral ou viral, como um promotor de citomegalovírus (CMV), um promotor de SV40, um promotor de RSV e um promotor encontrado na repetição terminal longa do vírus de células-tronco de murino. Outros promotores conhecidos também são considerados.

[00741] Em algumas concretizações, após a obtenção do clone de células T, as cadeias alfa e beta do TCR são isoladas e clonadas em um vetor de expressão gênica. Em algumas concretizações, os genes alfa e beta do TCR são ligados por meio de um peptídeo salto ribossômico de picornavírus 2A, de modo que ambas as cadeias sejam co-expressão. Em algumas concretizações, a transferência genética do TCR é realizada por vetores retrovirais ou lentivirais ou por transposons (veja, por exemplo, Baum *et al.* (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 13:1050-1063; Frecha *et al.* (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 18: 1748-1757; e Hackett *et al.* (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18: 674-683.

[00742] Em algumas concretizações, para gerar um vetor que codifica um TCR, as cadeias α e β são amplificadas por PCR a partir de cDNA total isolado de um clone de células T que expressa o TCR de

interesse e clonadas em um vetor de expressão. Em algumas concretizações, as cadeias α e β são clonadas no mesmo vetor. Em algumas concretizações, as cadeias α e β são clonadas em diferentes vetores. Em algumas concretizações, as cadeias α e β geradas são incorporadas a um vetor retroviral, por exemplo, lentiviral.

3. Receptor de Autoanticorpo Quimérico (CAAR)

[00743] Em algumas concretizações, o receptor recombinante é um receptor de autoanticorpo quimérico (CAAR). Em algumas concretizações, o CAAR é específico para um autoanticorpo. Em algumas concretizações, uma célula que expressa o CAAR, tal como uma célula T modificada para expressar um CAAR, pode ser usada para se ligar especificamente e exterminar células de expressão de autoanticorpos, mas não para células de expressão de anticorpos normais. Em algumas concretizações, as células de expressão de CAAR podem ser usadas para tratar uma doença autoimune associada à expressão de autoantígenos, como doenças autoimunes. Em algumas concretizações, as células de expressão de CAAR podem direcionar-se para células B que finalmente produzem os autoanticorpos, exibem os autoanticorpos em suas superfícies celulares e marcam essas células B como alvos específicos da doença para intervenção terapêutica. Em algumas concretizações, as células de expressão de CAAR podem ser usadas para direcionar e exterminar com eficiência as células B patogênicas em doenças autoimunes, direcionando células B causadoras de doenças usando um receptor de autoanticorpo quimérico específico de antígeno. Em algumas concretizações, o receptor recombinante é um CAAR, como qualquer outro descrito no Pedido de Patente Norte-americana Pub. No. US 2017/0051035.

[00744] Em algumas concretizações, o CAAR compreende um domínio de ligação de autoanticorpo, um domínio transmembranar e uma região de sinalização intracelular. Em algumas concretizações, uma

região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização intracelular ou o domínio de sinalização primária, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de aprendizagem primária em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente de receptor de célula T (TCR), e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motivo de ativação com base na tirosina imunorreceptora (ITAM). Em algumas concretizações, uma região de sinalização intracelular compreende uma região de sinalização secundária ou coestimuladora (regiões de sinalização intracelular secundárias).

[00745] Em algumas concretizações, o domínio de ligação de autoanticorpo compreende um autoantígeno ou um fragmento do mesmo. A escolha do autoantígeno pode depender do tipo de autoanticorpo sendo direcionado. Por exemplo, o autoantígeno pode ser escolhido porque reconhece um autoanticorpo em uma célula alvo, tal como uma célula B, associada a um estado de doença específico, por exemplo, uma doença autoimune, tal como uma doença autoimune mediada por autoanticorpos. Em algumas concretizações, a doença autoimune inclui o pênfigo vulgar (PV). Autoantígenos exemplares incluem desmogleína 1 (Dsg1) e Dsg3.

4. Múltiplos direcionamentos

[00746] Em algumas concretizações, as células e métodos incluem estratégias de múltiplos direcionamentos, como expressão de dois ou mais receptores geneticamente modificados na célula, cada um reconhecendo o mesmo de um antígeno diferente e tipicamente cada um incluindo um componente de sinalização intracelular diferente. Tais estratégias de múltiplos direcionamentos são descritas, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente Internacional: WO 2014055668 A1 (descrevendo combinações de CARs ativadores e coestimuladores, por exemplo, direcionando dois antígenos diferentes presentes indivi-

dualmente em células sem direcionamento, por exemplo, normais, mas presentes apenas nas células de uma doença ou condição a ser tratada) e Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5 (215) (dezembro de 2013) (descrevendo células de expressão de um CAR ativador e um inibidor, como aquelas nas quais o CAR ativador se liga a um antígeno expresso em células normais ou não doentes e células de uma doença ou condição a ser tratada, e o CAR inibidor se liga a outro antígeno expresso apenas nas células normais ou células que não se deseja tratar).

[00747] Por exemplo, em algumas concretizações, as células incluem um receptor que expressa um primeiro receptor de antígeno geneticamente modificado (por exemplo, CAR ou TCR) que é capaz de induzir um sinal de ativação ou estimulação para a célula, geralmente mediante ligação específica ao antígeno reconhecido pelo primeiro receptor, por exemplo, o primeiro antígeno. Em algumas concretizações, a célula inclui ainda um segundo receptor de antígeno geneticamente modificado (por exemplo, CAR ou TCR), por exemplo, um receptor coestimulador quimérico, capaz de induzir um sinal coestimulador para a célula imune, geralmente mediante ligação específica a um segundo antígeno reconhecido pelo segundo receptor. Em algumas concretizações, o primeiro antígeno e o segundo antígeno são os mesmos. Em algumas concretizações, o primeiro antígeno e o segundo antígeno são diferentes.

[00748] Em algumas concretizações, o primeiro e/ou segundo receptor de antígeno geneticamente modificado (por exemplo, CAR ou TCR) é capaz de induzir um sinal de ativação ou estimulação para a célula. Em algumas concretizações, o receptor inclui um componente de sinalização intracelular contendo ITAM ou motivos do tipo ITAM. Em algumas concretizações, a ativação induzida pelo primeiro receptor envolve uma transdução de sinal ou alteração na expressão de pro-

teínas na célula, resultando no início de uma resposta imune, como a fosforilação do ITAM e/ou o início da cascata de transdução de sinal mediada pelo ITAM, formação de uma sinapse imunológica e/ou agrupamento de moléculas perto do receptor ligado (por exemplo CD4 ou CD8, etc.), ativação de um ou mais fatores de transcrição, como NF- κ B e/ou AP-1, e/ou indução de expressão gênica de fatores como citocinas, proliferação e/ou sobrevivência.

[00749] Em algumas concretizações, o primeiro e/ou segundo receptor inclui domínios de sinalização intracelular de receptores coestimuladores, como CD28, CD137 (4-1BB), OX40 e/ou ICOS. Em algumas concretizações, o primeiro e o segundo receptor incluem um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulador que é diferente. Em uma concretização, o primeiro receptor contém uma região de sinalização coestimuladora de CD28 e o segundo receptor contém uma região de sinalização coestimuladora de 4-1BB ou vice-versa.

[00750] Em algumas concretizações, o primeiro e/ou segundo receptor inclui um domínio de sinalização intracelular incluindo ITAM ou motivos do tipo ITAM e um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulador.

[00751] [77] Em algumas concretizações, o primeiro receptor contém um domínio de sinalização intracelular contendo ITAM ou motivos do tipo ITAM, e o segundo receptor contém um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulador. O sinal coestimulador em combinação com o sinal de ativação ou estimulação induzido na mesma célula é aquele que resulta em uma resposta imune, tal como uma resposta imune robusta e prolongada, tal como aumento da expressão gênica, secreção de citocinas e outros fatores e células T funções efetoras mediadas como morte celular.

[00752] Em algumas concretizações, nem a ligação do primeiro re-

ceptor isoladamente nem a ligação do segundo receptor isoladamente induz uma resposta imune robusta. Em alguns aspectos, se apenas um receptor estiver ligado, a célula se torna tolerada ou não responde ao antígeno, inibida, e/ou não é induzida a proliferar ou secretar fatores ou desempenhar funções efetoras. Em algumas dessas concretizações, no entanto, quando a pluralidade de receptores é ligada, tal como no contador de uma célula que expressa o primeiro e o segundo antígenos, é alcançada uma resposta desejada, como ativação ou estimulação imunológica completa, por exemplo, conforme indicado pela secreção de uma ou mais citocinas, proliferação, persistência e/ou realização de um efector imunológico função tal como morte citotóxica de uma célula alvo.

[00753] Em algumas concretizações, os dois receptores induzem, respectivamente, um sinal ativador e inibidor à célula, de modo que a ligação de um receptor ao antígeno ativa a célula ou induz uma resposta, mas a ligação pelo segundo receptor inibidor de seu antígeno induz um sinal que suprime ou amortece essa resposta. Exemplos são combinações de CARs ativadores e CARs inibidores ou iCARs. Essa estratégia pode ser usada, por exemplo, na qual o CAR ativador se liga a um antígeno expresso em uma doença ou condição, mas que também é expresso em células normais, e o receptor inibidor se liga a um antígeno separado, que é expresso nas células normais, mas não células de uma doença ou condição.

[00754] Em algumas concretizações, como células de expressão de o receptor recombinante incluem ainda CARs inibidores (iCARs, veja, Fedorov *et al.*, Sci. Transl. Medicine, 5 (215) (2013), como um CAR reconhecendo um antígeno diferente daquele associado a e/ou específico para uma doença ou condição, pela qual um sinal de ativação liberado através de um CAR direcionado à doença é diminuído ou inibido pela ligação do CAR inibidor ao seu ligante, por exemplo, para reduzir

efeitos sem direcionamento.

[00755] Em algumas concretizações, os dois receptores induzem, respectivamente, um sinal ativador e inibidor à célula, de modo que a ligação de um receptor ao antígeno ativa a célula ou induz uma resposta, mas a ligação do segundo receptor inibidor de seu antígeno induz um sinal que suprime ou amortece essa resposta. Exemplos são combinações de CARs ativadores e CARs inibidores (iCARs). Essa estratégia pode ser usada, por exemplo, para reduzir a probabilidade de efeitos sem direcionamento no contexto em que o CAR ativador liga um antígeno expresso em uma doença ou condição, mas que também é expresso em células normais, e o receptor inibidor se liga a um antígeno separado que é expresso nas células normais, mas não nas células de uma doença ou condição.

[00756] Em alguns aspectos, o receptor quimérico é ou inclui um CAR inibidor (por exemplo iCAR) e inclui componentes intracelulares que amortecem ou suprimem uma resposta imune, como uma resposta promovida pelo ITAM e/ou coestimulador na célula. Exemplos de tais componentes de sinalização intracelular são os encontrados nas moléculas do ponto de verificação imune, incluindo PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, receptores PGE2, receptores de EP2/4 adenosina que incluem A2AR. Em alguns aspectos, a célula modificada inclui um CAR inibidor incluindo um domínio de sinalização de ou derivado de uma molécula inibidora, de modo que serve para amortecer a resposta da célula, por exemplo, aquela induzida por um CAR ativador e/ou coestimulador .

[00757] Em algumas concretizações, a estratégia de múltiplos direcionamentos é empregada no caso em que um antígeno associado a uma determinada doença ou condição é expresso em uma célula não doente e/ou é expresso na própria célula modificada, seja transitoriamente (por exemplo, mediante estímulo associado à engenharia gené-

tica) ou permanentemente. Nesses casos, ao exigir a ligação de dois receptores de antígeno separados e individualmente específicos, a especificidade, a seletividade e a eficácia podem ser melhoradas.

[00758] Em algumas concretizações, a pluralidade de antígenos, por exemplo, o primeiro e o segundo antígenos, são expressos na célula, tecido, doença ou condição alvo, tal como na célula cancerígena. Em alguns aspectos, a célula, tecido, doença ou condição é mieloma múltiplo ou uma célula de mieloma múltiplo. Em algumas concretizações, uma ou mais da pluralidade de antígenos geralmente também são expressas em uma célula que não se deseja atingir com a terapia celular, como uma célula ou tecido normal ou não doente, e/ou células modificadas. Em tais concretizações, ao exigir a ligação de múltiplos receptores para obter uma resposta da célula, é alcançada especificidade e/ou eficácia.

B. Ácidos Nucleicos, Vetores e Métodos para Engenharia Genética

[00759] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células T, são geneticamente modificadas para expressar um receptor recombinante. Em algumas concretizações, a modificação é realizada através da introdução de polinucleotídeos que codificam o receptor recombinante. Também são fornecidos polinucleotídeos que codificam um receptor recombinante e vetores ou construções contendo esses ácidos nucleicos e/ou polinucleotídeos.

[00760] Em alguns casos, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante contém uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal. Em alguns aspectos, a sequência de sinal pode codificar um peptídeo de sinal derivado de um polipeptídeo nativo. Em outros aspectos, a sequência de sinal pode codificar um peptídeo de sinal heterólogo ou não nativo, como o peptídeo de sinal exemplar da cadeia alfa GMCSFR apresentado na SEQ ID NO: 25 e

codificado pela sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 24. Em alguns casos, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante, por exemplo, receptor de antígeno quimérico (CAR) contém uma sequência de sinal que codifica um peptídeo de sinal. Exemplos exemplares não limitantes de peptídeos de sinal incluem, por exemplo, o peptídeo de sinal da cadeia alfa GMCSFR apresentado na SEQ ID NO: 25 e codificado pela sequência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 24, ou o peptídeo de sinal alfa CD8 apresentado na SEQ ID NO: 26.

[00761] Em algumas concretizações, o polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante contém pelo menos um promotor que está operacionalmente ligado ao controle da expressão do receptor recombinante. Em alguns exemplos, o polinucleotídeo contém dois, três ou mais promotores operacionalmente ligados para controlar a expressão do receptor recombinante.

[00762] Em certos casos em que as moléculas de ácido nucleico codificam duas ou mais cadeias polipeptídicas diferentes, por exemplo, um receptor recombinante e um marcador, cada uma das cadeias polipeptídicas pode ser codificada por uma molécula de ácido nucleico separada. Por exemplo, dois ácidos nucleicos separados são fornecidos e cada um pode ser transferido ou introduzido individualmente na célula para expressão na célula. Em algumas concretizações, o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante e o ácido nucleico que codifica o marcador estão operacionalmente ligados ao mesmo promotor e são opcionalmente separados por um sítio de entrada de ribossoma interno (IRES) ou um ácido nucleico que codifica um peptídeo de autoclivagem ou peptídeo que causa o salto do ribossoma, que opcionalmente é um T2A, um P2A, um E2A ou um F2A. Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos que codificam o marcador e o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante estão operacionalmente

ligados a dois promotores diferentes. Em algumas concretizações, o ácido nucleico que codifica o marcador e o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante estão presentes ou inseridos em diferentes locais no genoma da célula. Em algumas concretizações, o polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante é introduzido em uma composição contendo células cultivadas, tal como por transdução, transfecção ou transformação retroviral.

[00763] Em algumas concretizações, como aquelas em que o polinucleotídeo contém uma primeira e segunda sequência de ácido nucleico, as sequências de codificação que codificam cada uma das diferentes cadeias polipeptídicas podem ser operacionalmente ligadas a um promotor, que pode ser o mesmo ou diferente. Em algumas concretizações, a molécula de ácido nucleico pode conter um promotor que direciona a expressão de duas ou mais cadeias polipeptídicas diferentes. Em algumas concretizações, essas moléculas de ácido nucleico podem ser multicistrônicas (bicistrônicas ou tricistrônicas, veja, por exemplo, Patente Norte-americana 6.060.273). Em algumas concretizações, as unidades de transcrição podem ser modificadas como uma unidade bicistrônica contendo um IRES (sítio de entrada de ribossoma interno), que permite a coexpressão de produtos gênicos (por exemplo, codificando o marcador e o receptor recombinante) por uma mensagem de um único promotor. Alternativamente, em alguns casos, um único promotor pode direcionar a expressão de um RNA que contém, em uma única estrutura de leitura aberta (ORF), dois ou três genes (por exemplo, codificando o marcador e codificando o receptor recombinante) separados um do outro por sequências que codificam um peptídeo de autoclivagem (por exemplo, sequências 2A) ou um sítio de reconhecimento de protease (por exemplo, furina). Em alguns casos, o peptídeo, tal como um T2A, pode fazer com que o ribossoma salte (salto do ribossoma) a síntese de uma ligação peptídica no terminal C

de um elemento 2A, levando à separação entre a extremidade da sequência 2A e o próximo peptídeo a jusante (veja, por exemplo, de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) e de Felipe *et al.* *Traffic* 5: 616-626 (2004)). Vários elementos 2A são conhecidos. Exemplos de sequências 2A que podem ser usadas nos métodos e sistemas aqui descritos, sem limitação, sequências 2A do vírus da febre aftosa (F2A, por exemplo, SEQ ID NO: 21), vírus da rinite equina A (E2A, por exemplo, SEQ ID NO: 20), vírus *Thosea asigna* (T2A, por exemplo, SEQ ID NO: 6 ou 17) e teschovirus-1 porcino (P2A, por exemplo, SEQ ID NO: 18 ou 19), conforme descrito na Publicação de Patente Norteamericana No. 20070116690.

[00764] Qualquer um dos receptores recombinantes aqui descritos pode ser codificado por polinucleotídeos contendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos que codificam receptores recombinantes, em quaisquer combinações ou arranjos. Por exemplo, um, dois, três ou mais polinucleotídeos podem codificar um, dois, três ou mais polipeptídeos diferentes, por exemplo, receptores recombinantes. Em algumas concretizações, um vetor ou construção contém um marcador de codificação de sequência de ácido nucleico e um vetor ou construção separado contém uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor recombinante, por exemplo, CAR. Em algumas concretizações, o ácido nucleico que codifica o marcador e o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante estão operacionalmente ligados a dois promotores diferentes. Em algumas concretizações, o ácido nucleico que codifica o receptor recombinante está presente a jusante do ácido nucleico que codifica o marcador.

[00765] Em algumas concretizações, a cadeia principal do vetor contém uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais marcadores. Em algumas concretizações, um ou mais marcadores são marcadores de transdução, marcadores substitutos e/ou marcadores

de seleção.

[00766] Em algumas concretizações, o marcador é um marcador de transdução ou um marcador substituto. Um marcador de transdução ou um marcador substituto pode ser usado para detectar células que foram introduzidas com o polinucleotídeo, por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um receptor recombinante. Em algumas concretizações, o marcador de transdução pode indicar ou confirmar a modificação de uma célula. Em algumas concretizações, o marcador substituto é uma proteína que é feita para ser coexpressa na superfície celular com o receptor recombinante, por exemplo, CAR. Em concretizações particulares, esse marcador substituto é uma proteína de superfície que foi modificada para ter pouca ou nenhuma atividade. Em certas concretizações, o marcador substituto é codificado no mesmo polinucleotídeo que codifica o receptor recombinante. Em algumas concretizações, a sequência de ácido nucleico que codifica o receptor recombinante está operacionalmente ligada a uma sequência de ácido nucleico que codifica um marcador, separado opcionalmente por um sítio de entrada de ribossoma interno (IRES), ou um ácido nucleico que codifica um peptídeo de autoclivagem ou um peptídeo que causa o salto do ribossoma, como uma sequência 2A, como um T2A, um P2A, um E2A ou um F2A. Genes marcadores extrínsecos podem, em alguns casos, ser utilizados em conexão com células modificadas para permitir a detecção ou seleção de células e, em alguns casos, também para promover o suicídio celular.

[00767] Marcadores substitutos exemplares podem incluir formas truncadas de polipeptídeos da superfície celular, como formas truncadas que não são funcionais e que não são transduzidas ou não são capazes de transduzir um sinal ou um sinal normalmente transduzido pela forma de tamanho natural do polipeptídeo de superfície celular, não são capazes de internalizar. Exemplos de polipeptídeos truncados

da superfície celular, incluindo formas truncadas de fatores de crescimento ou outros receptores, como um receptor de fator de crescimento epidérmico humano truncado 2 (tHER2), um receptor de fator de crescimento epidérmico truncado (EGFRt, exemplo de sequência de EGFRt apresentada na SEQ ID NO: 7 ou 16) ou um antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) ou forma modificada do mesmo. O EGFRt pode conter um epítipo reconhecido pelo anticorpo cetuximab (Erbix®) ou outro anticorpo terapêutico anti-EGFR ou molécula de ligação, que pode ser usado para identificar ou selecionar células que foram modificadas com a construção EGFRt e um receptor recombinante, tal como a receptor de antígeno quimérico (CAR), e/ou para eliminar ou separar células de expressão de o receptor. Veja, Patente Norte-americana No. 8.802.374 e Liu *et al.*, Nature Biotech. Abril de 2016; 34 (4): 430-434). Em alguns aspectos, o marcador, por exemplo, marcador substituto, inclui todo ou parte (por exemplo, forma truncada) de CD34, NGFR, CD19 ou CD19 truncado, por exemplo, CD19 não humano truncado ou receptor de fator de crescimento epidérmico (por exemplo, tEGFR). Em algumas concretizações, o ácido nucleico que codifica o marcador está operacionalmente ligado a um polinucleotídeo que codifica para uma sequência ligante, como uma sequência ligante clivável, por exemplo, T2A. Por exemplo, um marcador, e opcionalmente uma sequência ligante, pode ser qualquer como descrito no PCT Pub. WO2014031687. Por exemplo, o marcador pode ser um EGFR truncado (tEGFR) que é, opcionalmente, ligado a uma sequência ligante, como uma sequência ligante clivável T2A. Um polipeptídeo exemplar para um EGFR truncado (por exemplo tEGFR) compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 7 ou 16 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais identidade de sequência para SEQ ID NO: 7

ou 16.

[00768] Em algumas concretizações, o marcador é ou compreende uma proteína fluorescente, tal como proteína verde fluorescente (GFP), proteína verde fluorescente realçada (EGFP), tal como GFP *super-fold*, proteína fluorescente vermelha (RFP), tal como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed ou DsRed2, proteína fluorescente ciana (CFP), proteína fluorescente verde azulada (BFP), proteína fluorescente azul realçada (EBFP) e proteína fluorescente azul (YFP) e variantes das mesmas, incluindo variantes de espécies, variantes monoméricas e variantes realçadas de códon e/ou das proteínas fluorescentes. Em algumas concretizações, o marcador é ou compreende uma enzima, como a luciferase, o gene *lacZ* de *E. coli*, fosfatase alcalina, fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferase (CAT). Exemplos de genes repórteres emissores de luz incluem luciferase (*luc*), β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), β -glicuronidase (GUS) ou variantes dos mesmos.

[00769] Em algumas concretizações, o marcador é um marcador de seleção. Em algumas concretizações, o marcador de seleção é um polipeptídeo que confere resistência a agentes ou fármacos exógenos. Em algumas concretizações, o marcador de seleção é um gene de resistência a antibióticos. Em algumas concretizações, o marcador de seleção é um gene de resistência a antibióticos que confere resistência a antibióticos a uma célula de mamífero. Em algumas concretizações, o marcador de seleção é composto por um gene de resistência à Puromicina, um gene de resistência à Higromicina, um gene de resistência à Blastomicina, um gene de resistência à Neomicina, um gene de resistência à Geneticina ou um gene de resistência à Zeocina ou uma forma modificada dos mesmos.

[00770] Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células usando partículas de vírus in-

fecciosos recombinantes, como, por exemplo, vetores derivados do vírus símio 40 (SV40), adenovírus, vírus adeno-associado (AAV). Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T usando vetores lentivirais recombinantes ou vetores retrovirais, como vetores gamarretrovirais (veja, por exemplo, Koste *et al.* (2014) *Gene Therapy* 3 de abril de 2014. doi: 10.1038 O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um agente antimicrobiano no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias, bem como sobre o uso de antibióticos. 29 (11): 550-557.

[00771] Em algumas concretizações, o vetor retroviral possui uma sequência de repetição terminal longa (LTR), por exemplo, um vetor retroviral derivado do vírus da leucemia de murino de Moloney (MoMLV), vírus do sarcoma mieloproliferativo (MPSV), célula-tronco embrionária de murino (MESV), vírus da célula-tronco de murino (MSCV), ou vírus formador do foco do baço (SFFV). A maioria dos vetores retrovirais são derivados de retrovírus de murino. Em algumas concretizações, os retrovírus incluem aqueles derivados de qualquer fonte de célula aviária ou de mamífero. Os retrovírus são tipicamente anfotrópicos, o que significa que são capazes de infectar células hospedeiras de várias espécies, incluindo humanos. Em uma concretização, o gene a ser expresso substitui as sequências retrovirais gag, pol e/ou env. Vários sistemas retrovirais ilustrativos foram descritos (por exemplo, Patentes Norte-americanas 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller e Rosman (1989) *BioTechniques* 7: 980-990; Miller, AD (1990) *Human Gene Therapy* 1: 5- 14; Scarpa *et al.* (1991) *Virology* 180: 849-852; Burns *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033-8037; e Boris-Lawrie e Temin (1993) *Cur. Opin. Genet Develop* 3: 102-109.

[00772] Métodos de transdução lentiviral são conhecidos. Métodos exemplares são descritos em, por exemplo, Wang *et al.* (2012) *J. Immunother.* 35 (9): 689-701; Cooper *et al.* (2003) *Blood.* 101: 1637-

1644; Verhoeven *et al.* (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; e Cavalieri *et al.* (2003) *Blood.* 102 (2): 497-505.

[00773] Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por eletroporação (veja, por exemplo, Chicaybam *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8 (3): e60298 e Van Te deloo *et al.* (2000) *Gene. Therapy* 7 (16): 1431-1437). Em algumas concretizações, os ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para as células T por transposição (veja, por exemplo, Manuri *et al.* (2010) *Hum Gene Ther* 21 (4): 427-437; Sharma *et al.* (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; e Huang *et al.* (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Outros métodos de introdução e expressão de material genético em células imunes incluem a transfecção de fosfato de cálcio (por exemplo, como descrito em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York. N. Y.), fusão de protoplastos, transfecção mediada por lipossomas catiônicos; bombardeio de micropartículas facilitado por partículas de tungstênio (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); e coprecipitação de DNA de fosfato de estrôncio (Brash *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

[00774] Outros métodos e vetores para transferência dos ácidos nucléicos que codificam os produtos recombinantes são aqueles descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional, Publicação No.: WO2014055668 e Patente Norte-americana No. 7.446.190.

[00775] Em algumas concretizações, as células, por exemplo, células T, podem ser transfectadas durante ou após a expansão, por exemplo, com um receptor de células T (TCR) ou um receptor de antígeno quimérico (CAR). Esta transfecção para a introdução do gene do receptor desejado pode ser realizada com qualquer vetor retroviral adequado, por exemplo. A população de células geneticamente modificadas pode então ser liberada do estímulo inicial (o estímulo anti-CD3/anti-CD28, por exemplo) e subsequentemente ser estimulada

com um segundo tipo de estímulo, por exemplo, através de um receptor introduzido *de novo*). Esse segundo tipo de estímulo pode incluir um estímulo antigênico na forma de uma molécula de peptídeo/MHC, o ligante cognato (reticulação) do receptor geneticamente introduzido (por exemplo, ligante natural de um CAR) ou qualquer ligante (como um anticorpo) que se liga diretamente à estrutura do novo receptor (por exemplo, reconhecendo regiões constantes no receptor). Veja, por exemplo, Cheadle *et al.*, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907: 645-66 ou Barrett *et al.*, Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine* vol. 65: 333-347 (2014).

[00776] Em alguns casos, um vetor pode ser usado que não requer que as células, por exemplo, células T, sejam ativadas. Em alguns casos, as células podem ser selecionadas e/ou transduzidas antes da ativação. Desse modo, como as células podem ser modificadas antes ou depois da cultura das células, e em alguns casos ao mesmo tempo ou durante pelo menos uma porção da cultura.

[00777] Entre ácidos nucleicos adicionais, por exemplo, os genes para introdução são aqueles que melhoram a eficácia da terapia, promovendo a viabilidade e/ou a função das células transferidas; genes para fornecer um marcador genético para seleção e/ou avaliação das células, como avaliar a sobrevivência ou localização *in vivo*; genes para melhorar a segurança, por exemplo, tornando a célula suscetível à seleção negativa *in vivo*, como descrito por Lupton S. D. *et al.*, *Mol. and Cell Biol.*, 11: 6 (1991); e Riddell *et al.*, *Human Gene Therapy* 3: 319-338 (1992); veja, também as publicações PCT/US91/08442 e PCT/US94/05601 de Lupton *et al.* descrevendo o uso de genes de fusão selecionáveis bifuncionais derivados da fusão de um marcador selecionável positivo dominante com um marcador selecionável negativo. Veja, por exemplo, Riddell *et al.*, Patente Norte-americana No.

6.040.177, nas colunas 14-17.

IV. MÉTODOS DE TRATAMENTO

[00778] Em algumas concretizações, as composições de saída de células T enriquecidas produzidas pelos métodos aqui fornecidos, tal como descrito na Seção I, são administradas como uma terapia celular, por exemplo, uma terapia celular adotiva. As células modificadas são úteis em uma variedade de indicações terapêuticas, diagnósticas e profiláticas. Por exemplo, as células modificadas ou composições compreendendo as células modificadas são úteis no tratamento de uma variedade de doenças e distúrbios em um indivíduo. Tais métodos e usos incluem métodos terapêuticos e usos, por exemplo, envolvendo administração de células modificadas, ou composições contendo o mesmo, a um indivíduo com uma doença, condição, ou distúrbio, como um tumor ou câncer. Em algumas concretizações, as células modificadas ou composições que compreendem as mesmas são administradas em uma quantidade eficaz para efetivar o tratamento de uma doença ou distúrbio. Os usos incluem usos das células modificadas ou composições em tais métodos e tratamentos e na preparação de um medicamento para realizar tais métodos terapêuticos. Em algumas concretizações, os métodos são realizados administrando as células modificadas, ou composições que compreendem o mesmo, ao indivíduo que tem ou suspeita de ter uma doença ou condição. Em algumas concretizações, os métodos desse modo tratam uma doença ou condição ou distúrbio no indivíduo.

[00779] Em concretizações particulares, uma ou mais composições de células, por exemplo, composições de células de saída descritas aqui são administradas como uma terapia celular. Em certas concretizações, os métodos aqui fornecidos produzem uma única composição de saída de células T enriquecidas a partir de células de entrada isoladas, selecionadas e/ou enriquecidas a partir de uma única amostra

biológica que é administrada como uma terapia celular. Em certas concretizações, a composição de saída única é uma composição de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas. Os métodos para administração de células para terapia celular adotiva são conhecidos e podem ser utilizados em conexão com os métodos utilizados e composições. Por exemplo, os métodos adotados de terapia de células T são descritos, por exemplo, na publicação do Pedido de Patente Norte-americana N° 2003/0170238 de Gruenberg *et al*; Patente Norte-americana No. 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8 (10): 577-85). Veja, por exemplo, Themeli *et al.* (2013) *Nat Biotechnol.* 31 (10): 928-933; Tsukahara *et al.* (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438 (1): 84-9; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8 (4): e61338. Uma doença ou condição tratada pode ser qualquer uma na qual a expressão de um antígeno esteja associada a e/ou envolvida na etiologia de uma condição ou distúrbio de doença, por exemplo, causa, exacerba ou está envolvida em tal doença, condição ou distúrbio. Doenças e condições exemplares podem incluir doenças ou condições associadas a malignidade ou transformação de células (por exemplo, câncer), doença autoimune ou inflamatória, ou uma doença infecciosa, por exemplo, causada por um patógeno bacteriano, viral ou outro patógeno. Antígenos exemplares, que incluem antígenos associados a várias doenças e condições que podem ser tratadas, são descritos acima. Em concretizações particulares, o receptor de antígeno químico ou TCR transgênico se liga especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição.

[00780] A doença ou condição tratada pode ser aquela na qual a expressão de um antígeno está associada a e/ou envolvida na etiologia de uma condição ou distúrbio de doença, por exemplo, causa, exacerba ou está envolvida em tal doença, condição ou distúrbio. Doenças e condições exemplares podem incluir doenças ou condições as-

sociadas a malignidade ou transformação de células (por exemplo, câncer), doença autoimune ou inflamatória, ou uma doença infecciosa, por exemplo, causada por um patógeno bacteriano, viral ou outro patógeno. Antígenos exemplares, que incluem antígenos associados a várias doenças e condições que podem ser tratadas, são descritos acima. Em concretizações particulares, o receptor de antígeno químico ou TCR transgênico se liga especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição.

[00781] Entre as doenças, condições e distúrbios estão tumores, incluindo tumores sólidos, neoplasias hematológicas e melanomas, e incluindo tumores localizados e metastáticos, doenças infecciosas, infecção tal como com um vírus ou outro patógeno, por exemplo, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV e doença parasitária e doenças autoimunes e inflamatórias. Em algumas concretizações, uma doença, distúrbio ou condição é um tumor, câncer, malignidade, neoplasia ou outra doença ou distúrbio proliferativo. Tais doenças incluem, mas não estão limitadas a leucemia, linfoma, por exemplo, leucemia mieloide aguda (ou mielogenosa) (AML), leucemia mieloide crônica (ou mielogenosa) (CML), leucemia linfocítica (ou linfoblástica) aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma de células de revestimento (MCL), linfoma da zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin (HL), linfoma não Hodgkin (NHL), linfoma de células grandes anaplásico (ALCL), linfoma folicular, linfoma folicular refratário, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) e mieloma múltiplo (MM). Em algumas concretizações, doença ou condição é uma neoplasia de células B selecionada entre leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL do adulto, leucemia linfoblástica crônica (CLL), linfoma não Hodgkin (NHL) e linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Em algumas concretizações, uma doença ou condição é NHL e o NHL é selecionado do grupo que

consiste em NHL agressivo, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), NOS (*de novo* e transformado de indolente), linfoma mediasminal primário de células B grandes (PMBCL), linfoma de células B grandes rico em células T/histócitos (TCHRBCL), linfoma de Burkitt, linfoma de células de revestimento (MCL), e/ou linfoma folicular (FL), opcionalmente, linfoma folicular Grau 3B (FL3B).

[00782] Em algumas concretizações, uma doença ou condição é uma doença ou condição infecciosa, como, entre outras, infecções virais, retrovirais, bacterianas e protozoárias, imunodeficiência, citomegalovírus (CMV), vírus de Epstein-Barr (EBV), adenovírus, poliomavírus BK. Em algumas concretizações, uma doença ou condição é uma doença autoimune ou inflamatória ou condição, como artrite, por exemplo, artrite reumatoide (RA), diabetes tipo I, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), doença inflamatória intestinal, psoríase, esclerodermia, doença autoimune da tireoide, doença de Grave, doença de Crohn, esclerose múltipla, asma, e/ou uma doença ou condição associada ao transplante.

[00783] Em algumas concretizações, o antígeno associado a uma doença ou distúrbio ou inclui a integrina $\alpha\beta 6$ (integrina $\alpha v\beta 6$), antígeno de maturação da célula B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase carbônica 9 (CA9, também conhecido como CAIX ou G250), um antígeno câncer-testículo, antígeno câncer/testículo 1_B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembriônico (CEA), uma ciclina, ciclina A2, Ligante de Quimiocina de Motivo CC 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), proteína do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR VIII), glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), efrina B2, receptor de efrina A2 (EPHa2),

receptor estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como homólogo do receptor Fc 5 ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), uma proteína de ligação ao folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipicano-3 (GPC3), membro D do grupo 5 do receptor acoplado à proteína G classe C (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinase receptora erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno de alto peso molecular humano associado ao melanoma (HMW-MAA), um antígeno de superfície da hepatite B, antígeno leucocitário humano A1 (HLA-A1), antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), receptor alfa de IL-22 (IL-22R α), receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2) , receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve capa, molécula de adesão de células L1 (L1-CAM), epítipo CE7 de L1-CAM, Repetição Rica em Leucina incluindo 8 Membros da Família A (LRRC8A), Lewis Y, Antígeno associado ao melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, membro D do grupo 2 exterminador natural (Ligantes NKG2D), melan A (MART-1), molécula de adesão de células neurais (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferivelmente expresso de melanoma (PRAME), receptor de progesterona, antígeno específico da próstata, antígeno de células-tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), Receptor Órfão 1 do Tipo Tirosina Cinase receptora (ROR1), survivina, glicoproteína trofoblástica (TPBG também conhecida como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumores (TAG72), proteína 1 relacionada para tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75), proteína 2 relacionada para tirosinase (TRP2, também conhecida como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

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

[00784] Em algumas concretizações, uma doença ou condição é uma neoplasia de células B. Em algumas concretizações, a malignidade das células B é uma leucemia ou um linfoma. Em alguns aspectos, uma doença ou condição é leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL do adulto, leucemia linfoblástica crônica (CLL), linfoma não Hodgkin (NHL) ou linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Em alguns casos, uma doença ou condição é um NHL, como ou incluindo um NHL agressivo, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), NOS (*de novo* e transformado de indolente), linfoma mediastinal primário de células B grandes (PMBCL), linfoma de células B grandes rico em células T/histócitos (TCHRBCL), linfoma de Burkitt, linfoma de células de revestimento (MCL), e/ou linfoma folicular (FL), opcionalmente, linfoma folicular Grau 3B (FL3B). Em alguns aspectos, o receptor recombinante, tal como um CAR, liga-se especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição ou expresso em células do ambiente de uma lesão associada à malignidade das células B. Os antígenos direcionados pelos receptores em algumas concretizações incluem antígenos associados a uma malignidade de células B, como qualquer um de vários marcadores conhecidos de células B. Em algumas concretizações, o antígeno alvo pelo receptor é CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igcapa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30,

ou combinações dos mesmos.

[00785] Em algumas concretizações, uma doença ou condição é um mieloma, como um mieloma múltiplo. Em alguns aspectos, o receptor recombinante, tal como um CAR, liga-se especificamente a um antígeno associado a uma doença ou condição ou expresso em células do ambiente de uma lesão associada ao mieloma múltiplo. Os antígenos direcionados pelos receptores em algumas concretizações incluem antígenos associados ao mieloma múltiplo. Em alguns aspectos, o antígeno, por exemplo, o segundo antígeno ou adicional, como um antígeno específico da doença e/ou antígeno relacionado, é expresso em mieloma múltiplo, como antígeno de maturação da célula B (BCMA), Membro D do grupo 5 do receptor acoplado à proteína G classe C (GPRC5D), CD38 (ADP ribose hidrolase cíclica), CD138 (sindecano-1, sindecano, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 subconjunto 1, CRACC, SLAMF7, CD319 e 19A24), BAFF-R, TACI e/ou FcRH5. Outros antígenos de mielomas múltiplos exemplares incluem CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β -Microglobulina, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1 e o receptor de ativina tipo IIA (ActRIIA). Veja, Benson e Byrd, *J. Clin. Oncol.* (2012) 30 (16): 2013-15; Tao e Anderson, *Bone Marrow Research* (2011): 924058; Chu *et al.*, *Leucemia* (2013) 28 (4): 917-27; Garfall *et al.*, *Discov Med.* (2014) 17 (91): 37-46. Em algumas concretizações, os antígenos incluem aqueles presentes em tumores linfoides, mieloma, linfoma associado à AIDS, e/ou linfoproliferações pós-transplante, como CD38. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno direcionados contra esses antígenos são conhecidos e incluem, por exemplo, aqueles descritos na Patente Norte-americana No. 8.153.765; 8.603.477, 8.008.450; Pub. Norte-americana US20120189622 ou US20100260748; Publicações Internacionais PCT N° WO2006099875, WO2009080829 ou WO2012092612 ou WO2014210064. Em algumas

concretizações, esses anticorpos ou fragmentos de ligação a antígenos do mesmo tipo (por exemplo, scFv) estão contidos em anticorpos multiespecíficos, receptores quiméricos multiespecíficos, CARs multiespecíficos e/ou células multiespecíficas.

[00786] Em algumas concretizações, uma doença ou distúrbio está associado à expressão do membro D do grupo 5 do receptor acoplado à proteína G classe C (GPRC5D) e/ou à expressão do antígeno de maturação da célula B (BCMA).

[00787] Em algumas concretizações, uma doença ou distúrbio é um distúrbio relacionado às células B. Em algumas das concretizações dos métodos fornecidos, uma doença ou distúrbio associado ao BCMA é uma doença autoimune ou distúrbio. Em algumas das concretizações fornecidas, a doença autoimune ou distúrbio é o lúpus eritematoso sistêmico (SLE), nefrite lúpica, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, vasculite associada ao ANCA, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), trombocitopenia autoimune, doença de Chagas, doença de Grave, granulomatose de Wegener, poli-arterite nodosa, síndrome de Sjogren, pêni-go vulgar, esclerodermia, esclerose múltipla, psoríase, nefropatia por IgA, polineuropatia por IgM, doença de Alzheimer, polineuropatia por IgM, polineuropatia por IgM, síndrome antifosfolípideo, doença de Goodpasture, doença de Kawasaki, anemia hemolítica autoimune, miastenia grave ou glomerulonefrite progressiva.

[00788] Em algumas concretizações, uma doença ou distúrbio é um câncer. Em algumas concretizações, o câncer é um câncer de expressão de GPRC5D. Em algumas concretizações, o câncer é uma neoplasia de células plasmáticas e a neoplasia de células plasmáticas é mieloma múltiplo (MM) ou plasmocitoma. Em algumas concretizações, o câncer é mieloma múltiplo (MM). Em algumas concretizações, o câncer é um mieloma múltiplo recidivado/refratário.

[00789] Em algumas concretizações, o antígeno é ou inclui um antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno. Em algumas concretizações, o antígeno é um antígeno viral (como um antígeno viral do HIV, HCV, HBV, etc.), antígenos bacterianos e/ou antígenos parasitários.

[00790] Em algumas concretizações, a terapia celular, por exemplo, terapia de célula T adotiva, é realizada por transferência autóloga, na qual as células são isoladas e/ou preparadas de outro modo pelo indivíduo que receberá a terapia celular, ou de uma amostra derivada de tal indivíduo. Desse modo, em alguns aspectos, como as células são derivadas de um indivíduo, por exemplo, paciente, necessitando de um tratamento e as células, após o isolamento e o processamento, são administradas ao mesmo indivíduo.

[00791] Em algumas concretizações, a terapia celular, por exemplo, a terapia de célula T adotiva, é realizada por transferência alogênica, na qual as células são isoladas e/ou preparadas de outro modo a partir de um indivíduo que não seja o indivíduo a receber ou quem finalmente recebe a terapia celular, por exemplo, um primeiro indivíduo. Em tais concretizações, as células são administradas a um indivíduo diferente, por exemplo, um segundo indivíduo, da mesma espécie. Em algumas concretizações, o primeiro e o segundo indivíduos são geneticamente idênticos. Em algumas concretizações, o primeiro e o segundo indivíduos são geneticamente semelhantes. Em algumas concretizações, o segundo indivíduo expressa a mesma classe ou supertipo HLA que o primeiro indivíduo.

[00792] As células podem ser administradas por qualquer meio adequado, por exemplo, por infusão em bolo, por injeção, por exemplo, injeções intravenosas ou subcutâneas, injeção intraocular, injeção periocular, injeção sub-retiniana, injeção intravítrea, injeção transseptal, injeção subscleral, injeção intracoroide, injeção intracamerar,

injeção subconjuntival, injeção subconjuntival, injeção sub Tenon, injeção retrobulbar, injeção peribulbar ou liberação justa-escleral posterior. Em algumas concretizações, são administrados por administração parenteral, intrapulmonar e intranasal e, se desejado para o tratamento local, administração intralesional. Infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Em algumas concretizações, uma dada dose é administrada por uma única administração em bolo das células. Em algumas concretizações, é administrado por várias administrações de bolo das células, por exemplo, por um período não superior a 3 dias, ou por administração de infusão contínua das células. Em algumas concretizações, a administração da dose celular ou quaisquer terapias adicionais, por exemplo, a terapia linfodepletadora, terapia de intervenção e/ou terapia combinada, é realizada via liberação ambulatorial.

[00793] Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada pode depender do tipo de doença a ser tratada, do tipo de células ou receptores recombinantes, da gravidade e do curso de uma doença, sejam as células administradas para fins preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, história clínica e resposta do indivíduo às células, e a critério do médico assistente. As composições e células são em algumas concretizações adequadamente administradas ao indivíduo ao mesmo tempo ou durante uma série de tratamentos.

[00794] Em algumas concretizações, as células são administradas como parte de um tratamento combinado, tal como simultaneamente ou sequencialmente com, em qualquer ordem, outra intervenção terapêutica, tal como um anticorpo ou célula modificada ou receptor ou agente, tal como um agente citotóxico ou terapêutico. As células em algumas concretizações são coadministradas com um ou mais agentes terapêuticos adicionais ou em conexão com outra intervenção terapêutica, simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem.

Em alguns contextos, como as células são coadministradas com outra terapia suficientemente próxima no tempo, de modo que as populações celulares aumentam o efeito de um ou mais agentes terapêuticos adicionais, ou vice-versa. Em algumas concretizações, as células são administradas antes de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas concretizações, as células são administradas após um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas concretizações, um ou mais agentes adicionais incluem uma citocina, como a IL-2, por exemplo, para realçar a persistência. Em algumas concretizações, os métodos compreendem a administração de um agente quimioterápico.

[00795] Em algumas concretizações, os métodos compreendem a administração de um agente quimioterápico, por exemplo, um agente quimioterápico condicionador, por exemplo, para reduzir a carga tumoral antes da administração.

[00796] O pré-condicionamento de indivíduos com terapias imunodepletoras (por exemplo, linfodepletoras) em alguns aspectos pode melhorar os efeitos da terapia celular adotiva (ACT).

[00797] Desse modo, em algumas concretizações, os métodos incluem a administração de um agente de pré-condicionamento, como um agente quimioterápico ou linfodepletor, como ciclofosfamida, fludarabina ou combinações do mesmo, a um indivíduo antes do início da terapia celular. Por exemplo, ao indivíduo pode ser administrado um agente de pré-condicionamento pelo menos 2 dias antes, pelo menos 3, 4, 5, 6 ou 7 dias antes, para o início da terapia celular. Em algumas concretizações, administra-se ao indivíduo um agente de pré-condicionamento não mais que 7 dias antes, tal como não mais que 6, 5, 4, 3 ou 2 dias antes, para o início da terapia celular.

[00798] Em algumas concretizações, o indivíduo é pré-condicionado com ciclofosfamida em uma dose entre 20 mg/kg e 100 mg/kg, apro-

ximadamente entre 40 mg/kg e 80 mg/kg. Em alguns aspectos, o indivíduo é pré-condicionado com ou com cerca de 60 mg/kg de ciclofosfamida. Em algumas concretizações, a ciclofosfamida pode ser administrada em uma única dose ou em uma pluralidade de doses, administrada diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas concretizações, a ciclofosfamida é administrada uma vez ao dia por um ou dois dias. Em algumas concretizações, em que o agente linfodepletor compreende a ciclofosfamida, o indivíduo recebe ciclofosfamida em uma dose entre 100 mg/m² e 500 mg/m², aproximadamente entre 200 mg/m² e 400 mg/m², ou 250 mg/m² e 350 mg/m², inclusive. Em alguns casos, o indivíduo é administrado cerca de 300 mg/m² de ciclofosfamida. Em algumas concretizações, a ciclofosfamida pode ser administrada em uma única dose ou em uma pluralidade de doses, administrada diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas concretizações, a ciclofosfamida é administrada diariamente, por 1 a 5 dias, por exemplo, por 3 a 5 dias. Em alguns casos, o indivíduo é administrado cerca de 300 mg/m² de ciclofosfamida, diariamente por 3 dias, antes do início da terapia celular.

[00799] Em algumas concretizações, em que o agente linfodepletor compreende fludarabina, o indivíduo recebe fludarabina em uma dose entre 1 mg/m² e 100 mg/m², aproximadamente entre 10 mg/m² e 75 mg/m², 15 mg/m² e 50 mg/m², 20 mg/m² e 40 mg/m², ou 24 mg/m² e 35 mg/m², inclusive. Em alguns casos, o indivíduo é administrado cerca de 30 mg/m² de fludarabina. Em algumas concretizações, a fludarabina pode ser administrada em uma dose única ou em uma pluralidade de doses, administrada diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas concretizações, a fludarabina é administrada diariamente, por 1 a 5 dias, por exemplo, por 3 a 5 dias. Em alguns casos, o indivíduo é administrado cerca de 30 mg/m² de fludarabina, diariamente por 3 dias, antes do início da terapia celular.

[00800] Em algumas concretizações, o agente linfodepletor compreende uma combinação de agentes, tal como uma combinação de ciclofosfamida e fludarabina. Desse modo, a combinação de agentes pode incluir ciclofosfamida em qualquer dose ou esquema de administração, como os descritos acima, e fludarabina em qualquer dose ou esquema de administração, tal como os descritos acima. Por exemplo, em alguns aspectos, o indivíduo recebe 60 mg/kg (~ 2 g/m²) de ciclofosfamida e 3 a 5 doses de 25 mg/m² de fludarabina antes da primeira ou da dose subsequente.

[00801] Após a administração das células, a atividade biológica das populações de células modificadas em algumas concretizações é medida, por exemplo, por qualquer um de vários métodos conhecidos. Os parâmetros para avaliar incluem a ligação específica de uma célula T modificada ou natural ou outra célula imune ao antígeno, *in vivo*, por exemplo, por imagem, ou *ex vivo*, por exemplo, por ELISA ou citometria de fluxo. Em certas concretizações, a capacidade das células modificadas para destruir as células alvo pode ser medida usando quaisquer métodos conhecidos adequados, como os ensaios de citotoxicidade descritos em, por exemplo, Kochenderfer *et al.*, *J. Immunotherapy*, 32 (7): 689 -702 (2009) e Herman *et al.* *J. Immunological Methods*, 285 (1): 25-40 (2004). Em certas concretizações, a atividade biológica das células é medida testando a expressão e/ou a secreção de uma ou mais citocinas, como CD107a, IFN γ , IL-2 e TNF. Em alguns aspectos, a atividade biológica é medida pela avaliação do resultado clínico, redução da carga ou carga tumoral.

[00802] Em certas concretizações, as células modificadas são modificadas ainda mais de várias maneiras, de modo que sua eficácia terapêutica ou profilática seja aumentada. Por exemplo, o CAR ou TCR modificado expresso pela população pode ser conjugado direta ou indiretamente por meio de um ligante a uma porção de direciona-

mento. A prática de conjugar compostos, por exemplo, o CAR ou TCR, para porções alvo é conhecida. Veja, por exemplo, Wadwa *et al.*, J. Drug Targeting 3: 1 1 1 (1995) e Patente Norte-americana 5.087.616.

[00803] Em algumas concretizações, as células são administradas como parte de um tratamento combinado, tal como simultaneamente ou sequencialmente com, em qualquer ordem, outra intervenção terapêutica, tal como um anticorpo ou célula modificada ou receptor ou agente, tal como um agente citotóxico ou terapêutico. As células em algumas concretizações são coadministradas com um ou mais agentes terapêuticos adicionais ou em conexão com outra intervenção terapêutica, simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem. Em alguns contextos, como as células são coadministradas com outra terapia suficientemente próxima no tempo, de modo que as populações celulares aumentam o efeito de um ou mais agentes terapêuticos adicionais, ou vice-versa. Em algumas concretizações, as células são administradas antes de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas concretizações, as células são administradas após um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas concretizações, o um ou mais agentes adicionais inclui uma citocina, como IL-2, por exemplo, para realçar a persistência.

A. Dosagem

[00804] Em algumas concretizações, uma dose de células, por exemplo, as células de saída descritas aqui, como na Seção I-G, é administrada a indivíduos de acordo com os métodos descritos, e/ou com os artigos de fabricação fornecidos ou composições. Em algumas concretizações, o tamanho ou o momento das doses é determinado em função da doença ou condição específica do indivíduo. Em alguns casos, o tamanho ou o momento das doses para uma doença específica, em vista da descrição fornecida, pode ser determinado empiricamente.

[00805] Em algumas concretizações, a dose de células compreende entre a, ou cerca de 2×10^5 das células/kg e a, ou cerca de 2×10^6 das células/kg, como entre a, ou cerca de 4×10^5 das células/kg e a, ou cerca de 1×10^6 das células/kg ou entre, ou cerca de 6×10^5 das células/kg e a, ou cerca de 8×10^5 das células /kg. Em algumas concretizações, a dose de células compreende não mais de 2×10^5 das células (por exemplo, células de expressão de antígeno, como células de expressão de CAR) por quilograma de peso corporal do indivíduo (células/kg), como não mais que, ou cerca de 3×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 4×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 5×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 6×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 7×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 8×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 9×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 1×10^6 células/kg, ou não mais do que a, ou cerca de 2×10^6 células/kg. Em algumas concretizações, a dose de células compreende menos ou menos ou aproximadamente 2×10^5 células (por exemplo, células de expressão de antígenos, como células de expressão de CAR) por quilograma de corpo corporal do indivíduo (células/kg), como não mais do que a, ou cerca de 3×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 4×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 5×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 6×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 7×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 8×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 9×10^5 células/kg, não mais do que a, ou cerca de 1×10^6 células/kg, ou não mais do que a, ou cerca de 2×10^6 células/kg.

[00806] Em certas concretizações, as células, ou populações individuais dos subtipos de células, são administradas ao indivíduo em uma faixa de cerca de 0,1 milhão a ou cerca de 100 bilhões de células e/ou a quantidade de células por quilograma de peso corporal do indivíduo,

como, por exemplo, a ou cerca de 0,1 milhão a, ou cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, a, ou cerca de 5 milhões células, a ou cerca de 25 milhões de células, a ou cerca de 500 milhões de células, a ou cerca de 1 bilhão de células, a ou cerca de 5 bilhões de células, a ou cerca de 20 bilhões de células, a ou cerca de cerca de 30 bilhões de células, a ou cerca de 40 bilhões de células, ou uma faixa definida por dois dos valores anteriores), cerca de 1 milhão a, ou cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, a ou cerca de 5 milhões de células, a ou cerca de 25 milhões de células, a ou cerca de 500 milhões de células, a ou cerca de 1 bilhão de células, a ou cerca de 5 bilhões de células, a ou cerca de 20 bilhões células, a ou cerca de 30 bilhões de células, ou cerca de 40 bilhões de células, ou uma faixa definida por dois dos valores anteriores), como a, ou cerca de 10 milhões a, ou cerca de 100 bilhões de células (por exemplo, a ou cerca de 20 milhões de células, a ou cerca de 30 milhões de células, a ou cerca de 40 milhões de células, a ou cerca de 60 milhões de células, a ou cerca de 70 milhões de células, a ou cerca de 70 milhões de células, a ou cerca de 80 milhões de células, a ou cerca de 90 milhões de células, a ou cerca de 10 bilhões de células, a ou cerca de 25 bilhões de células, a ou cerca de 50 bilhões de células, a ou cerca de 75 bilhões de células, a ou cerca de, a ou cerca de 90 bilhões de células, ou uma faixa definida por dois dos valores anteriores) e, em alguns casos, a ou cerca de 100 milhões de células, a ou cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, a, ou cerca de 120 milhões de células, a ou cerca de 250 milhões de células, a ou cerca de 350 milhões de células, a ou cerca de 650 milhões de células, a ou cerca de 800 milhões de células, a ou cerca de 900 milhões de células, a ou cerca de 3 bilhões de células, a ou cerca de 30 bilhões de células, a ou cerca de 45 bilhões de células) ou qualquer valor entre essas faixas e/ou por quilograma de peso corporal do indivíduo. As dosagens podem variar dependendo dos atributos espe-

cíficos de uma doença ou distúrbio e/ou paciente e/ou outros tratamentos. Em algumas concretizações, a dose de células é uma dose plana de células ou uma dose fixa de células, de modo que a dose de células não esteja ligada ou com base na área da superfície corporal ou no peso de um indivíduo.

[00807] Em algumas concretizações, por exemplo, em que o indivíduo é humano, a dose inclui menos de cerca de 5×10^8 células de expressão de receptor recombinante total (por exemplo, CAR), células T ou células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), por exemplo, na faixa de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de 5×10^8 , tais células, como a, ou cerca de 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, ou 5×10^8 total dessas células, ou a faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores. Em algumas concretizações, por exemplo, quando o indivíduo é humano, a dose inclui mais de 1×10^6 células de expressão de receptor recombinante total (por exemplo, CAR), células T ou células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) e menos de a, ou cerca de 2×10^9 células de expressão de receptor recombinante total (por exemplo, CAR), células T ou células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), por exemplo, na faixa de a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ a, ou cerca de $1,2 \times 10^9$, tais células, como a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, 8×10^8 ou $1,2 \times 10^9$ total dessas células, ou a faixa entre dois dos valores anteriores.

[00808] Em algumas concretizações, a dose de células geneticamente modificadas compreende de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total (expressão de CAR), de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de 5×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ células T de expressão de CAR total, de

a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de 1×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de 5×10^6 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^5 a, ou cerca de 1×10^6 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de 5×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de 1×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de 5×10^6 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^6 a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ a, ou cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ a, ou cerca de 5×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ a, ou cerca de 1×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ a, ou cerca de 5×10^6 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^6 a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^6 a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^6 a, ou cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^6 a, ou cerca de 5×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^6 a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ células T de expressão de CAR total, de a, ou c

de 5×10^6 a, ou cerca de 1×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^7 a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^7 a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^7 a, ou cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^7 a, ou cerca de 5×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^7 a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ a, ou cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ a, ou cerca de 5×10^7 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^7 a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^7 a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 5×10^7 a, ou cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^8 a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de 1×10^8 a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, de a, ou cerca de $2,5 \times 10^8$ a, ou cerca de 5×10^8 células T de expressão de CAR total. Em algumas concretizações, a dose de células geneticamente modificadas compreende de ou de cerca de $2,5 \times 10^7$ a, ou cerca de $1,5 \times 10^8$ células T de expressão de CAR total, tal como de ou de cerca de 5×10^7 a ou a cerca de 1×10^8 células T de expressão de CAR total.

[00809] Em algumas concretizações, a dose de células geneticamente modificadas compreende pelo menos a, ou cerca de 1×10^5 células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de $2,5 \times 10^5$ células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de 5×10^5 células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de 1×10^6 células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de $2,5 \times 10^6$ células de

expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de 5×10^6 células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de 1×10^7 células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de $2,5 \times 10^7$ células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de 5×10^7 células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de 1×10^8 células de expressão de CAR, pelo menos a, ou cerca de $1,5 \times 10^8$ células de expressão de CAR, pelo menos cerca de 5×10^6 células de expressão de CAR, pelo menos ou pelo menos cerca de 1×10^7 células de expressão de CAR, pelo menos ou pelo menos cerca de $2,5 \times 10^7$ células de expressão de CAR, pelo menos ou pelo menos cerca de 5×10^7 células de expressão de CAR, pelo menos ou pelo menos cerca de 1×10^8 células de expressão de CAR, pelo menos ou a ou cerca de $2,5 \times 10^8$ células de expressão de CAR, ou pelo menos a ou cerca de 5×10^8 células de expressão de CAR.

[00810] Em algumas concretizações, a terapia celular compreende a administração de uma dose que compreende um número de células a partir de 1×10^5 a ou a cerca de 5×10^8 células de expressão de receptor recombinante total, células T totais ou células mononucleares de sangue periférico total (PBMCs), de ou de cerca de 5×10^5 a ou a cerca de 1×10^7 células de expressão de receptor recombinante total, células T totais, ou células mononucleares de sangue periférico total (PBMCs) ou de 1×10^6 a cerca de 1×10^7 células de expressão de receptor recombinante total, células T totais ou células mononucleares de sangue periférico total (PBMCs), cada um inclusive. Em algumas concretizações, a terapia celular compreende a administração de uma dose de células compreendendo um número de células pelo menos ou pelo menos cerca de 1×10^5 células de expressão de receptor recombinante total, células T totais ou células mononucleares de sangue periférico total (PBMCs), como pelo menos ou pelo menos 1×10^6 , pelo menos ou pelo menos cerca de 1×10^7 , pelo menos ou pelo menos

cerca de 1×10^8 dessas células. Em algumas concretizações, o número refere-se ao número total de células de expressão de CD3 ou CD8, em alguns casos também células de expressão de receptores recombinantes (por exemplo, de expressão de CAR). Em algumas concretizações, a terapia celular compreende a administração de uma dose compreendendo um número de células de 1 a 10^5 a cerca de 5×10^8 células T totais de expressão de CD3 ou de expressão de CD8 ou células de expressão de receptor recombinante de expressão de CD3 ou de expressão de CD8, de ou de cerca de 5×10^5 a ou a cerca de 1×10^7 células T totais de expressão de CD3 ou de expressão de CD8 ou células de expressão de receptor recombinante de expressão de CD3 ou de expressão de CD8, ou de ou de cerca de 1×10^6 a ou a cerca de 1×10^7 células T totais de expressão de CD3 ou de expressão de CD8 ou células de expressão de receptor recombinante de expressão de CD3 ou de expressão de CD8, cada uma inclusive. Em algumas concretizações, a terapia celular compreende a administração de uma dose compreendendo um número de células de ou de cerca de 1×10^5 a ou a cerca de 5×10^8 células de expressão de CD3/de expressão de CAR ou de expressão de CD8/de expressão de CAR totais, de ou de cerca de 5×10^5 a ou a cerca de 1×10^7 células de expressão de CD3/de expressão de CAR ou de expressão de CD8/de expressão de CAR totais, ou de ou de cerca de 1×10^6 a ou a cerca de 1×10^7 células de expressão de CD3/de expressão de CAR ou de expressão de CD8/de expressão de CAR totais, cada uma inclusive.

[00811] Em algumas concretizações, as células T da dose incluem células T de expressão de CD4, células T de expressão de CD8 ou células T de expressão de CD4 e de expressão de CD8.

[00812] Em algumas concretizações, por exemplo, onde o indivíduo é humano, as células T de expressão de CD8 da dose, incluindo uma dose que inclui células T de expressão de CD4 e de expressão de

CD8, incluem entre a ou cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 5×10^8 células de expressão de CD8 de expressão de receptor recombinante totais (por exemplo, CAR), por exemplo, na faixa de a, ou cerca de 5×10^6 a, ou cerca de 1×10^8 tais células, como 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, ou 5×10^8 total dessas células, ou a faixa entre dois dos valores anteriores. Em algumas concretizações, o paciente recebe doses múltiplas e cada uma das doses ou a dose total pode estar dentro de qualquer um dos valores anteriores. Em algumas concretizações, a dose de células compreende a administração de cerca de 1×10^7 a cerca de $0,75 \times 10^8$ células T de expressão de CD8 de expressão de receptor recombinante totais, a partir de ou a partir de cerca de 1×10^7 a ou a cerca de 5×10^7 células T de expressão de CD8 de expressão de receptor recombinante totais de ou de cerca de 1×10^7 a ou cerca de $0,25 \times 10^8$ células T de expressão de CD8 de expressão de receptor recombinante totais, cada uma inclusive. Em algumas concretizações, a dose de células compreende a administração de, ou cerca de 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$ ou 5×10^8 células T de expressão de CD8 de expressão de receptor recombinante totais.

[00813] Em algumas concretizações, a dose de células, por exemplo, células T de expressão de receptores recombinantes, é administrada ao indivíduo como uma dose única ou é administrada apenas uma vez dentro de um período de duas semanas, um mês, três meses, seis meses, 1 ano ou mais.

[00814] No contexto da terapia celular adotiva, a administração de uma determinada "dose" abrange a administração da quantidade ou número de células especificadas como uma composição única e/ou administração ininterrupta única, por exemplo, como uma injeção única ou infusão contínua, e também abrange a administração da quantidade ou número dado de células como uma dose dividida ou como uma

pluralidade de composições, fornecida em várias composições ou infusões individuais, durante um período de tempo especificado, não superior a 3 dias. Desse modo, em alguns contextos, a dose é uma administração única ou contínua do número especificado de células, administrado ou iniciado em um único momento. Em alguns contextos, no entanto, a dose é administrada em injeções ou infusões múltiplas por um período não superior a três dias, tal como uma vez ao dia por três dias ou por dois dias ou por infusões múltiplas durante um período de um dia.

[00815] Desse modo, em alguns aspectos, como células da dose são administradas em uma única composição farmacêutica. Em algumas concretizações, como células da dose são administradas em uma pluralidade de composições, coletivamente incluídas como células da dose.

[00816] Em algumas concretizações, o termo "dose dividida" refere-se a uma dose dividida para que seja administrada por mais de um dia. Este tipo de dosagem é abrangido pelos presentes métodos e é considerado uma dose única.

[00817] Desse modo, a dose de células pode ser administrada como uma dose dividida, por exemplo, uma dose dividida administrada ao longo do tempo. Por exemplo, em algumas concretizações, a dose pode ser administrada ao indivíduo por 2 dias ou mais de 3 dias. Métodos exemplares para dosagem dividida incluem administrar 25% da dose no primeiro dia e administrar os 75% restantes da dose no segundo dia. Em outras concretizações, 33% da dose pode ser administrada no primeiro dia e os restantes 67% administrados no segundo dia. Em alguns aspectos, 10% da dose é administrada no primeiro dia, 30% da dose é administrada no segundo dia e 60% da dose é administrada no terceiro dia. Em algumas concretizações, a dose dividida não se espalha por mais de 3 dias.

[00818] Em algumas concretizações, as células da dose podem ser administradas pela administração de uma pluralidade de composições ou soluções, como uma primeira e uma segunda, opcionalmente mais, cada uma contendo algumas células da dose. Em alguns aspectos, a pluralidade de composições, cada uma contendo uma população diferente e/ou subtipos de células, é administrada separadamente ou independentemente, opcionalmente dentro de um determinado período de tempo. Por exemplo, as populações ou subtipos de células podem incluir células T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente, populações enriquecidas com CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente, por exemplo, células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ cada célula individualmente geneticamente modificada para expressar o receptor recombinante. Em algumas concretizações, a administração da dose compreende a administração de uma primeira composição compreendendo uma dose de células T CD8⁺ ou a dose de células T CD4⁺ e a administração de uma segunda composição compreendendo a outra dose da célula T CD4⁺ e como células T CD8⁺.

[00819] Em algumas concretizações, a administração da composição ou dose, por exemplo, a administração da pluralidade de composições celulares, envolve a administração da composição celular separadamente. Em alguns aspectos, as administrações separadas são realizadas simultaneamente, ou sequencialmente, em qualquer ordem. Em algumas concretizações, a dose compreende uma primeira composição e uma segunda composição, e a primeira composição e a segunda composição são administradas com intervalo de 0 a 12 horas, intervalo de 0 a 6 horas ou intervalo de 0 a 2 horas. Em algumas concretizações, o início da administração da primeira composição e o início da administração da segunda composição são realizados não mais que 2 horas, não mais que 1 hora, ou não mais que 30 minutos de intervalo, não mais que 15 minutos, não mais que 10 minutos ou não

mais do que com 5 minutos de intervalo. Em algumas concretizações, a iniciação e/ou conclusão da administração da primeira composição e a conclusão e/ou iniciação da administração da segunda composição são realizadas não mais que 2 horas, não mais que 1 hora, ou não mais do que 30 minutos de intervalo, não mais que 15 minutos, não mais que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo.

[00820] Em algumas composições, a primeira composição, por exemplo, a primeira composição da dose, compreende células T CD4+. Em algumas composições, a primeira composição, por exemplo, a primeira composição da dose compreende células T CD8+. Em algumas concretizações, a primeira composição é administrada antes da segunda composição.

[00821] Em algumas concretizações, a dose ou composição das células inclui uma relação definida ou alvo de células CD4+ de expressão de um receptor recombinante para células CD8+ de expressão de um receptor recombinante e/ou de células CD4+ para células CD8+, cuja relação é opcionalmente aproximadamente 1:1 ou está entre aproximadamente 1:3 e aproximadamente 3:1, aproximadamente como 1:1. Em alguns aspectos, a administração de uma composição ou dose com a relação desejada ou desejada de diferentes populações celulares (como a relação CD4+: CD8+ ou a relação CAR+CD4+: CAR+CD8+, por exemplo, 1:1) envolve a administração de uma composição celular contendo uma das populações e, em seguida, a administração de uma composição celular separada, compreendendo a outra das populações, onde a administração é igual ou aproximadamente ao alvo ou à relação desejada. Em alguns aspectos, a administração de uma dose ou composição de células em uma relação definida leva a uma expansão melhorada, persistência e/ou atividade antitumoral da terapia com células T.

[00822] Em algumas concretizações, o indivíduo recebe doses múltiplas.

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

[00823] Em alguns aspectos, o tamanho da primeira dose e/ou consecutiva é determinado com base em um ou mais critérios de resposta como o indivíduo ao tratamento anterior, por exemplo, quimioterapia, sobrecarga de doença no indivíduo, como carga tumoral, volume, tamanho, grau ou extensão, tipo de metástase, estágio, probabilidade de ocorrência de um indivíduo com desenvolvimento de resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófagos, síndrome de lise tumoral, síndrome de lise tumoral, neurotoxicidade e/ou um resposta imune ao hospedeiro contra a administração de células e/ou receptores recombinantes.

[00824] Em alguns aspectos, o tempo entre a administração da primeira dose e a administração da dose consecutiva é de 9 a 35 dias, de 14 a 28 dias ou de 15 a 27 dias. Em algumas concretizações, a administração da dose consecutiva ocorre em um momento superior a cerca de 14 dias após e menos de cerca de 28 dias após a administração da primeira dose. Em alguns aspectos, o tempo entre a primeira e a dose consecutiva é cerca de 21 dias. Em algumas concretizações,

uma dose ou doses adicionais, por exemplo, doses consecutivas, são administradas após a administração da dose consecutiva. Em alguns aspectos, a dose ou doses consecutivas adicionais são administradas pelo menos cerca de 14 e menos que cerca de 28 dias após a administração de uma dose anterior. Em algumas concretizações, a dose adicional é administrada menos de 14 dias após a dose anterior, por exemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 dias após a dose anterior. Em algumas concretizações, nenhuma dose é administrada menos de cerca de 14 dias após a dose anterior e/ou nenhuma dose é administrada mais do que cerca de 28 dias após a dose anterior.

[00825] Em algumas concretizações, a dose de células, por exemplo, células de expressão de receptores recombinantes, compreende duas doses (por exemplo, uma dose dupla), compreendendo uma primeira dose das células T e uma dose consecutiva das células T, em que uma ou ambas a primeira e a segunda dose compreendem a administração da dose dividida de células T.

[00826] Em algumas concretizações, a dose de células geralmente é grande o suficiente para ser eficaz na redução da sobrecarga da doença.

[00827] Em algumas concretizações, as células são administradas em uma dosagem desejada, que em alguns aspectos inclui uma dose ou número desejado de células ou tipo (s) de célula e/ou uma relação direta dos tipos de célula. Desse modo, a dosagem de células em algumas concretizações é baseada no número total de células (ou número por kg de peso corporal) e uma relação de captura das populações ou subtipos individuais, como a relação CD4+ para CD8+. Em algumas concretizações, a dosagem de células é baseada no número total desejado (ou número por kg de peso corporal) de células nas populações individuais ou nos tipos de células individuais. Em algumas concretizações, a dosagem é baseada em uma combinação de tais

características, como o número desejado de células totais, a relação desejada e o número total desejado de células nas populações individuais.

[00828] Em algumas concretizações, as populações ou subtipos de células, como as células T CD8+ e CD4+, são administrados em ou dentro de uma diferença tolerada de uma dose desejada de células totais, como uma dose desejada de células T. Em alguns aspectos, a dose desejada é um número desejado de células ou um número desejado de células por unidade de peso corporal do indivíduo ao qual as células são administradas, por exemplo, células/kg. Em alguns aspectos, a dose desejada é igual ou superior a um número mínimo de células ou número mínimo de células por unidade de peso corporal. Em alguns aspectos, entre as células totais, administradas na dose desejada, as populações ou subtipos individuais estão presentes em uma taxa de saída desejada ou próxima a ela (como a relação CD4+ para CD8+), por exemplo, dentro de uma certa diferença ou erro tolerado de tal relação.

[00829] Em algumas concretizações, as células são administradas na diferença tolerada de uma dose desejada de uma ou mais das populações individuais ou subtipos de células, como uma dose desejada de células CD4+ e/ou uma dose desejada de células CD8+. Em alguns aspectos, a dose desejada é um número desejado de células do subtipo ou população, ou um número desejado de células por unidade de peso corporal do indivíduo ao qual as células são administradas, por exemplo, células/kg. Em alguns aspectos, a dose desejada é igual ou superior a um número mínimo de células da população ou subtipo, ou número mínimo de células da população ou subtipo por unidade de peso corporal.

[00830] Desse modo, em algumas concretizações, a dosagem é baseada em uma dose fixa desejada de células totais e uma relação

desejada, e/ou baseada em uma dose fixa desejada de um ou mais, por exemplo, cada um dos subtipos ou subpopulações individuais. Desse modo, em algumas concretizações, a dosagem é baseada em uma dose fixa ou mínima desejada de células CD4+ para CD8+, e/ou é baseada em uma dose fixa ou mínima desejada de células CD4+ e/ou CD8+.

[00831] Em algumas concretizações, as células são administradas em ou dentro de uma faixa tolerada de uma taxa de saída desejada de várias populações ou subtipos de células múltiplas, como células CD4+ e CD8+ ou subtipos. Em alguns aspectos, a relação desejada pode ser uma relação específica ou pode ser uma variedade de relações. Por exemplo, em algumas concretizações, a relação desejada (por exemplo, relação de células CD4+ para CD8+) está entre a ou de cerca de 5:1 e a, ou cerca de 5:1 (ou mais que cerca de 1:5 e menos que cerca de 5:1), ou entre a cerca de 1:3 e a ou cerca de 3:1 (ou mais que cerca de 1:3 e menos que cerca de 3:1), como entre a ou cerca de 2:1 e a ou cerca de 1:5 (ou mais que cerca de 1:5 e menos que cerca de 2:1, e a ou cerca de 5:1, 4,5:1, 4: 1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9: 1, 1,8: 1, 1,7: 1, 1,6: 1, 1,5:1, 1,4: 1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9: 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 ou 1:5. Em alguns aspectos, a diferença tolerada está entre cerca de 1%, cerca de 2% e cerca de 3%, cerca de 4% cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50% da relação desejada, incluindo qualquer valor entre essas faixas.

[00832] Em concretizações particulares, os números e/ou concentrações de células referem-se ao número de células de expressão de receptores recombinantes (por exemplo, CAR). Em outras concretizações, os números e/ou concentrações de células se referem ao número ou concentração de todas as células, células T ou células mononu-

cleares de sangue periférico (PBMCs) administradas.

[00833] Em alguns aspectos, o tamanho da dose é determinado com base em um ou mais critérios de resposta do paciente a tratamento anterior, por exemplo, quimioterapia, sobrecarga de doença no indivíduo, carga tumoral, volume, tamanho, ou grau, extensão ou tipo de metástase, estágio, e/ou probabilidade ou incidência de o indivíduo desenvolver resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófagos, síndrome de lise tumoral, neurotoxicidade e/ou resposta imune do hospedeiro contra as células e/ou receptores recombinantes sendo administrados.

[00834] Em algumas concretizações, os métodos também incluem a administração de uma ou mais doses adicionais de células de expressão de um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou terapia de linfonodos, e/ou uma ou mais etapas dos métodos são repetidas. Em algumas concretizações, a uma ou mais doses adicionais é a mesma que a dose inicial. Em algumas concretizações, a uma ou mais doses adicionais é diferente da dose inicial, por exemplo, mais alta, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes ou mais acima da dose inicial, ou menor, por exemplo, superior, igual a 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes ou mais que a dose inicial. Em algumas concretizações, a administração de uma ou mais doses adicionais é determinada com base na resposta do indivíduo ao tratamento inicial ou a qualquer tratamento anterior, sobrecarga da doença no indivíduo, carga tumoral, volume, tamanho, extensão ou grau, tipo de metástase, estágio, e/ou probabilidade ou incidência de o indivíduo desenvolver resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófagos, síndrome de lise tumoral, neurotoxicidade, e/ou uma resposta imune do hospedeiro contra as células e/ou receptores recombinantes sendo administrado.

B. Resposta, Eficácia e Sobrevivência

[00835] Em algumas concretizações, células, por exemplo, células de saída, produzidas pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo, como descrito na Seção I, são administradas a um indivíduo, e o indivíduo é monitorado quanto à resposta, sobrevivência e/ou sinais ou sintomas de toxicidade.

[00836] Em algumas concretizações, pelo menos 35%, pelo menos 40% ou pelo menos 50% dos indivíduos tratados com composições de células, por exemplo, composições terapêuticas de células contendo células T CAR+CD4+ e CD8+, produzem remissão (CR); e/ou pelo menos 50%, pelo menos 60% ou pelo menos 70% dos indivíduos tratados de acordo com o método atingem a taxa de resposta objetiva (ORR). Em algumas concretizações, pelo menos ou pelo menos cerca de 50% dos indivíduos, pelo menos ou pelo menos cerca de 60% dos indivíduos, pelo menos ou pelo menos cerca de 70% dos indivíduos, pelo menos ou pelo menos cerca de 80% dos indivíduos ou pelo menos ou pelo menos cerca de 90% dos indivíduos tratados de acordo com o método atingem CR e/ou atingem uma resposta objetiva (OR). Em algumas concretizações, os critérios avaliados para o tratamento eficaz incluem taxa de resposta global (ORR), resposta completa (CR), duração da resposta (DOR), sobrevida livre de progressão (PFS), e/ou sobrevida global (OS).

[00837] Em algumas concretizações, pelo menos 40% ou pelo menos 50% dos indivíduos tratados de acordo com os métodos aqui fornecidos alcançam remissão completa (CR), exibem sobrevida livre de progressão (PFS) e/ou sobrevida global (OS) de mais que a ou cerca de 3 meses, 6 meses ou 12 meses; em média, os indivíduos tratados de acordo com o método exibem uma PFS ou OS mediana de mais que a ou cerca de 6 meses, 12 meses ou 18 meses; e/ou o indivíduo exibe PFS ou OS após terapia por pelo menos a ou cerca de 6, 12, 18

ou mais meses.

[00838] Em alguns aspectos, a sobrevida livre de progressão (PFS) é descrita como o período de tempo durante e após o tratamento de uma doença, tal como o câncer, em que um indivíduo vive com uma doença, mas não piora. Em alguns aspectos, a resposta objetiva (OR) é descrita como uma resposta mensurável. Em alguns aspectos, a taxa de resposta objetiva (ORR) é descrita como a relação de pacientes que atingiram CR ou PR. Em alguns aspectos, a sobrevida global (OS) é descrita como o período de tempo a partir da data do diagnóstico ou do início do tratamento para o câncer de uma doença, tal como, que os indivíduos diagnosticados com uma doença ainda estão vivos. Em alguns aspectos, a sobrevida livre de eventos (EFS) é descrita como o período de tempo após o término do tratamento para um câncer, para que o indivíduo permaneça livre de certas complicações ou eventos que o tratamento pretendia impedir ou atrasar. Esses eventos podem incluir o retorno do câncer ou o aparecimento de certos sintomas, como a dor óssea do câncer que se espalhou para o osso ou a morte.

[00839] Em algumas concretizações, a medida da duração da resposta (DOR) inclui o tempo desde a documentação da resposta do tumor até a progressão da doença. Em algumas concretizações, o parâmetro para avaliar a resposta pode incluir resposta durável, por exemplo, resposta que persiste após um período de tempo desde o início da terapia. Em algumas concretizações, a resposta durável é indicada pela taxa de resposta em aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 ou 24 meses após o início da terapia. Em algumas concretizações, a resposta é durável por mais de 3 meses ou mais de 6 meses.

[00840] Em algumas concretizações, a administração de uma dose ou composição de células produzidas pelos métodos aqui fornecidos reduz a sobrecarga da doença ou condição, por exemplo, número de

células tumorais, tamanho do tumor, duração da sobrevivência do paciente ou sobrevida livre de evento, em maior grau e/ou por um período de tempo maior em comparação com a redução que seria observada com um método comparável usando células geradas por um processo alternativo. Em algumas concretizações, a sobrecarga da doença ou condição no indivíduo é detectada, avaliada ou medida. A sobrecarga da doença pode ser detectada em alguns aspectos, detectando o número total de células associadas a doenças, por exemplo, células tumorais, no indivíduo, ou em um órgão, tecido ou fluido corporal do indivíduo, como sangue ou soro. Em alguns aspectos, é avaliada a sobrevivência do indivíduo, a sobrevivência dentro de um determinado período de tempo, a extensão da sobrevida, a presença ou a duração da sobrevida livre de eventos ou sem sintomas, ou sobrevida livre de recidiva. Em algumas concretizações, qualquer sintoma de uma doença ou condição é avaliado. Em algumas concretizações, a medida da sobrecarga de doença ou condição é especificada.

[00841] Em algumas concretizações, a taxa de sobrevida livre de eventos ou taxa de sobrevida geral do indivíduo é realçada pela administração de células produzidas a partir dos métodos especificados, por exemplo, os métodos descritos na Seção I, em comparação com a célula gerada por métodos alternativos. Por exemplo, em algumas concretizações, taxa ou probabilidade de sobrevida livre de eventos para indivíduos tratados pelos métodos aos 6 meses após a dose é mais que a ou cerca de 40%, mais que a ou cerca de 50%, mais que a, ou cerca de 60%, mais que a, ou cerca de 70%, mais que a, ou cerca de 80%, mais que a, ou cerca de 90%, ou mais que a, ou cerca de 95%. Em alguns aspectos, a taxa de sobrevivência global é mais que a ou cerca de 40%, mais que a ou cerca de 50%, mais que a ou cerca de 60%, mais que a ou cerca de 70%, mais que a ou cerca de 80%, mais que a ou cerca de 90%, mais que a ou cerca de 95%. Em algu-

mas concretizações, o indivíduo tratado como células produzido pelos métodos mostrados exibe sobrevida livre de eventos, sobrevida livre de recidiva ou sobrevida a menos de 6 meses ou menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 anos. Em algumas concretizações, o tempo para a progressão é melhorado, como o tempo para a progressão de mais que a ou a ou cerca de 6 meses, ou pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 anos.

[00842] Em algumas concretizações, após o tratamento pelo método, a probabilidade de recidiva é reduzida em comparação com outros métodos, por exemplo, métodos nos quais o indivíduo recebe uma terapia celular contendo células produzidas por métodos alternativos. Por exemplo, em algumas concretizações, a probabilidade de recidiva aos 6 meses após a primeira dose é menor que a ou cerca de 80%, menor que a ou cerca de 70%, menor que a ou cerca de 60%, menor que a ou cerca de 50%, menor que a ou cerca de 40%, menor que a ou cerca de 30%, menor que a ou cerca de 20%, ou menor que a ou cerca de 10 %.

C. Toxicidade

[00843] Em certas concretizações, células, por exemplo, células de saída, produzidas pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo, como descrito na Seção I, são administradas a um indivíduo, e o indivíduo é monitorado quanto a sinais ou sintomas de toxicidade.

[00844] Em certas concretizações, a dose ou composição de células, por exemplo, células de saída produzidas por métodos utilizados resulta em uma taxa mais baixa e/ou menor grau de toxicidade, resultado ou sintoma tóxico, perfil promotor de toxicidade, fator, ou propriedade, como um sintoma ou resultado associado ou indicativo de síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou neurotoxicidade, por exemplo, em comparação com a administração de uma terapia celular alternativa, como uma composição de células T CAR+ produzida por um

processo alternativo.

[00845] Em algumas concretizações, a administração de células produzidas por métodos descritos não resulta em uma alta taxa ou probabilidade de toxicidade ou resultados tóxicos, ou reduz a taxa ou probabilidade de toxicidade ou resultados tóxicos, como neurotoxicidade (NT), síndrome de liberação de citocinas (CRS), tal como em comparação com outras terapias celulares e/ou células produzidas por métodos alternativos. Em algumas concretizações, a administração das células, por exemplo, as células de saída, produzidas pelos métodos utilizados, resulta em, ou não aumenta o risco de NT grave (sNT), CRS grave (sCRS), síndrome de ativação de macrófagos, síndrome de lise tumoral, febre de pelo menos a ou cerca de 38 graus Celsius por três ou mais dias e um nível plasmático de PCR de pelo menos a ou cerca de 20 mg/dL. Em algumas concretizações, mais ou mais que cerca de 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% ou mais dos indivíduos tratados de acordo com os métodos aplicados não apresentam nenhum grau de CRS ou qualquer grau de neurotoxicidade. Em algumas concretizações, não mais de 50% dos indivíduos tratados (por exemplo, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou mais dos indivíduos tratados) exibem uma síndrome de liberação de citocinas (CRS) superior ao grau 2 e/ou uma neurotoxicidade superior ao grau 2. Em algumas concretizações, pelo menos 50% dos indivíduos tratados de acordo com o método (por exemplo, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou mais dos indivíduos tratados) não apresentam um resultado tóxico grave (por exemplo, CRS grave ou neurotoxicidade grave), como não exibem a neurotoxicidade grau 3 ou superior e/ou não exibem CRS grave, ou não portanto, dentro de um certo período de tempo após o tratamento, dentro de uma semana, duas semanas ou um mês após a administração das células. Em algumas concretizações, os parâmetros

avaliados para determinar certas toxicidades incluem eventos adversos (AEs), toxicidades limitantes de dose (DLTs), CRS e NT.

[00846] A administração de terapia de célula T adotiva, tratamento tal como com células T de expressão de receptores quiméricos de antígeno, pode induzir efeitos ou resultados tóxicos, como síndrome de liberação de citocinas e neurotoxicidade. Em alguns exemplos, esses efeitos ou resultados são paralelos aos altos níveis de citocinas circulantes, que podem estar subjacentes à toxicidade observada.

[00847] Em alguns aspectos, o resultado tóxico é ou está associado ou é indicativo de síndrome de liberação de citocinas (CRS) ou CRS grave (sCRS). A CRS, por exemplo, sCRS, pode ocorrer em alguns casos após a terapia e administração adotada de células T a indivíduos de outros produtos biológicos. Veja, Davila *et al.*, *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); Brentjens *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013); Grupp *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 368, 1509-1518 (2013); e Kochenderfer *et al.*, *Blood* 119, 2709-2720 (2012); Xu *et al.*, *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78.

[00848] Normalmente, a CRS é causada por uma resposta imune sistêmica exagerada mediada por, por exemplo, células T, células B, células NK, monócitos, e/ou macrófagos. Tais células podem liberar uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. As citocinas podem desencadear uma resposta inflamatória aguda e/ou induzir danos aos órgãos endoteliais, que podem resultar em vazamento microvascular, insuficiência cardíaca ou morte. A CRS grave e com risco de vida pode levar à infiltração pulmonar e lesão pulmonar, insuficiência renal ou coagulação intravascular disseminada. Outras toxicidades graves e com risco de vida podem incluir toxicidade cardíaca, dificuldade respiratória, toxicidade neurológica e/ou insuficiência hepática.

[00849] A CRS pode ser tratada usando terapia anti-inflamatória tal

como uma terapia anti-IL-6, por exemplo, anticorpo anti-IL-6, por exemplo, tocilizumabe, antibióticos ou outros agentes, conforme descrito. Resultados, sinais e sintomas da CRS são conhecidos e incluem os aqui descritos. Em algumas concretizações, em que um regime de dosagem ou administração em particular afeta ou não afeta um dado resultado, sinal ou sintoma associado a CRS, resultados, sinais e sintomas específicos e/ou quantidades ou graus iguais podem ser especificados.

[00850] No contexto da administração de células de expressão de CAR, a CRS geralmente ocorre 6 a 20 dias após a infusão de células de expressão de um CAR. Veja, Xu *et al.*, Cancer Letters 343 (2014) 172-78. Em alguns casos, a CRS ocorre menos de 6 dias ou mais de 20 dias após a infusão de células T CAR. A incidência e o momento da CRS podem estar relacionados aos níveis basais de citocinas ou carga tumoral no momento da infusão. Comumente, a CRS envolve níveis séricos elevados de interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , e/ou interleucina (IL)-2. Outras citocinas que podem ser rapidamente induzidas na CRS são IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10.

[00851] Resultados exemplares associados à CRS incluem febre, rigidez, calafrios, hipotensão, dispneia, síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA), encefalopatia, elevação de ALT/AST, insuficiência renal, distúrbios cardíacos, hipoxia, distúrbios neurológicos e morte. As complicações neurológicas incluem delírio, atividade convulsiva, confusão, dificuldade em encontrar palavras, afasia e/ou tornando-se obtundido. Outros resultados relacionados à CRS incluem fadiga, náusea, dor de cabeça, convulsão, taquicardia, mialgias, erupção cutânea, síndrome do derrame vascular agudo, comprometimento da função hepática e insuficiência renal. Em alguns aspectos, a CRS está associada a um aumento de um ou mais fatores como ferritina sérica, dímero-d, aminotransferases, lactato desidrogenase e triglicerídeos, ou

hipofibrinogenemia ou hepatoesplenomegalia.

[00852] Foram desenvolvidos critérios de CRS que parecem correlacionar-se com o início da CRS para prever quais pacientes têm maior risco de desenvolver sCRS (veja, Davilla *et al.* Science translational medicine. 2014; 6 (224): 224ra25). Os fatores incluem febre, hipoxia, hipotensão, alterações neurológicas, níveis séricos elevados de citocinas inflamatórias, um conjunto de sete citocinas (IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina e GM-CSF) cuja elevação induzida pelo tratamento pode se correlacionar bem com a carga tumoral pré-tratamento e com os sintomas de sCRS. Outras diretrizes sobre o diagnóstico e o manejo da CRS são conhecidas (veja, por exemplo, Lee *et al.*, Blood. 2014; 124 (2): 188-95). Em algumas concretizações, os critérios refletidos no grau de CRS são os detalhados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Critérios de Classificação Exemplares para CRS	
Grau	Descrição dos Sintomas
1 Brando	Não apresenta risco de vida, requer apenas tratamento sintomático, como antipiréticos e antieméticos (por exemplo, febre, náusea, fadiga, dor de cabeça, mialgias, mal-estar)
2 Moderado	Exigir e responder a intervenções moderadas: <ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de oxigênio <40%, ou • Hipotensão responsiva a fluidos ou baixa dose de um único vasopressor, ou • Toxicidade para órgãos de grau 2 (por CTCAE v4.0)

Tabela 2: Critérios de Classificação Exemplares para CRS	
Grau	Descrição dos Sintomas
3 Grave	Exigir e responder a intervenções agressivas: <ul style="list-style-type: none"> • Exigência de oxigênio $\geq 40\%$, ou • Hipotensão que requer alta dose de um único vasopressor (por exemplo, noradrenalina $\geq 20 \mu\text{g/kg/min}$, dopamina $\geq 10 \mu\text{g/kg/min}$, fenilefrina $\geq 200 \mu\text{g/kg/min}$, ou epinefrina $\geq 10 \mu\text{g/kg/min}$) ou • Hipotensão que requer múltiplos vasopressores (por exemplo, vasopressina + um dos agentes acima, ou vasopressores combinados equivalentes a $\geq 20 \mu\text{g/kg/min}$ de noradrenalina), ou • Toxicidade para órgãos grau 3 ou transaminite grau 4 (por CTCAE v4.0)
4 Com risco de vida	Com risco de vida: <ul style="list-style-type: none"> • Requisito para suporte do ventilador, ou • Toxicidade para órgãos grau 4 (excluindo transaminite)
5 Fatal	Morte

[00853] Em algumas concretizações, um critério que reflete o grau da CRS é o detalhado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3, Critérios de Classificação Exemplares para CRS				
Sintomas/Sinais	Grau 1 (Brando)	Grau 2 (Moderado)	Grau 3 (Grave)	Grau 4 (com risco de vida)
		O grau de SRC é definido pelo sintoma mais grave (excluindo febre)		
Temperatura $\geq 38,5^\circ\text{C}/101,3^\circ\text{F}$	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Qualquer
Pressão arterial sistólica ≤ 90 mm Hg	N/A	Responde a fluido ou único vasopressor em doses baixas	Precisa de doses elevadas ou múltiplos vasopressores	Com risco de vida

Tabela 3, Critérios de Classificação Exemplares para CRS				
Sintomas/Sinais	Grau 1 (Brando)	Grau 2 (Moderado)	Grau 3 (Grave)	Grau 4 (com risco de vida)
Necessidade de oxigênio para alcançar $SaO_2 > 90\%$	N/A	$FiO_2 < 40\%$	$FiO_2 \geq 40\%$	Precisa de suporte do ventilador
Toxicidade para órgãos	N/A	Grau 2	Grau 3 ou transaminita	Grau 4 (excluindo transaminita)

[00854] Em algumas concretizações, considera-se que um indivíduo desenvolve "CRS grave" ("sCRS") em resposta ou secundária à administração de uma terapia celular ou que a dose de células faz o mesmo, se, após a administração, o indivíduo exibir: (1) febre de pelo menos 38 graus Celsius por pelo menos três dias; (2) elevação de citocinas que inclui (a) uma mudança de duplicação máxima de pelo menos 75 para pelo menos dois do grupo de sete citocinas a seguir em comparação com o nível imediatamente após a administração: interferon gama ($IFN\gamma$), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina e IL-5 e/ou (b) uma mudança de duplicação máxima de pelo menos 250 para pelo menos um dos sete grupos de sete citocinas a seguir ao nível imediatamente após a administração: interferon gama ($IFN\gamma$), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina e IL-5; e (c) pelo menos um sinal clínico de toxicidade tal como hipotensão (exigindo pelo menos um pressor vasoativo intravenoso) ou hipoxia ($PO_2 < 90\%$) ou um ou mais distúrbios neurológicos (incluindo alterações do estado mental, obtundação e/ou convulsões). Em algumas concretizações, a CRS grave inclui uma CRS de grau 3 ou superior, conforme apresentado na Tabela 2 ou na Tabela 3.

[00855] Em algumas concretizações, os resultados associados a CRS grave ou CRS de grau 3 ou superior, como grau 4 ou superior, incluem um ou mais dos seguintes: febre persistente, por exemplo, fe-

bre de uma temperatura especificada, por exemplo, mais que a ou cerca de 38 graus Celsius, por dois ou mais, por exemplo, três ou mais, por exemplo, quatro ou mais dias ou por pelo menos três dias consecutivos; febre mais que a ou cerca de 38 graus Celsius; elevação de citocinas, como mudança de duplicação máxima, por exemplo, de pelo menos a ou cerca de 75, em comparação com os níveis de pré-tratamento de pelo menos duas citocinas (por exemplo, pelo menos dois do grupo que consiste em interferon gama (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, fractalquina e IL-5, e/ou fator de necrose tumoral alfa (TNF α)), ou uma mudança de duplicação máxima, por exemplo, de pelo menos a ou cerca de 250 de pelo menos uma dessas citocinas; e/ou pelo menos um sinal clínico de toxicidade, como hipotensão (por exemplo, medido por pelo menos um pressor vasoativo intravenoso); níveis de hipoxia (por exemplo, níveis plasmáticos de oxigênio (PO₂) menores que a ou cerca de 90%); e/ou um ou mais distúrbios neurológicos (incluindo alterações do estado mental, obtundação e convulsões). Em algumas concretizações, a CRS grave inclui a CRS que requer gerenciamento ou cuidados na unidade de terapia intensiva (UTI).

[00856] Em algumas concretizações, a CRS, como a CRS grave, engloba uma combinação de (1) febre persistente (febre de pelo menos 38 graus Celsius por pelo menos três dias) e (2) um nível sérico de PCR de pelo menos a ou cerca de 20 mg/dL. Em algumas concretizações, a CRS engloba hipotensão, exigindo o uso de dois ou mais vasopressores ou insuficiência respiratória, exigindo ventilação mecânica. Em algumas concretizações, a dosagem de vasopressores é aumentada em uma segunda administração ou subsequente.

[00857] Em algumas concretizações, a CRS grave ou a CRS de grau 3 engloba um aumento da alanina aminotransferase, um aumento da aspartato aminotransferase, calafrios, neutropenia febril, dor de cabeça, disfunção ventricular esquerda, encefalopatia, hidrocefalia e/ou

tremor.

[00858] O método de medir ou detectar os vários resultados pode ser especificado.

[00859] Em alguns aspectos, o resultado tóxico é ou está associado à neurotoxicidade. Em algumas concretizações, os sintomas associados a um risco clínico de neurotoxicidade incluem confusão, delírio, afasia expressiva, obtundação, mioclonia, letargia, estado mental alterado, convulsões, atividade convulsiva, convulsões (opcionalmente como confirmado pelo eletroencefalograma [EEG]), níveis elevados de beta amiloide ($A\beta$), níveis elevados de glutamato e níveis elevados de radicais de oxigênio. Em algumas concretizações, a neurotoxicidade é classificada com base na gravidade (por exemplo, usando uma escala de 1 a 5) (veja, por exemplo, Guido Cavaletti e Paola Marmioli Nature Reviews Neurology 6, 657-666 (dezembro de 2010); National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria versão 4.03 (NCI-CTCAE v4.03).

[00860] Em alguns casos, os sintomas neurológicos podem ser os primeiros sintomas da sCRS. Em algumas concretizações, os sintomas neurológicos são vistos iniciando 5 a 7 dias após a infusão da terapia celular. Em algumas concretizações, a duração das alterações neurológicas pode variar de 3 a 19 dias. Em alguns casos, a recuperação das alterações neurológicas ocorre após a resolução de outros sintomas da sCRS. Em algumas concretizações, o tempo ou o grau de resolução das alterações neurológicas não são apressados pelo tratamento com anti-IL-6 e/ou esteroide (s).

[00861] Em algumas concretizações, considera-se que um indivíduo desenvolve "neurotoxicidade grave" em resposta ou secundária à administração de uma terapia celular ou que a dose de células faz o mesmo, se, após a administração, o indivíduo exibir sintomas que limitam o autocuidado (por exemplo, tomar banho, vestir-se e despir-se, alimentar-se, usar o banheiro, tomar medicamentos) dentre: 1) sinto-

mas de neuropatia motora periférica, incluindo inflamação ou degeneração dos nervos motores periféricos; 2) sintomas de neuropatia sensorial periférica, incluindo inflamação ou degeneração dos nervos sensoriais periféricos, disestesia, distorção tal como da percepção sensorial, resultando em uma sensação anormal e desagradável, neuralgia, sensação dolorosa intensa como um nervo ou um grupo de nervos distúrbios funcionais dos neurônios sensoriais, resultando em sensações cutâneas anormais de formigamento, dormência, pressão, frio e calor na ausência de estímulo. Em algumas concretizações, a neurotoxicidade grave inclui neurotoxicidade com grau 3 ou superior, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Critérios de classificação exemplares para neurotoxicidade	
Grau	Descrição dos sintomas
1 Assintomático ou Brando	Sintomas brandos ou assintomáticos
2 Moderado	Presença de sintomas que limitam as atividades instrumentais da vida diária (AVD), como preparar refeições prévias, fazer compras de mercearias ou roupas, usar o telefone, gerenciar o dinheiro
3 Grave	Presença de sintomas que limitam as ADLs de autocuidado, como tomar banho, vestir-se e despir-se, alimentar-se, usar o banheiro, tomar medicações
4 Com risco de vida	Sintomas com risco de vida, que requerem intervenção urgente
5 Fatal	Morte

[00862] Em algumas concretizações, os métodos reduzem os sintomas associados à CRS ou neurotoxicidade em comparação com outros métodos. Em alguns aspectos, os métodos definidos reduzem sin-

tomas, resultados ou fatores associados à CRS, incluindo sintomas, resultados ou fatores associados à CRS grave ou CRS de grau 3 ou superior, em comparação com outros métodos. Por exemplo, indivíduos tratados de acordo com os métodos presentes podem não ter sintomas detectáveis, resultados ou fatores de CRS, por exemplo, CRS grave ou CRS de grau 3 ou superior, como descrito, por exemplo, apresentado na Tabela 2 ou Tabela 3. Em algumas concretizações, os indivíduos tratados de acordo com os métodos atuais podem ter sintomas reduzidos de neurotoxicidade, fraqueza ou dormência nos membros, perda de memória, visão, e/ou intelecto, comportamentos obsessivos incontroláveis e/ou compulsivos, delírios, dor de cabeça, problemas cognitivos e comportamentais, incluindo perda de controle motor, deterioração cognitiva e disfunção autonômica do sistema nervoso e disfunção sexual, em comparação com indivíduos tratados por outros métodos. Em algumas concretizações, indivíduos tratados de acordo com os métodos presentes podem ter sintomas reduzidos associados a neuropatia motora periférica, neuropatia sensorial periférica, disetesia, neuralgia ou parestesia.

[00863] Em algumas concretizações, as células de administração produzidas por nossos métodos reduzem os resultados associados à neurotoxicidade, incluindo danos ao sistema nervoso e/ou ao cérebro, como a morte de neurônios. Em alguns aspectos, os métodos reduzem o nível de fatores associados à neurotoxicidade tal como beta amiloide ($A\beta$), glutamato e radicais de oxigênio.

[00864] Em algumas concretizações, uma ou mais intervenções ou agentes para o tratamento da toxicidade, como terapias de direcionamento de toxicidade, são administrados em um momento no qual ou imediatamente após o qual o indivíduo é determinado ou confirmado para (como é primeiro determinado ou confirmado para) exibir febre prolongada, por exemplo, conforme medido de acordo com qualquer

uma das concretizações mencionadas acima. Em algumas concretizações, as uma ou mais terapias de direcionamento de toxicidade são administradas dentro de um certo período de tempo de tal confirmação ou determinação, dentro de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, ou 8 horas do mesmo.

V. COMPOSIÇÕES E FORMULAÇÕES

[00865] Também são fornecidas composições e formulações contendo células manipuladas que expressam um receptor recombinante produzido pelos métodos aqui fornecidos. Em algumas concretizações, as composições e formulações contêm células, como uma composição ou dose de células, produzidas pelos métodos aqui descritos, como na Seção I. Em algumas concretizações, as composições e formulações são ou contêm composições de saída de células, e opcionalmente instruções de uso, por exemplo, instruções para administrar as células manipuladas a um indivíduo, como pelos métodos aqui descritos, como na Seção III.

[00866] Em algumas concretizações, a dose de células que compreende células manipuladas com um receptor de antígeno recombinante, por exemplo, CAR ou TCR, é fornecida como uma composição ou formulação, tal como, uma composição ou formulação farmacêutica. Em certas concretizações, a dose contém células de uma composição de saída aqui descrita, tal como na Seção I-G. Em concretizações particulares, a dose contém células que foram produzidas por um método aqui descrito, por exemplo, na Seção I. Essas composições podem ser usadas de acordo com os métodos estabelecidos, e/ou os artigos de fabricação ou composições fornecidos, tal como, na prevenção ou tratamento de doenças, condições e distúrbios, ou nos métodos de detecção, diagnóstico e prognóstico.

[00867] O termo "formulação farmacêutica" refere-se a uma preparação que é capaz de permitir a atividade biológica de um ingrediente

ativo nela contido ser eficaz, e que não contém componentes adicionais que sejam inaceitavelmente tóxicos para um indivíduo ao qual a formulação seria administrada.

[00868] Um "veículo farmacologicamente aceitável" refere-se a um ingrediente em uma formulação farmacêutica, que não seja um ingrediente ativo, que não é tóxico para um indivíduo. Um veículo farmacologicamente aceitável inclui, porém não é limitado a, um tampão, excipiente, estabilizador ou conservante.

[00869] Em alguns aspectos, a escolha do veículo é determinada em parte pela célula ou agente específico e/ou pelo método de administração. Por conseguinte, existe uma variedade de formulações adequadas. Por exemplo, a composição farmacêutica pode conter conservantes. Conservantes adequados podem incluir, por exemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sódio e cloreto de benzalcônio. Em alguns aspectos, é usada uma mistura de dois ou mais conservantes. O conservante ou as misturas do mesmo estão tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 2% em peso da composição total. Os veículos são descritos, por exemplo, pela *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980). Os veículos farmacologicamente aceitáveis geralmente não são tóxicos para os receptores nas doses e concentrações empregadas, e incluem, porém, não são limitados a: tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como, cloreto de octadecildimetilbenzilamônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos, tal como, metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como, albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tal como, polivinilpir-

rolidona; aminoácidos, tais como, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tal como, EDTA; açúcares, tais como, sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal, tal como, sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou tensoativos não iônicos como polietileno glicol (PEG).

[00870] Agentes de tamponamento, em alguns aspectos, estão incluídos nas composições. Os agentes de tamponamento adequados incluem, por exemplo, ácido cítrico, citrato de sódio, ácido fosfórico, fosfato de potássio e vários outros ácidos e sais. Em alguns aspectos, é usada uma mistura de dois ou mais agentes de tamponamento. O agente de tamponamento ou misturas do mesmo estão tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 4% em peso da composição total. São conhecidos métodos para preparar composições farmacêuticas administráveis. Métodos exemplares são descritos com mais detalhes em, por exemplo, *Remington: The Science and Practice de Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de maio de 2005).

[00871] A formulação ou composição também pode conter mais de um ingrediente ativo útil para a indicação específica, doença ou condição a ser prevenida ou tratada com células ou agentes, onde as atividades respectivas não afetam adversamente uma à outra. Tais ingredientes ativos estão adequadamente presentes em combinação em quantidades eficazes para a finalidade pretendida. Assim, em algumas concretizações, a composição farmacêutica inclui ainda outros agentes ou fármacos farmacêuticamente ativos, tais como, quimioterápicos, por exemplo, asparaginase, bussulfano, carboplatina, cisplatina, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracila, gencitabina, hidroxureia, metotrexato, paclitaxel, rituximabe, vinblastina, vincristina, etc. Em algumas

concretizações, os agentes ou células são administrados na forma de um sal, por exemplo, um sal farmacologicamente aceitável. Sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis adequados incluem aqueles derivados de ácidos minerais, tais como, ácidos hidrocloreto, hidrobromato, fosfórico, metafosfórico, nítrico e sulfúrico e ácidos orgânicos, tais como, ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzóico, glicólico, glucônico, succínico e arilsulfônico, por exemplo, ácido p-toluenossulfônico.

[00872] A composição farmacêutica em algumas concretizações contém agentes ou células em quantidades eficazes para tratar ou prevenir a doença ou condição, tal como, uma quantidade terapêuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz. A eficácia terapêutica ou profilática em algumas concretizações é monitorada por avaliação periódica dos indivíduos tratados. Para administrações repetidas por vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até ocorrer a supressão desejada dos sintomas da doença. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis e podem ser determinados. A dosagem desejada pode ser liberada por uma única administração em bolus da composição, por múltiplas administrações em bolus da composição ou por administração de infusão contínua da composição.

[00873] Os agentes ou células podem ser administrados por qualquer meio adequado, por exemplo, por infusão em bolus, por injeção, por exemplo, injeções intravenosas ou subcutâneas, injeção intraocular, injeção periocular, injeção subretiniana, injeção intravítrea, injeção trans-septal, injeção subscleral, injeção intracoroide, injeção intracamerar, injeção subconjugal, injeção subconjugal, injeção sub Tenon, injeção retrobulbar, injeção peribulbar ou liberação justa-escleral posterior. Em algumas concretizações, são administrados por administração parenteral, intrapulmonar e intranasal e, se desejado para o trata-

mento local, administração intralesional. Infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Em algumas concretizações, uma dada dose é administrada por uma única administração em bolus das células ou agente. Em algumas concretizações, é administrada por várias administrações de bolus de células ou agente, por exemplo, durante um período não superior a 3 dias, ou por administração de infusão contínua de células ou agente.

[00874] Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada pode depender do tipo de doença a ser tratada, do tipo de agente ou agentes, do tipo de células ou receptores recombinantes, da gravidade e do curso da doença, se o agente ou células são administrados para fins preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, histórico clínico do paciente e resposta ao agente ou às células, e o critério do médico assistente. As composições são em algumas concretizações adequadamente administradas ao indivíduo ao mesmo tempo ou durante uma série de tratamentos.

[00875] As células ou agentes podem ser administrados usando técnicas de administração padrão, formulações e/ou dispositivos. São fornecidas formulações e dispositivos, tais como, seringas e frascos, para armazenamento e administração das composições. No que diz respeito às células, a administração pode ser autóloga ou heteróloga. Por exemplo, células ou progenitores imunorresponsivos podem ser obtidos de um indivíduo e administrados ao mesmo indivíduo ou a um indivíduo compatível diferente. As células imunorresponsivas derivadas de sangue periférico ou sua progênie (por exemplo, *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*) podem ser administradas por injeção localizada, incluindo administração de cateter, injeção sistêmica, injeção localizada, injeção intravenosa ou administração parenteral. Ao administrar uma composição terapêutica (por exemplo, uma composição farmacêutica contendo

uma célula imunorresponsiva geneticamente modificada ou um agente que trate ou melhore os sintomas de neurotoxicidade), ela geralmente será formulada em uma forma injetável de dosagem unitária (solução, suspensão, emulsão).

[00876] Formulações incluem aquelas para administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual ou supositória. Em algumas concretizações, as populações de agentes ou células são administradas parentericamente. O termo "parenteral", como usado aqui, inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, retal, vaginal e intraperitoneal. Em algumas concretizações, as populações de agentes ou células são administradas a um indivíduo usando liberação sistêmica periférica por injeção intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea.

[00877] As composições em algumas concretizações são fornecidas como preparações líquidas estéreis, por exemplo, soluções aquosas isotônicas, suspensões, emulsões, dispersões ou composições viscosas, que em alguns aspectos podem ser tamponadas para um pH selecionado. As preparações líquidas são normalmente mais fáceis de preparar do que os géis, outras composições viscosas e composições sólidas. Além disso, as composições líquidas são um pouco mais convenientes para administrar, especialmente por injeção. As composições viscosas, por outro lado, podem ser formuladas dentro da faixa de viscosidade apropriada para fornecer períodos de contato mais longos com tecidos específicos. As composições líquidas ou viscosas podem compreender veículos, que podem ser um solvente ou meio dispersante contendo, por exemplo, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido) e misturas adequadas dos mesmos.

[00878] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas in-

corporando o agente ou as células em um solvente, tal como, em mistura com um veículo adequado, diluente ou excipiente, como água esteril, solução salina fisiológica, glicose, dextrose ou similares.

[00879] As formulações a serem usadas para administração *in vivo* são geralmente estéreis. A esterilidade pode ser facilmente realizada, por exemplo, por filtração através de membranas de filtração estéreis.

VI. ARTIGOS DE FABRICAÇÃO E KITS

[00880] Também fornecidos são artigos de fabricação e *kits* contendo células modificadas expressando um receptor recombinante produzido pelos métodos fornecidos aqui. Em algumas concretizações, os artigos de fabricação contêm células, tal como, uma composição ou dose de células, produzida por métodos descritos aqui, tal como na Seção I. Em algumas concretizações, os *kits* e/ou artigos de fabricação são ou contêm composições de saída de células, e opcionalmente instruções para uso, por exemplo, instruções para administrar as células modificadas a um indivíduo, tal como, por métodos descritos aqui, tal como na Seção III.

[00881] Em algumas concretizações, fornecidos aqui são artigos de fabricação e/ou *kits* que incluem uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de quaisquer das células modificadas descritas aqui, e instruções para administrar, a um indivíduo para tratar uma doença ou condição. Em algumas concretizações, as instruções podem especificar alguns ou todos os elementos dos métodos para administrar as células que são fornecidas aqui. Em algumas concretizações, as instruções especificam instruções particulares para administração das células para terapia celular, por exemplo, doses, esquema de horários, seleção e/ou identificação de indivíduos para administração e condições para administração. Em algumas concretizações, os artigos de fabricação e/ou *kits* também compreendem um agente para terapia de linfodepleção, e opcionalmente também in-

cluem instruções para administrar a terapia de linfodepleção. Em algumas concretizações, as instruções podem ser incluídas como um rótulo ou folheto informativo acompanhando as composições para administração.

[00882] Em algumas concretizações, o artigo de fabricação pode ter um recipiente, opcionalmente um frasco, contendo uma composição contendo células T CD4+ e CD8+ expressando um receptor recombinante. Em algumas concretizações, o artigo de fabricação ou *kit* contém uma composição de células com uma relação entre 3:1 e 1:3, entre 2,5:1 e 1:2,5, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,4:1 e 1:1,4, entre 1,3:1 e 1:1,3, entre 1,2:1 e 1:1,2, ou entre 1,1:1 e 1:1,1 de células T CD4+ T para células T CD8+. Em algumas concretizações, a composição de células tem uma relação de, ou de cerca de 3:1, 2,8:1, 2,5:1, 2,25:1, 2:1, 1,8:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1,1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,8, 1:2, 1:2,25, 1:2,5, 1:2,8, 1:3 de células T CD4+ para células T CD8+. Em concretizações particulares, o artigo de fabricação ou *kit* contém uma composição de células com uma relação entre 3:1 e 1:3, entre 2,5:1 e 1:2,5, entre 2:1 e 1:2, entre 1,5:1 e 1:1,5, entre 1,4:1 e 1:1,4, entre 1,3:1 e 1:1,3, entre 1,2:1 e 1:1,2, ou entre 1,1:1 e 1:1,1 de células T CD4+ que expressa o receptor recombinante, por exemplo, o CAR, para células CD8+ T que expressa o receptor recombinante, por exemplo, o CAR. Em algumas concretizações, a composição de células tem uma relação de, ou de cerca de 3:1, 2,8:1, 2,5:1, 2,25:1, 2:1, 1,8:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1,1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,8, 1:2, 1:2,25, 1:2,5, 1:2,8, 1:3 de células T CD4+ que expressa o receptor recombinante, por exemplo, o CAR, para células T CD8+ que expressam o receptor recombinante, por exemplo, o CAR.

[00883] Em algumas concretizações, as instruções especificam a dose de células a ser administrada. Por exemplo, em algumas concre-

tizações, a dose especificada nas instruções incluem células expressando receptor recombinante total (por exemplo, CAR) entre, ou de cerca de 1×10^6 e a, ou cerca de 3×10^8 , por exemplo, na faixa de a, ou cerca de 1×10^7 a de ou cerca de 2×10^8 tais células, tal como a, ou cerca de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 ou $1,5 \times 10^8$ total de tais células, ou a faixa entre quaisquer dois dos valores anteriores. Em algumas concretizações, ao paciente são administradas múltiplas doses, e cada das doses ou a dose total pode estar dentro de quaisquer dos valores anteriores.

[00884] Em algumas concretizações, o recipiente, tal como, o frasco compreende mais que ou mais que a, ou cerca de 10×10^6 de células T ou células T expressando receptor recombinante, mais que ou mais que a, ou cerca de 15×10^6 células T ou células T expressando receptor recombinante, mais que ou mais que a, ou cerca de 25×10^6 células T ou célula T expressando receptor recombinante. Em alguns aspectos, o frasco compreende entre a, ou cerca de 10 milhões de células por mL e a, ou cerca de 70 milhões de células por mL, entre, ou de cerca de 10 milhões de células por mL e a, ou cerca de 50 milhões de células por mL, entre, ou de cerca de 10 milhões de células por mL e a, ou cerca de 25 milhões de células por mL, entre, ou de cerca de 10 milhões de células por mL e a, ou cerca de 15 milhões de células por mL, 15 milhões de células por mL e a, ou cerca de 70 milhões de células por mL, entre, ou de cerca de 15 milhões de células por mL e a, ou cerca de 50 milhões de células por mL, entre, ou de cerca de 15 milhões de células por mL e a, ou cerca de 25 milhões de células por mL, entre, ou de cerca de 25 milhões de células por mL e a, ou cerca de 70 milhões de células por mL, entre, ou de cerca de 25 milhões de células por mL e a, ou cerca de 50 milhões de células por mL, e entre, ou de cerca de 50 milhões de células por mL e a, ou cerca de 70 milhões de células por mL.

[00885] Em algumas concretizações, a pluralidade de frascos ou pluralidade de células ou dose unitária de células específica para administração, coletivamente, compreende uma dose de células compreendendo de ou de cerca de 1×10^5 a ou a cerca de 5×10^8 de célula T total expressando receptores recombinantes ou células T totais, 1×10^5 a ou a cerca de 1×10^9 célula T total expressando receptores recombinantes ou células T totais, de ou de cerca de 5×10^5 a ou a cerca de 1×10^9 célula T total expressando receptores recombinantes ou células T totais, ou de ou de cerca de 1×10^6 a ou a cerca de 1×10^{10} célula T total expressando receptores recombinantes ou células T totais, cada inclusiva. Em alguns aspectos, o artigo compreende uma ou mais dose unitária das células T CD4+ e CD8+ ou das células T CD4+receptor+ e células T CD8+receptor+, em que a dose unitária compreende entre a, ou cerca de 1×10^7 e a, ou cerca de 2×10^8 células T expressando receptor recombinante, entre, ou de cerca de 5×10^7 e a, ou cerca de $1,5 \times 10^8$ células T expressando receptor recombinante, a, ou cerca de 5×10^7 células T expressando receptor recombinante, a, ou cerca de 1×10^8 células T expressando receptor recombinante, ou a, ou a cerca de $1,5 \times 10^8$ células T expressando receptor recombinante, opcionalmente em que a informação no artigo especifica a administração de uma ou de uma pluralidade de doses unitárias e/ou um volume correspondendo tal uma ou pluralidade de doses unitárias.

[00886] Em algumas concretizações, as instruções podem especificar regime de dosagem e esquema de horários da administração. Por exemplo, em algumas concretizações, as instruções podem especificar administrar ao indivíduo múltiplas doses, por exemplo, duas ou mais doses, das células. Em algumas concretizações, as instruções especificam o esquema de horários das múltiplas doses, por exemplo, a segunda dose sendo administrada aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 dias após a primeira dose; e/ou a quantidade de dosagem em cada dose.

[00887] Em algumas concretizações, as instruções especificam a dose ou número de células ou tipo(s) de célula e/ou uma relação de tipos celulares, por exemplo, populações individuais ou subtipos, tal como, a relação CD4+ para CD8+. Em algumas concretizações, as populações ou subtipos de células, tais como, células T CD8⁺ e CD4⁺. Por exemplo, em algumas concretizações, as instruções especificam que as células são administradas em ou dentro de uma faixa tolerada de uma relação de saída de populações de célula múltiplas ou subtipos, tais como, células T CD4⁺ e CD8⁺ ou subtipos, entre a, ou cerca de 5:1 e a, ou cerca de 5:1 (ou mais que cerca de 1:5 e menos que cerca de 5:1), ou entre, ou de cerca de 1:3 e a, ou cerca de 3:1 (ou mais que cerca de 1:3 e menos que cerca de 3:1), tal como entre, ou de cerca de 2:1 e a, ou cerca de 1:5 (ou mais que cerca de 1:5 e menos que cerca de 2:1, tal como a, ou cerca de 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1,5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5, ou 1:5. Em certas concretizações, as instruções especificam que as composições de células T CD4⁺ enriquecidas e células T CD8⁺ enriquecidas são combinadas na relação desejada e administradas ao indivíduo como uma composição de célula única. Em concretizações particulares, as instruções que especificam as composições de células T CD4⁺ enriquecidas e células T CD8⁺ enriquecidas são administradas como composições separadas na relação desejada. Em alguns aspectos, a diferença tolerada está dentro de cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4% cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50% da relação desejada, incluindo qualquer valor entre estas faixas.

VII. DEFINIÇÕES

[00888] A menos que definido de outro modo, todos os termos da técnica, notações e outros termos ou terminologia técnica e científica usados aqui têm o mesmo significado que é comumente entendido por alguém versado na técnica a que o assunto reivindicado pertence. Em alguns casos, os termos com significados comumente entendidos são definidos aqui para maior clareza e/ou para pronta referência, e a inclusão de tais definições aqui não deve necessariamente ser interpretada como representando uma diferença substancial em relação ao que geralmente é entendido na técnica.

[00889] Como usadas aqui, as formas singulares "um, uma(a)", "um, uma(an)" e "o, a" incluem referências plurais, a menos que o contexto indique de outro modo. Por exemplo, "um, uma(a)" ou "um, uma(an)" significa "pelo menos um" ou "um ou mais". Entende-se que aspectos e variações descritos aqui incluem "consistindo" e/ou "consistindo essencialmente em" aspectos e variações.

[00890] Ao longo desta invenção, vários aspectos do assunto reivindicado são apresentados em um formato de faixa. Deve-se entender que a descrição no formato de faixa é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo do objeto reivindicado. Por conseguinte, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo especificamente descritos todas as subfaixas possíveis, bem como, valores numéricos individuais dentro dessa faixa. Por exemplo, quando uma faixa de valores é fornecida, entende-se que cada valor intermediário, entre o limite superior e inferior dessa faixa e qualquer outro valor declarado ou interveniente nessa faixa estabelecida, é abrangido pelo objeto reivindicado. Os limites superior e inferior dessas faixas menores podem ser incluídos independentemente nas faixas menores, e também estão incluídas no objeto reivindicado, sujeitos a qualquer limite excluído es-

pecificamente na faixa estabelecida. Quando a faixa estabelecida inclui um ou ambos os limites, as faixas excluindo um ou ambos os limites são incluídos no assunto reivindicado. Isso se aplica independentemente da amplitude da faixa.

[00891] O termo "cerca de" como usado aqui refere-se à faixa de erro usual para o respectivo valor prontamente conhecido pela pessoa versada neste campo técnico. A referência a "cerca de" um valor ou parâmetro aqui inclui (e descreve) concretizações que são direcionadas a esse valor ou parâmetro *per se*. Por exemplo, a descrição referente a "cerca de X" inclui a descrição de "X".

[00892] Como usado aqui, recitação de que as posições de nucleotídeos ou aminoácidos "correspondem a" posições de nucleotídeos ou aminoácidos em uma sequência descrita, tal como estabelecido na listagem de sequências, refere-se a posições de nucleotídeos ou aminoácidos identificadas após alinhamento com a sequência descrita para maximizar a identidade usando um algoritmo de alinhamento padrão, como o algoritmo GAP. Alinhando as sequências, alguém versado na técnica pode identificar resíduos correspondentes, por exemplo, usando resíduos de aminoácidos conservados e idênticos como guias. Em geral, para identificar posições correspondentes, as sequências de aminoácidos são alinhadas para que seja obtida a correspondência de ordem mais alta (veja, por exemplo: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nova Iorque, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M., e Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; e *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nova Iorque, 1991; Carrillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073).

[00893] O termo "vetor", como usado aqui, refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de propagar outro ácido nucleico ao qual está ligado. O termo inclui o vetor como uma estrutura de ácido nucleico auto-replicante, bem como, o vetor incorporado no genoma de uma célula hospedeira na qual foi introduzido. Certos vetores são capazes de direcionar a expressão de ácidos nucleicos aos quais eles estão operacionalmente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão". Entre os vetores estão vetores virais, tais como, retrovirais, por exemplo, vetores gammaretroviral e lentiviral.

[00894] Os termos "célula hospedeira", "linhagem celular hospedeira" e "cultura de células hospedeiras" são usados de forma intercambiável e referem-se a células nas quais o ácido nucleico exógeno foi introduzido, incluindo a progênie de tais células. As células hospedeiras incluem "transformantes" e "células transformadas", que incluem a célula primária transformada e a progênie derivadas delas, independentemente do número de passagens. A progênie pode não ser completamente idêntica no conteúdo de ácido nucleico a uma célula origem, mas pode conter mutações. A progênie mutante que tem a mesma função ou atividade biológica como rastreada ou selecionada para a célula originalmente transformada está incluída aqui.

[00895] Como usado aqui, uma declaração de que uma célula ou população de células é "positiva" para um marcador em particular refere-se à presença detectável em ou na célula de um marcador em particular tipicamente um marcador de superfície. Ao se referir a um marcador de superfície, o termo refere-se à presença de expressão de superfície como detectado por citometria de fluxo, por exemplo, manchando com um anticorpo que especificamente se liga ao marcador e detectando o referido anticorpo, em que o manchamento é detectável por citometria de fluxo a um nível substancialmente acima do manchamento detectado, realizando o mesmo procedimento com um con-

trole compatível com isotipo sob condições idênticas e/ou a um nível substancialmente similar ao da célula conhecida como positiva para o marcador, e/ou a uma nível substancialmente mais alto que o de uma célula conhecida como negativa para o marcador.

[00896] Como usado aqui, uma declaração de que uma célula ou população de células é "negativa" para um marcador em particular refere-se à ausência de presença detectável substancial em ou na célula de um marcador em particular, tipicamente um marcador de superfície. Ao se referir a um marcador de superfície, o termo refere-se à ausência de expressão de superfície como detectado por citometria de fluxo, por exemplo, por manchamento com anticorpo que especificamente se liga ao marcador e detecção do referido anticorpo, em que o manchamento não é detectado por citometria de fluxo em um nível substancialmente acima do manchamento detectado, realizando o mesmo procedimento com um controle compatível com isotipo sob condições idênticas, e/ou em um nível substancialmente mais baixo do que o da célula conhecida como positiva para o marcador, e/ou a um nível substancialmente similar quando comparado ao de uma célula conhecida como negativa para o marcador.

[00897] Como usado aqui, "porcentagem (%)" de identidade de sequência de aminoácidos" e "porcentagem de identidade" quando usados em relação a uma sequência de aminoácidos (sequência de polipeptídeo de referência) são definidos como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata (por exemplo, o anticorpo ou fragmento em questão) que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência polipeptídica de referência, depois de alinhar as sequências e introduzir lacunas, se necessário, para atingir a identidade percentual máxima da sequência, sem considerar substituições conservadoras como parte da identidade de sequência. O alinhamento para fins de determinação da porcentagem de identidade de

sequência de aminoácidos pode ser alcançado de várias maneiras que estão dentro do versado na técnica, por exemplo, usando *software* de computador disponível publicamente, como os *softwares* BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Aqueles versados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para o alinhamento de sequências, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências sendo comparadas.

[00898] Uma substituição de aminoácido pode incluir substituição de um aminoácido em um polipeptídeo por outro aminoácido. A substituição pode ser uma substituição conservadora de aminoácidos ou uma substituição não conservadora de aminoácidos. As substituições de aminoácidos podem ser introduzidas em uma molécula de ligação, por exemplo, anticorpo, de interesse e os produtos pesquisados quanto a uma atividade desejada, por exemplo, ligação de antígeno retida/aprimorada, imunogenicidade reduzida ou ADCC ou CDC aprimorado.

[00899] Os aminoácidos geralmente podem ser agrupados de acordo com as seguintes propriedades comuns da cadeia lateral:

- (1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

[00900] Em algumas concretizações, as substituições conservadoras podem envolver a permuta de um membro de uma dessas classes por outro membro da mesma classe. Em algumas concretizações, as substituições de aminoácidos não conservadoras podem envolver a

permuta de um membro de uma dessas classes por outra classe.

[00901] Como usado aqui, uma composição refere-se a qualquer mistura de dois ou mais produtos, substâncias ou compostos, incluindo células. Pode ser uma solução, uma suspensão, líquido, pó, uma pasta, aquosa, não aquosa ou qualquer combinação dos mesmos.

[00902] Como usado aqui, um "indivíduo" é um mamífero, tal como, um humano ou outro animal, e normalmente é humano.

[00903] A menos que definido de outro modo, todos os termos de técnica, notações e outros termos ou terminologia técnica e científica usados aqui são destinados a ter o mesmo significado que é comumente entendido por alguém versado na técnica ao qual o assunto reivindicado pertence. Em alguns casos, os termos com significados comumente entendidos são definidos aqui para maior clareza e/ou para pronta referência, e a inclusão de tais definições aqui não deve necessariamente ser interpretada como representando uma diferença substancial em relação ao que geralmente é entendido na técnica.

VIII. CONCRETIZAÇÕES EXEMPLARES

[00904] Entre as concretizações fornecidas estão:

[00905] 1. Um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo:

[00906] (a) combinar uma composição de células T CD4+ e uma composição de células T CD8+ em uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, desse modo gerando uma composição de entrada;

[00907] (b) incubar a composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada; em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma

ou mais moléculas coestimulatórias;

[00908] e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL.

[00909] 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as células CD4+ e CD8+ na composição de entrada são enriquecidas ou selecionadas de uma amostra primária de um indivíduo, opcionalmente em que as células CD4+ e CD8+ na composição de entrada são separadamente enriquecidas ou selecionadas de uma amostra primária de um indivíduo.

[00910] 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a composição de células T CD4+ compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células T CD4+.

[00911] 4. O método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a composição de células T CD8+ compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% células T CD8+.

[00912] 5. Um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que:

[00913] a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e

[00914] as condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias.

- [00915] 6. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a incubação é realizada em meio livre de soro.
- [00916] 7. Os métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a composição de entrada compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células que são células T CD4+ ou células T CD8+.
- [00917] 8. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a composição de entrada compreende entre 100×10^6 e 500×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais.
- [00918] 9. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a composição de entrada compreende a, ou cerca de 300×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais.
- [00919] 10. O método de acordo com a reivindicação 9, em que o total de células T CD4+ e CD8+ são células viáveis.
- [00920] 11. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a composição de entrada compreende uma concentração entre 1×10^6 células/mL e 5×10^6 células/mL.
- [00921] 12. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a composição de entrada compreende uma concentração de, ou de cerca de 3×10^6 células/mL.
- [00922] 13. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a composição de entrada compreende uma relação entre 1,5:1 e 1:1,5 células CD4+ para CD8+.
- [00923] 14. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que a composição de entrada compreende uma relação entre 1,2:1 e 0,8:1 células CD4+ para CD8+.
- [00924] 15. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que a composição de entrada compreende uma relação de, ou de cerca de 1:1 células CD4+ para CD8+.
- [00925] 16. O método de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 1 a 15, em que a composição de entrada compreende CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD45RA e CCR7.

[00926] 17. O método de acordo com a reivindicação 16, em que a relação de células CD4+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 é de, ou é de cerca de 1.1:1.

[00927] 18. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7.

[00928] 19. O método de acordo com a reivindicação 18, em que a relação das células CD4+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD27 e CCR7 é de, ou é de cerca de 1.69:1.

[00929] 20. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, em que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CCR7 e superfície negativa para CD62L, opcionalmente em uma relação entre 2,0:1 a 1,5:1.

[00930] 21. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, também compreende:

[00931] introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[00932] 22. O método de acordo com a reivindicação 21, em que:

[00933] o contato é por transfecção com um vetor, em que o vetor é um transposon, opcionalmente um transposon *Sleeping Beauty* (SB) ou um transposon *Piggybac*; ou

[00934] o contato é por transdução com um vetor viral.

[00935] 23. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, também compreende:

[00936] introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[00937] 24. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, em que a introdução é realizada em meio livre de soro.

[00938] 25. O método de quaisquer de concretizações 21-24, em que, para a introdução da composição estimulada compreende menos que 300×10^6 células.

[00939] 26. O método de quaisquer de concretizações 21-25, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende entre 50×10^6 células e 200×10^6 células.

[00940] 27. O método de quaisquer de concretizações 21-26, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende a, ou cerca de 100×10^6 células.

[00941] 28. O método de quaisquer de concretizações 21-27, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração menor que 3×10^6 células/mL.

[00942] 29. O método de quaisquer de concretizações 21-28, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração entre $0,5 \times 10^6$ células/mL e 2×10^6 células/mL.

[00943] 30. O método de quaisquer de concretizações 21-29, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração de, ou de cerca de 1×10^6 células/mL.

[00944] 31. O método de quaisquer de concretizações 21-30, compreende ajustar uma composição da composição estimulada após incubação sob condições de estimulação antes de introduzir o receptor

recombinante nas células da composição estimulada.

[00945] 32. O método de quaisquer de concretizações 21-32, em que as células da composição estimulada são células viáveis.

[00946] 33. Um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreende introduzir um receptor recombinante em células de uma composição de célula T, a referida composição de célula T compreendendo uma concentração de pelo menos ou cerca de pelo menos 1×10^6 células viáveis por mL, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% das células da composição celular T são células T CD4+ ou células T CD8+.

[00947] 34. O método de concretização 33, em que a concentração da composição de célula T é menor que 5×10^6 células viáveis por mL.

[00948] 35. O método de quaisquer de concretizações 33 ou 34, em que a composição de célula T compreende pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de 100×10^6 células viáveis.

[00949] 36. O método de quaisquer de concretizações 33 a 35, em que a composição de célula T compreende menos que 300×10^6 células viáveis.

[00950] 37. O método de quaisquer de concretizações 33 a 36, em que a introdução compreende contatar as células T por transdução de um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[00951] 38. O método de quaisquer de concretizações 33 a 37, em que a introdução é realizada em meio livre de soro.

[00952] 39. O método de quaisquer de concretizações 33 a 38, em que uma ou mais células da composição celular T são ativadas e/ou compreendem expressão de superfície do receptor LDL.

[00953] 40. O método de quaisquer de concretizações 33 a 39, em que pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos

40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% das células da composição celular:

[00954] (i) expressam um marcador de superfície selecionado do grupo que consiste em HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L e 4-1BB;

[00955] (ii) compreendem expressão intracelular de uma citocina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IFN-gama, TNF-alfa;

[00956] (iii) estão na fase G1 ou posterior do ciclo celular; e/ou

[00957] (iv) são capazes de se proliferarem.

[00958] 41. O método de quaisquer de concretizações 33 a 40, em que antes da introdução, as células da composição foram geradas por um processo compreendendo incubar uma composição de entrada compreendendo células T CD4+ e CD8+ sob condições de estimulação, em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias.

[00959] 42. O método de concretização 41, em que a incubação foi realizada em meio livre de soro.

[00960] 43. Um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo:

[00961] (a) incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que:

[00962] a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+ e compreende pelo menos 100×10^6 células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e

[00963] as condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de

sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias; e

[00964] (b) introduzir um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[00965] 44. O método de quaisquer de concretizações 43, em que a incubação e/ou a introdução é realizada em meio livre de soro.

[00966] 45. O método de quaisquer de concretizações 43 ou 44, em que as células T CD4+ e CD8+ são células viáveis.

[00967] 46. O método de quaisquer de concretizações 44, em que as células da composição estimulada são células viáveis.

[00968] 47. O método de quaisquer de concretizações 33 a 46, em que a introdução é iniciada dentro de 2 dias após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 2 dias após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[00969] 48. O método de quaisquer de concretizações 33 a 47, em que a introdução é iniciada dentro de 36 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 36 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[00970] 49. O método de quaisquer de concretizações 33 a 48, em que a introdução é iniciada dentro de 30 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 30 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[00971] 50. O método de quaisquer de concretizações 33 a 49, também compreendendo cultivar a composição modificada sob condições para promover a proliferação e/ou expansão das células modificadas, desse modo produzindo uma composição de saída compreendendo as células T modificadas.

[00972] 51. O método de concretização 50, em que o cultivo é realizado em meio livre de soro.

[00973] 52. Um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo:

[00974] (a) incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada; em que a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias;

[00975] (b) introduzir um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante; e

[00976] (c) cultivar a composição modificada sob condições para promover a proliferação e/ou expansão das células modificadas, desse modo produzindo uma composição de saída compreendendo as células T modificadas.

[00977] 53. O método de concretização 52, em que a incubação, introdução, e/ou cultivo são realizados em meio livre de soro.

[00978] 54. O método de concretização 41 a 53, em que a composição de entrada compreende uma relação entre 1,5:1 e 1:1,5 células CD4+ para CD8+, entre 1,2:1 e 0,8:1 células CD4+ para CD8+, opcionalmente a, ou cerca de 1:1 de células T CD4+ para CD8+.

[00979] 55. O método de quaisquer de concretizações 41 a 54, em que a composição de entrada compreende CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD45RA e CCR7.

[00980] 56. O método de concretização 55, em que a relação de células CD4+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 é de, ou é de cerca de 1.1:1.

[00981] 57. O método de quaisquer de concretizações 41 a 56, em que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7.

[00982] 58. O método de concretização 57, em que a relação das células CD4+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD27 e CCR7 é de, ou é de cerca de 1.69:1.

[00983] 59. O método de quaisquer de concretizações 41 a 58, em que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CCR7 e superfície negativa para CD62L.

[00984] 60. O método de quaisquer de concretizações 43 a 59, em que, para a introdução da composição estimulada compreende menos que 300×10^6 células.

[00985] 61. O método de quaisquer de concretizações 43 a 60, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende entre 50×10^6 células e 200×10^6 células, opcionalmente a, ou cerca de 100

x 10⁶ células.

[00986] 62. O método de quaisquer de concretizações 43 a 61, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração menor que 3 x 10⁶ células/mL.

[00987] 63. O método de quaisquer de concretizações 43 a 62, em que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração entre 0,5 x 10⁶ células/mL e 2 x 10⁶ células/mL, opcionalmente a, ou cerca de 1 x 10⁶ células/mL.

[00988] 64. O método de quaisquer de concretizações 43 a 63, ajustando a composição da composição estimulada após incubação sob condições de estimulação antes de introduzir o receptor recombinante nas células da composição estimulada.

[00989] 65. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 64, em que a incubação é realizada na presença de uma ou mais citocinas.

[00990] 66. Métodos de acordo com a reivindicação 65, em que as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante e/ou IL-15 recombinante.

[00991] 67. O método de acordo com a reivindicação 66, em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[00992] 68. O método de acordo com a reivindicação 66 ou 67, em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[00993] 69. O método de quaisquer de concretizações 1 a 68, em que pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% das células da composição estimulada:

[00994] (i) expressam um marcador de superfície selecionado do grupo que consiste em HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L e 4-1BB;

[00995] (ii) compreendem expressão intracelular de uma citocina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IFN-gama, TNF-alfa;

[00996] (iii) estão na fase G1 ou posterior do ciclo celular; e/ou

[00997] (iv) são capazes de se proliferarem.

[00998] 70. O método de quaisquer de concretizações 1 a 69, em que o reagente estimulatório compreende um agente primário que especificamente se liga a um membro de um complexo TCR, opcionalmente que especificamente se liga a CD3.

[00999] 71. O método de concretização 70, em que o reagente estimulatório também compreende um agente secundário que especificamente se liga a uma molécula coestimulatória de célula T, opcionalmente em que a molécula coestimulatória é selecionada de CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, ou ICOS.

[001000] 72. O método de concretização 70 ou concretização 71, em que os agentes primários e/ou secundários compreendem um anticorpo, opcionalmente em que o reagente estimulatório compreende incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[001001] 73. O método de quaisquer de concretizações 71 a 72, em que o agente primário e/ou agente secundário estão presentes sobre a superfície de um suporte sólido.

[001002] 74. O método de concretização 73, em que o suporte sólido é ou compreende uma conta.

[001003] 75. O método de concretização 74, em que a conta compreende um diâmetro maior que, ou maior do que cerca de 3,5 μm mas não mais do que cerca de 9 μm ou não mais do que cerca de 8 μm ou não mais do que cerca de 7 μm ou não mais do que cerca de 6 μm ou não mais do que cerca de 5 μm .

- [001004] 76. O método de concretização 74 ou concretização 75, em que a conta compreende um diâmetro de ou cerca de 4,5 μm .
- [001005] 77. O método de quaisquer de concretizações 74 a 76, em que a conta é inerte.
- [001006] 78. O método de quaisquer de concretizações 74 a 77, em que a conta é ou compreende uma superfície de poliestireno.
- [001007] 79. O método de quaisquer de concretizações 74 a 78, em que a conta é magnética ou superparamagnética.
- [001008] 80. O método de quaisquer de concretizações 74 a 79, em que a relação de contas para células é menor que 3:1.
- [001009] 81. O método de quaisquer de concretizações 74 a 80, em que a relação de contas para células é de, ou de cerca de 2:1 a 0,5:1.
- [001010] 82. O método de quaisquer de concretizações 74 a 81, em que a relação de contas para células é de, ou de cerca de 1:1.
- [001011] 83. Os métodos de quaisquer de concretizações 1 a 82, em que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante menos que 48 horas.
- [001012] 84. Os métodos de quaisquer de concretizações 1 a 83, em que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante entre 12 e 36 horas, inclusive.
- [001013] 85. Os métodos de quaisquer de concretizações 1 a 84, em que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante entre 18 e 30 horas, inclusive.
- [001014] 86. Os métodos de quaisquer de concretizações 1 a 85, em que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante, ou durante cerca de, 24 horas.
- [001015] 87. Os métodos de quaisquer de concretizações 23 a 86 em que o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante menos que 48 horas.
- [001016] 88. Os métodos de quaisquer de concretizações 23 a 87,

em que o contato, opcionalmente transdução, é realizado entre 12 e 36 horas, inclusive.

[001017] 89. Os métodos de quaisquer de concretizações 23 a 88, em que o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante entre 18 e 30 horas, inclusive.

[001018] 90. O método de quaisquer de concretizações 23 a 89, em que o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante, ou durante cerca de, 24 horas.

[001019] 91. O método de quaisquer de concretizações 23 a 90, em que o vetor viral é um vetor retroviral.

[001020] 92. O método de quaisquer de concretizações 23 a 91, em que o vetor viral é um vetor lentiviral ou vetor gamarretroviral.

[001021] 93. O método de quaisquer de concretizações 23 a 92, em que o contato, opcionalmente transdução, é realizado na ausência de um adjuvante de transdução.

[001022] 94. Os métodos de quaisquer de concretizações 23 a 93, em que a introdução é realizada na presença de uma ou mais citocinas.

[001023] 95. O método de concretização 94, em que as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante.

[001024] 96. O método de concretização 94 ou 95, em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[001025] 97. O método de quaisquer de concretizações 94 a 96, em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[001026] 98. O método de quaisquer de concretizações 50 a 97, em

que pelo menos uma parte do cultivo é realizada com mistura e/ou perfusão.

[001027] 99. O método de concretização 98, em que pelo menos uma parte do cultivo é realizada com perfusão em uma taxa de, de cerca de, ou de pelo menos 500 mL/dia, 600 mL/dia, 700 mL/dia, 750 mL/dia, 800 mL/dia, 900 mL/dia, 1.000 mL/dia, 1.200 mL/dia, 1.400 mL/dia, 1.500 mL/dia, 1.600 mL/dia, 1.800 mL/dia, e/ou 2.000 mL/dia.

[001028] 100. O método de concretização 98 ou 99, em que pelo menos uma primeira parte do cultivo é realizada com uma taxa de perfusão de, de cerca de, ou de pelo menos 500 mL/dia, 750 mL/dia, ou 1.000 mL/dia, e em que pelo menos uma segunda parte do cultivo é realizada com uma taxa de perfusão de, de cerca de, ou de pelo menos 1.200 mL/dia, 1.400 mL/dia, ou 1.500 mL/dia.

[001029] 101. O método de quaisquer de concretizações 98 a 100, em que a perfusão é iniciada e/ou aumentada quando as células atingem uma densidade específica.

[001030] 102. O método de concretização 101, em que a densidade específica é de, é de cerca de, ou é de pelo menos $0,4 \times 10^6$ células, $0,5 \times 10^6$ células, $0,6 \times 10^6$ células, $0,8 \times 10^6$ células, $1,0 \times 10^6$ células, $1,2 \times 10^6$ células, $1,4 \times 10^6$ células, $1,6 \times 10^6$ células, $1,8 \times 10^6$ células, $2,0 \times 10^6$ células, $2,2 \times 10^6$ células, ou $2,4 \times 10^6$ células.

[001031] 103. O método de quaisquer de concretizações 98 a 102, em que a perfusão é iniciada e/ou aumentada para uma taxa de, ou de cerca de 750 mL/dia quando as células atingem uma densidade de, ou de cerca de $0,6 \times 10^6$ células/mL.

[001032] 104. O método de concretização 98, em que a perfusão é iniciada e/ou aumentada para uma taxa de, ou de cerca de 1500 mL/dia quando as células atingem uma densidade de, ou de cerca de $2,0 \times 10^6$ células/mL.

[001033] 105. O método de quaisquer de concretizações 50 a 104,

em que o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas.

[001034] 106. O método de concretização 105, em que as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante.

[001035] 107. O método de concretização 105 ou 106, em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 50 e 400 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[001036] 108. O método de quaisquer de concretizações 105 a 107, em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 50 e 400 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

[001037] 109. O método de quaisquer de concretizações 50 a 108, em que o cultivo é iniciado dentro de 3 dias após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 3 dias após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[001038] 110. O método de quaisquer de concretizações 50 a 109, em que o cultivo é iniciado dentro de 60 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 60 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[001039] 111. O método de quaisquer de concretizações 50 a 110, em que o cultivo é iniciado dentro de 48 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 48 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

[001040] 112. O método de quaisquer de concretizações 50 a 111, em que o cultivo é realizado pelo menos até a composição compreender um número limítrofe de células T.

[001041] 113. O método de concretização 112, em que o cultivo é continuado durante pelo menos um dia após o número limítrofe de células T ser atingido.

[001042] 114. O método de concretização 113, em que o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 1200×10^6 células.

[001043] 115. O método de quaisquer de concretizações 50 a 114, em que o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 3500×10^6 células.

[001044] 116. O método de quaisquer de concretizações 50 a 115, em que o número limítrofe de células T é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 5500×10^6 células.

[001045] 117. O método de quaisquer de concretizações 50 a 116, compreendendo coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo.

[001046] 118. O método de concretização 50 a 117, compreendendo coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo, em que as células da composição de saída são coletadas pelo menos 9 dias após o início da incubação sob condições de estimulação.

[001047] 119. O método de concretização 50 a 118, compreendendo coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo, em que as células da composição de saída são coletadas pelo menos 10 dias após o início da incubação sob condições de estimulação.

[001048] 120. O método de concretização 118 ou 119, compreendendo um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída que é dentro de 8 dias a 25 dias.

[001049] 121. O método de concretização 118 ou 119, compreendendo um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída

que é dentro de 9 dias a 21 dias.

[001050] 122. O método de concretização 118 ou 119, compreendendo um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída que é dentro de 9 dias a 16 dias.

[001051] 123. O método de quaisquer de concretizações 52 a 122, também compreendendo formular células da composição de saída para crioconservação e/ou administração a um indivíduo, opcionalmente na presença de um excipiente farmacologicamente aceitável.

[001052] 124. O método de concretização 123, em que as células da composição de saída são formuladas na presença de um crioprotetor.

[001053] 125. O método de concretização 124, em que o crioprotetor compreende DMSO.

[001054] 126. O método de quaisquer de concretizações 122 a 124, em que as células da composição de saída são formuladas em um recipiente, opcionalmente um frascote ou uma bolsa.

[001055] 127. O método de quaisquer de concretizações 1 a 126, também compreende isolar as células T CD4+ e/ou CD8+ de uma amostra biológica antes da incubação.

[001056] 128. O método de concretização 127, em que o isolamento compreende, selecionar células com base na expressão de superfície de CD4 e/ou CD8, opcionalmente por seleção positiva ou negativa.

[001057] 129. O método de concretização 127 ou concretização 128, em que o isolamento compreende realizar a seleção com base na imunoafinidade.

[001058] 130. O método de quaisquer de concretizações 127 a 129, em que a amostra biológica compreende células T primárias obtidas de um indivíduo.

[001059] 131. O método de concretização 130, em que o indivíduo é um indivíduo humano.

[001060] 132. O método de quaisquer de concretizações 127 a 131, em que a amostra biológica é ou compreende uma amostra de sangue total, uma amostra da camada leucocitária, uma amostra de célula mononuclear de sangue periférico (PBMC), uma amostra de célula T não fracionada, uma amostra de linfócito, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aferese, ou um produto de leucaferese.

[001061] 133. O método de quaisquer de concretizações 1 a 132, em que o receptor recombinante é capaz de ligação a um antígeno alvo que é associado com, específico para, e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

[001062] 134. O método de concretização 133, em que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória, ou um tumor ou um câncer.

[001063] 135. O método de concretização 133 ou 134, em que o antígeno alvo é um antígeno de tumor.

[001064] 136. O método de quaisquer de concretizações 133 a 135, em que o antígeno alvo é selecionado dentre 5T4, 8H9, integrinas avb6, B7-H6, antígeno de maturação de célula B (BCMA), CA9, um antígeno de testículos de câncer, anidrase carbônica 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superfície de hepatite B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, antígeno carcinoembriônico (CEA), CE7, uma ciclina, ciclina A2, c-Met, antígeno dual, EGFR, glicoproteína 2 epitelial (EPG-2), glicoproteína 40 epitelial (EPG-40), EPHa2, efrina B2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR VIII, receptor de estrogênio, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína de ligação a folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, Her2/neu (tirosina cinase receptora erbB2), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve kappa, Lewis Y, Molécula de

adesão de célula L1 (L1-CAM), Antígeno associado ao melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV murino, mucina 1 (MUC1), ligantes MUC16, NCAM, NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, Receptores VEGF, VEGF-R2, Tumor 1 de Wilms (WT-1), um antígeno específico de patógeno e um antígeno associado com um marcador universal.

[001065] 137. O método de quaisquer de concretizações 1 a 136, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[001066] 138. O método de quaisquer de concretizações 1 a 137, em que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[001067] 139. O método de quaisquer de concretizações 1 a 138, em que o receptor recombinante é um CAR anti-BCMA.

[001068] 140. O método de concretização 138 ou 139, em que o receptor de antígeno quimérico compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação ao antígeno.

[001069] 141. O método de concretização 140, em que o domínio de ligação ao antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

[001070] 142. O método de concretização 141, em que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

[001071] 143. O método de concretização 141 ou concretização 142, em que o fragmento compreende um scFv.

[001072] 144. O método de quaisquer de concretizações 138 a 143,

em que o receptor de antígeno quimérico também compreende um espaçador e/ou uma região de articulação.

[001073] 145. O método de quaisquer de concretizações 138 a 144, em que o receptor de antígeno quimérico compreende uma região de sinalização intracelular.

[001074] 146. O método de concretização 145, em que a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular.

[001075] 147. O método de concretização 146, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente de receptor de célula T (TCR), e/ou um domínio de sinalização compreendendo um motif de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM).

[001076] 148. O método de concretização 146 ou 147, em que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3 ζ), ou uma porção de sinalização da mesma.

[001077] 149. O método de quaisquer de concretizações 145 a 148, em que o receptor de antígeno quimérico também compreende um domínio de transmembrana disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

[001078] 150. O método de quaisquer de concretizações 145 a 149, em que a região de sinalização intracelular também compreende uma região de sinalização coestimulatória.

[001079] 151. O método de concretização 150, em que a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

[001080] 152. O método de concretização 150 ou concretização 152, em que a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma CD28, uma 4-1BB ou uma ICOS ou uma porção de sinalização da mesma.

[001081] 153. O método de quaisquer de concretizações 150 a 152, em que a região de sinalização coestimulatória está entre o domínio de transmembrana e a região de sinalização intracelular.

[001082] 154. O método de quaisquer de concretizações 113 a 153, em que a composição de saída compreendendo o número limítrofe ou número maior de células é produzida entre mais que ou mais que cerca de 85%, mais que ou mais que cerca de 90% ou mais que ou mais que cerca de 95% das iterações do método.

[001083] 155. O método de quaisquer de concretizações 1 a 154, em que o meio livre de soro compreende:

[001084] 0,5 mM a 5 mM de uma forma de dipeptídeo de L-glutamina em um meio de base;

[001085] 0,5 mM a 5 mM de L-glutamina; e

[001086] pelo menos uma proteína, em que o meio é livre de soro.

[001087] 156. O meio livre de soro de concretização 155, em que a forma de dipeptídeo de L-glutamina é L-alanil-L-glutamina.

[001088] 157. O meio livre de soro de concretização 155 ou concretização 156, em que a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina no meio livre de soro é de, ou é de cerca de 2 mM.

[001089] 158. O meio livre de soro de quaisquer das concretizações 155 a 157, em que a concentração de L-glutamina no meio livre de soro é de, ou é de cerca de 2 mM.

[001090] 159. O meio livre de soro de quaisquer das concretizações 155 a 158, em que a referida pelo menos uma proteína compreende uma ou mais de albumina, insulina ou transferrina, opcionalmente uma ou mais de uma albumina, insulina ou transferrina humana ou recom-

binante.

[001091] 160. Uma composição compreendendo células modificadas produzidas por um método de quaisquer das concretizações 1 a 159.

[001092] 161. A composição de concretização 160, também compreendendo um transportador farmacologicamente aceitável.

[001093] 162. A composição de concretização 160 ou concretização 161, compreendendo um crioprotetor, opcionalmente DMSO.

[001094] 163. Artigo de fabricação, compreendendo a composição de quaisquer das concretizações 160 a 162, e instruções para a administração da composição de saída a um indivíduo.

[001095] 164. O artigo de fabricação de concretização 163, em que o indivíduo tem uma doença ou condição, opcionalmente em que o receptor recombinante especificamente reconhece ou especificamente se liga a um antígeno associado com, ou expresso ou presente em células da doença ou condição.

[001096] 165. O método de quaisquer de concretizações 55 a 159, em que durante pelo menos uma parte do cultivo, as células são monitoradas quanto à viabilidade celular, concentração, densidade, número, ou uma combinação dos mesmos.

[001097] 166. O método de concretização 165, em que o monitoramento é realizado por um método óptico, opcionalmente microscopias.

[001098] 167. O método de concretização 165 ou concretização 166, em que o monitoramento é realizado por microscopias de campo brilhante, microscopia por fluorescência, microscopias por contraste de interferência diferencial, microscopias de contraste de fase, microscopias por holografia digital (DHM), microscopias por holografia digital diferencial (DDHM), ou uma combinação dos mesmos.

[001099] 168. O método de quaisquer de concretizações 165 a 167, em que o monitoramento é realizado por microscopias por holografia digital diferencial (DDHM).

[001100] 169. O método de quaisquer de concretizações 165 a 168, em que o monitoramento é realizado intermitentemente ou continuamente durante a referida pelo menos uma parte do cultivo, opcionalmente é realizada pelo menos a cada 1 hora, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, ou 26 horas durante o cultivo.

[001101] 170. O método de quaisquer de concretizações 165 a 169, em que o monitoramento é realizado até as células atingirem o número limítrofe de células T, o número limítrofe de células T viáveis, a concentração limítrofe de células T ou a concentração limítrofe de células T viáveis.

[001102] 171. O método de quaisquer de concretizações 165 a 170, em que a monitoramento e cultivo são realizados em um sistema fechado.

[001103] 172. O método de qualquer uma das concretizações 50 a 159 e 165 a 171, em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são de um fenótipo de memória; em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são de um fenótipo de memória central; e/ou em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+.

[001104] 173. O método de qualquer uma das concretizações 50 a 159 e 165 a 172, em que iterações do método produzem uma plurali-

dade das composições de saída, opcionalmente de amostras biológicas humanas em que o método é realizado entre uma pluralidade de diferentes pacientes individuais, em que:

[001105] a percentagem média de células de um fenótipo de memória na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

[001106] a percentagem média de células de um fenótipo de memória central na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

[001107] a percentagem média de células que são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+ na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

[001108] a percentagem média de células que são CCR7+/CD45RA- ou CCR7+/CD45RO+ na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

[001109] a percentagem média de células T CD4+ de memória central nas células T CD4+ modificadas, opcionalmente células T CAR+CD4+, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre

cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

[001110] a percentagem média de células T CD8+ de memória central nas células T CD8+ modificadas, opcionalmente células T CAR+CD8+, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%; e/ou

[001111] a percentagem média de células T de memória central, opcionalmente células T de memória central CD4+ e células T de memória central CD8+, nas células T modificadas, opcionalmente células T CAR+, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%.

[001112] 174. O método de quaisquer de concretizações 1 a 159 e 165 a 173, em que os métodos produzem composições de saída exibindo uma característica predeterminada, opcionalmente um número limítrofe de células expressando o CAR na composição de saída, em pelo menos cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 99%, cerca de 100%, ou 100% das amostras biológicas humanas em que são realizadas entre uma pluralidade de diferentes pacientes individuais.

[001113] 175. O método de concretização 174, em que vários diferentes pacientes individuais compreendem indivíduos tendo uma doença ou condição.

[001114] 176. O método de concretização 175, em que a doença ou condição é um câncer.

[001115] 177. O método de concretização 176, em que o câncer é um câncer hematológico, opcionalmente mieloma múltiplo.

[001116] 178. A composição de concretização 160, em que:

[001117] pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são de um fenótipo de memória;

[001118] em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são de um fenótipo de memória central;

[001119] em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, granzima B-, e/ou CD127+; e/ou

[001120] em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CCR7+/CD45RA- ou são CCR7+/CD45RO+.

IX. EXEMPLOS

[001121] Os exemplos a seguir são incluídos apenas para fins ilustrativos e não se destinam a limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1: Processo para gerar composições terapêuticas de células T modificadas que expressam um CAR anti-BCMA.

[001122] Uma composição modificada de células T primárias contendo células T CD4+ e CD8+ que expressam um receptor antígeno

quimérico anti-BCMA (CAR) foi produzida por um processo exemplar que incluiu a seleção separada de células T CD4+ e CD8+ de uma amostra antes de combinar as células selecionadas em uma proporção definida para as etapas de processamento subsequentes. Composições separadas de células CD4+ e CD8+ foram selecionadas de PBMCs isoladas de uma amostra de leucaferese humana, incluindo indivíduos com mieloma múltiplo (MM), e as composições de células selecionadas foram criocongeladas. As composições de células T CD4+ e CD8+ selecionadas foram posteriormente descongeladas e misturadas na proporção de 1:1 de células T CD4 + viáveis para células viáveis T CD8 + antes de executar as etapas de estimulação, transdução e expansão.

[001123] Aproximadamente 300×10^6 células T (células T 150×10^6 CD4 + e 150×10^6 CD8 +) da composição de células mistas, a uma densidade de cerca de 3×10^6 células / mL, foram estimuladas na presença de contas revestidas por poliestireno paramagnético com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 anexados na proporção de 1:1 de conta para célula em um meio livre de soro exemplar (veja, por exemplo, Exemplo 3). O meio também continha IL-2, IL-7 e IL-15 recombinante. A estimulação foi realizada por incubação por 18 a 30 horas.

[001124] Após a incubação, aproximadamente 100×10^6 células viáveis da composição celular estimulada foram lavadas e novamente suspensas no meio livre de soro exemplar contendo IL-2, IL-7 e IL-15 recombinante. Nenhum adjuvante de transdução foi adicionado. As células foram transduzidas com um vetor lentiviral que codifica o CAR anti-BCMA por espinoculação durante 60 minutos, seguido de incubação por cerca de 18 a 30 horas a cerca de 37 °C. A densidade das células pós espinoculação foi de cerca de 1×10^6 células / mL. O CAR continha um domínio de ligação ao antígeno scFv específico para BCMA, uma região transmembranar CD28, uma região de sinalização

coestimulatória de 4-1BB e um domínio de sinalização intracelular derivado de CD3-zeta.

[001125] As células transduzidas foram então cultivadas para expansão por transferência para um biorreator (por exemplo, um biorreator de movimento oscilante) em cerca de 500 mL do meio livre de soro exemplar contendo duas vezes a concentração de IL-2, IL-7 e IL-15 como usado durante as etapas de incubação e transdução. Nesse processo exemplar, o meio não continha poloxâmero. Depois que uma célula limite de densidade de mais ou menos $0,6 \times 10^6$ células/mL foi alcançada, o meio foi adicionado etapa a etapa com jatos de meio fresco sendo adicionados periodicamente, como entre cerca de 2 e cerca de 15 minutos a uma volume de 1000 mL e como células foram cultivadas em condições de balanço constante (sem perfusão) até atingir um limiar de densidade celular viável de mais do que ou cerca de $0,6 \times 10^6$ células/mL. Se a densidade de células viáveis era superior a $0,8 \times 10^6$ células/mL, foi iniciada uma etapa de preenchimento / perfusão de combinação, na qual o primeiro meio foi adicionado etapa a etapa, conforme indicado acima, até um volume alvo de 1000 mL, em seguida a perfusão foi iniciada como explicado abaixo. O meio foi então substituído por perfusão semicontínua com mistura contínua. A taxa de perfusão e/ou a velocidade de balanço foram aumentadas pelo menos uma vez durante a fase de expansão, à medida que a densidade celular aumentou. A taxa de perfusão foi aumentada pelo menos uma vez durante a fase de expansão, à medida que a densidade celular aumentou. O meio foi adicionado à cultura de maneira gradual com o volume total por dia determinado pela densidade celular viável (com taxas mais altas uma vez que determinadas densidades foram atingidas), até uma taxa, por exemplo, resultando em aproximadamente 750 mL ou 1500 mL do meio total fresco adicionados à cultura por dia (com taxas mais altas quando maiores concentrações de células foram atin-

gidas), com jatos de meio fresco adicionados ao longo do dia periodicamente, como entre cerca de a cada 0,5 e cerca de a cada 1,5 ou 2 horas. As células foram colhidas uma vez ao dia após o número total de células nucleadas (TNC) ter atingido pelo menos ou pelo menos aproximadamente 3500×10^6 e em um ponto em que o número de TNC havia atingido pelo menos ou pelo menos aproximadamente 5500×10^6 células nucleadas totais. Após a colheita, as contas conjugadas com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 foram removidas da composição celular por exposição a um campo magnético.

[001126] As células foram então formuladas e alíquotas da composição transferidas em recipientes, por exemplo, para armazenamento ou uso a jusante. Em algumas concretizações, composições formuladas ou porções das mesmas foram transferidas para bolsas de congelamento apropriados para a criopreservação e armazenamento de composições celulares, por exemplo, para potencial administração a indivíduos (como bolsas de congelamento CryoStore) e/ou composições ou porções das mesmas foram transferidas para frascos ou outros recipientes, como para análise posterior das células. As células foram criocongeladas, como sob condições adequadas para descongelamento a jusante e uso para administração. Em alguns casos, volumes de 30 mL de células formuladas foram usados em bolsas individuais. Em alguns casos, as células foram criopreservadas em uma concentração total variável de células, por exemplo, para permitir um número consistente ou concentração de células T CAR + em cada dose no contexto das células para administração. Em algumas concretizações, o número de células CAR + CD3 + alvo é igual ou aproximadamente ao número desejado (tais como, a ou aproximadamente $37,5 \times 10^6$) de células CAR + CD3 + por 30 mL ou por bolsa, que em algumas concretizações envolve a variação da concentração total de células entre composições geradas por diferentes doadores ou pacientes.

[001127] Para amostras individuais de leucaferese obtidas de uma variedade de pacientes com mieloma múltiplo, usando este processo exemplar para gerar composições de células modificadas a partir dessas amostras, observou-se que a faixa de duração da porção do processo do início da ativação até a colheita era entre 7 e 10 dias, e uma duração média entre essas amostras de aproximadamente 7,5 dias. Foi ainda determinado que o número médio de duplicações acumuladas da população ao longo do processo entre as diferentes amostras foi de aproximadamente 7,5. As figs. 6A e 6B mostram mediana (linhas horizontais), intervalo interquartil (caixa) e intervalo interquartil 1,5x (*whiskers*) para percentagens de células dos fenótipos indicados (com base na expressão da superfície CD45RA e CCR7), entre as células CD4+ CAR+ (FIG. 6A) e entre as células CD8+ CAR+ (FIG. 6B) nas composições de células modificadas, respectivamente. As figs. 6C e 6D mostram mediana (linhas horizontais), intervalo interquartil (caixa) e intervalo interquartil 1,5x (*whiskers*) para percentagens de células dos fenótipos indicados (com base na expressão da superfície CD27 e CD28), entre as células CD4+ CAR+ (FIG. 6C) e entre as células CD8+CAR+ (FIG. 6D) nas composições de células modificadas, respectivamente.

Exemplo 2: Avaliação de características da composição terapêutica gerada de células CAR-T CD4+ e CD8+

[001128] Uma variedade de composições de células modificadas contendo células T CD4+ e CD8+ que expressam o CAR anti-BCMA foi gerada a partir de doadores saudáveis pelo processo exemplar descrito no Exemplo 1. As células foram avaliadas quanto à viabilidade, expressão de CAR anti-BCMA e estimulação específica de antígeno CAR usando um reagente de BCMA humano recombinante. As composições de células modificadas produzidas pelo processo exemplar mostraram percentagens consistentemente baixas de células posi-

tivas para caspase e alta viabilidade celular (medida pela coloração com laranja de acridina (AO) e iodeto de propídio). Além disso, a porcentagem de células CAR + foi semelhante nas células CD4+ e CD8+. A produção de citocinas, incluindo IFN-gama, TNF-alfa, IL2, granzima B e perforina, após 24 horas de incubação das composições de células modificadas com células alvo que expressam antígenos, resultou na produção de citocinas em valores consistentes com uma composição celular modificada ativa, em nossa experiência. Esses resultados demonstraram que as células modificadas por CAR ativas podem ser produzidas consistentemente usando o processo conforme descrito no Exemplo 1.

Exemplo 3: meio livre de soro para uso em um processo para células modificadas

[001129] O método exemplar descrito no Exemplo 1 para gerar composições terapêuticas de células T incluiu etapas nas quais a ativação, transdução e cultivo para expandir as células eram realizados em um meio livre de soro que foi preparado a partir de: (1) um meio basal líquido contendo cerca de 2 mM de L-alanil-L-glutamina (GlutaMax); (2) um primeiro suplemento, contendo 80 mM de glutamina e proteínas de substituição sérica, que foram mantidos congelados antes do uso; e (3) um segundo suplemento fornecido como uma solução líquida, por exemplo, Suplemento de Expansão de Células T OpTmizer™. O meio basal continha uma mistura e tampões de nutrientes e não continha fenol vermelho. Após descongelar o suplemento congelado, os componentes foram combinados a cerca de 95,0% +/- 0,2% (v / v) do meio basal, cerca de 2,5% +/- 0,2% (v / v) do primeiro suplemento e cerca de 2,5% +/- 0,2% (v / v) do segundo suplemento, desse modo gerando um meio de desenvolvimento de células livre de soro exemplar (designado "SFM-A"). A presença da L-glutamina no suplemento congelado garantiu sua estabilidade antes da adição ao meio basal para minimi-

zar a concentração variável de glutamina e/ou aumentar a concentração de amônia na formulação de meio livre de soro que pode ocorrer devido à instabilidade da L-glutamina. A L-glutamina permaneceu solúvel no primeiro suplemento devido à presença da L-alanil-L-glutamina. O meio, além disso, foi suplementado com citocinas, como IL-2, IL-7 e/ou IL-15.

[001130] Setenta e nove composições individuais de células T modificadas foram produzidas a partir do processo exemplar descrito acima. Foi observada uma expansão robusta durante o cultivo, conforme determinado pelo número total de células viáveis, de cada uma das 79 execuções de fabricação, incluindo aquelas derivadas de doadores saudáveis e pacientes de mieloma múltiplo. Todas as execuções foram capazes de produzir composições de células com densidade celular acima de um limite alvo de $5,5 \times 10^9$ no total de células dentro de 6 dias após o início do cultivo. Foi observado um aumento de mais de 27 vezes no número de células viáveis para todas as execuções de fabricação dentro de 6 dias após o início do cultivo, com mais de 85% das execuções alcançando tal expansão no dia 5. No geral, esses dados suportam o desempenho robusto da formulação de meio livre de soro através de células derivadas de doadores saudáveis e doadores pacientes.

Exemplo 4: Avaliação de composições de células T CAR + produzidas por um processo envolvendo meio livre de soro.

[001131] As células T humanas geneticamente modificadas que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) foram produzidas na presença do SFM-A exemplar pelo processo substancialmente conforme descrito nos Exemplos 1. Neste estudo, para gerar T células que expressam CAR, as células T CD4+ e CD8+ foram isoladas individualmente por enriquecimento à base de imunoafinidade a partir de amostras de leucaferese de doadores, misturadas a cerca de 1:1, ati-

vadas na presença de contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28, transduzidas com um vetor viral que codifica o CAR anti-BCMA e cultivadas por incubação a cerca de 37 °C para expandir as células. A ativação, a transdução e o cultivo para expandir as células foram realizados em meio contendo soro humano a 5% (v/v) ou em meio SFM-A descrito no Exemplo 3, cada um na presença de citocinas. Características exemplares das composições de células T modificadas produzidas foram comparadas entre composições de células correspondentes geradas a partir do mesmo doador, tanto na presença de SFM-A quanto no meio contendo soro.

A. Viabilidade

[001132] A viabilidade das células T após ativação, após ativação e transdução, e a cada dia após o início (dia = 0) do cultivo até o dia 6, foi avaliada. No início do processo, até o dia 2 após o início do cultivo, foram observados números e viabilidade celular mais baixos nas composições de células cultivadas em uma presença de SFM-A em comparação com o meio contendo soro. No terceiro dia de expansão, no entanto, a viabilidade foi comparável entre células cultivadas na presença de SFM-A e na formulação contendo soro. Esse resultado é consistente com um atraso na expansão de célula T na presença de meio livre de soro, por exemplo, conforme as células se adaptam às condições livres de soro durante os estágios iniciais do processo. Apesar do número inicial de células mais baixo, a cultura de células na presença de SFM-A produziu um número ligeiramente maior de células viáveis nos dias 5 e 6 e porcentagem comparável de células viáveis ao meio contendo soro.

B. ATIVIDADE DE CÉLULA CAR-T

[001133] A atividade funcional das células T CAR + nas composições de célula T pós-expansão foi avaliada monitorando o acúmulo de citocina após estimulação com acetato de forbol miristato (PMA) / ionomi-

cina na presença de um inibidor de Golgi. O acúmulo polifuncional de citocinas foi avaliado por manchamento intracelular de citocina (ICS) para IL-2, IFN-gama e TNF-alfa em células que também foram co-manchadas para a superfície CD4, CD8 ou o anti-BCMA CAR. Uma porcentagem comparável de células T CAR + CD4 + funcionais ou células T CAR + CD8 +, como determinado pelo acúmulo polifuncional de IL-2, IFN-gama e TNF-alfa, foi observada em células cultivadas na presença de SFM-A em comparação às células cultivadas com meio contendo soro.

[001134] A produção de citocinas IL-2, IFN-gama, TNF-alfa e GM-CSF também foi medida no sobrenadante usando um ensaio Luminex Multiplex após a co-cultura das composições de células T anti-BCMA CAR + com células que expressam antígenos. A secreção de citocinas inflamatórias (IL-2, TNF-alfa, GM-CSF e IFN-gama) foi comparável entre as culturas geradas na presença de SFM-A em comparação com o meio contendo soro.

C. Marcador apoptótico

[001135] As composições de células T anti-BCMA CAR +, que foram produzidas por um processo usando o meio contendo soro ou o SFM-A exemplar, e subsequentemente criopreservadas e descongeladas antes da análise, foram avaliadas quanto à expressão de superfície da caspase 3 ativa. Menos do que 5% das células CD3 + CAR + modificadas geradas e cultivadas em presença de SFM-A foram positivos para a caspase-3 ativa. A frequência de células CD3 + CAR + que foram positivas para a caspase-3 ativa foi menor nas composições comparadas de células T produzidas a partir de um doador exemplar quando cultivadas na presença de SFM-A em comparação ao meio contendo soro.

D. Frequência de transdução

[001136] A frequência de transdução das composições de células T

geradas foi determinada por citometria de fluxo. A expressão de superfície do CAR anti-BCMA foi medida usando um reagente específico para CAR. Nas composições exemplares de células T correspondentes a doadores, as células produzidas por um processo envolvendo SFM-A exibiram uma eficiência de transdução aumentada em comparação com as células produzidas por um processo envolvendo meio contendo soro. Em um experimento exemplar, a eficiência da transdução foi aumentada de cerca de 53% para cerca de 68%.

Exemplo 5: Efeito antitumoral de células T que expressam CAR, produzidas por um processo de meio livre de soro

[001137] Uma composição de células T anti-BCMA CAR + foi produzida por um processo que envolve substancialmente o SFM-A exemplar descrito nos Exemplos 1 e 3. Como comparação, uma composição de células T de um doador correspondente foi produzida por um processo similar, exceto usando meio contendo soro. O efeito antitumoral das composições T CAR + geradas foi avaliado através do monitoramento de tumores após transferência adotiva de células em modelos animais portadores de tumor, incluindo o modelo de camundongo xenoenxerto disseminado por mieloma múltiplo humano OPM2.

[001138] Para gerar camundongos portadores de tumor, camundongos fêmeas NOD.Cg.Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) de seis a oito semanas de idade foram injetados com 2×10^6 células OPM2 (mieloma múltiplo) transfectadas com luciferase vagalume (OPM2-ffluc). O tamanho do tumor foi monitorado no dia 13 usando imagens de bioluminescência e no dia 14, aos camundongos foi administrada uma única injeção intravenosa (iv) de uma composição de células T anti-BCMA CAR +, produzida por um processo que incluía SFM-A ou produzida por um processo que incluía meio contendo soro. As composições avaliadas de células T anti-BCMA CAR + foram geradas a partir do mesmo doador humano. As células foram administradas em uma dose

de 1×10^6 , 5×10^5 , ou $2,5 \times 10^5$ células T que expressam CAR. Células que não expressaram um CAR (simulação) foram usadas como controle negativo. O crescimento do tumor e a sobrevivência dos camundongos foram monitorados durante um período de 100 dias após a administração das células.

[001139] A atividade antitumoral das células que expressam CAR adotivamente transferidas foi monitorada por imagem de bioluminescência em vários dias após a injeção de células T CAR até o dia 100. Para imagem de bioluminescência, os camundongos receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de substrato de luciferina (CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA) novamente suspensos em PBS ($15 \mu\text{g} / \text{g}$ de peso corporal). Os camundongos foram anestesiados e fotografados essencialmente como descrito no documento WO2015 / 095895. O fluxo total (fóton/s) foi determinado em cada ponto de tempo. Para os camundongos tratados com controle negativo, os animais foram sacrificados entre 22 e 26 dias após a transferência de CAR-T, devido à alta carga tumoral. As células T expressando CAR produzidas com SFM-A ou meio contendo soro retardaram o crescimento do tumor e a sobrevivência prolongada, que geralmente era comparável em todas as doses avaliadas.

Exemplo 6: Condições de processo exemplares

[001140] Vários parâmetros relacionados a condições usadas nos processos exemplares que foram similares aos processos exemplares descritos no Exemplo 1, mas nos quais vários aspectos das diferentes etapas do processo foram variados e avaliados. Os aspectos variados incluíram aspectos de densidade de ativação e tempos de incubação, parâmetros de transdução, tipo e concentração de citocinas utilizadas e taxas de perfusão. Foram avaliados os resultados das composições celulares geradas por esses diferentes processos variados.

[001141] Cada um dos processos neste Exemplo 6 incluiu uma etapa

de seleção na qual as células T CD4 + e células T CD8 + foram selecionadas a partir de amostras de leucaferese de indivíduos doadores, resultando em duas composições separadas de células T CD4+ e CD8+, respectivamente, seguidas pela mistura de células viáveis em uma proporção aproximada de 1:1 de células CD4 + viáveis CD8 + viáveis, seguida pela ativação das células mistas na presença de contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28 e uma ou mais citocinas no meio livre de soro, transdução com uma vetor viral que codifica um CAR exemplar e cultivo na presença de contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28 e uma ou mais citocinas no meio livre de soro, seguidos de formulação e criopreservação com certos parâmetros específicos variados entre os diferentes processos.

A. Tempos de incubação da ativação

[001142] Em um estudo, a duração da incubação após a seleção e antes da transdução (na presença de contas revestidas com anti-CD3 / anti-CD28, citocina(s) e meio sem soro) foi variada. Especificamente, foi realizada a incubação durante 24 horas (n = 5 composições de células de 3 doadores individuais) ou 48 horas (n = 2 composições de células de 2 doadores individuais).

[001143] A eficiência da transdução de células T nas composições finais de células geradas pelo processo foi avaliada por citometria de fluxo por manchamento para expressão de superfície de CD3 (usando um reagente anti-CD3) e do CAR (usando um reagente BCMA-Fc recombinante). Observou-se que as composições de células modificadas geradas pelo processo usando a duração de 24 horas da incubação antes do início da transdução apresentaram uma porcentagem aproximadamente 2 vezes maior de células T (CD3 + CAR +) transduzidas em comparação às composições de células geradas pelo processo usando 48 horas de duração da incubação antes do início da transdução.

[001144] Além disso, as células modificadas produzidas pelos processos com diferentes durações de incubação foram cocultivadas durante 4 dias com K562-BCMA. Para monitorar a proliferação, as células foram marcadas com o corante marcador de proliferação CELL-TRACE VIOLET (CTV; ThermoFisher Scientific, Waltham MA). Após a cocultura, as células foram manchadas para expressão de superfície do anti-BCMA CAR, CD4 e CD8 e medidas com citometria de fluxo.

[001145] Os resultados estão resumidos na Tabela E1. Maior nível de expressão de superfície de CAR em células CAR+, conforme determinado pela intensidade média de fluorescência (MFI), e um maior grau de proliferação induzida por células que expressam antígenos neste ensaio (como medido por diluição em corante de CTV, indicado por diminuição da MFI de CTV), em ambas as células T CD4+ e CD8+, foram observados nas composições de células modificadas que foram geradas com o processo usando a incubação de pré-transdução de 24 horas com as contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28 em comparação com o processo usando as 48 horas de incubação. Esses resultados são consistentes com o aumento da eficiência da transdução do CAR e da funcionalidade específica do antígeno do CAR por um processo exemplar que incluiu uma duração de incubação pós-seleção e pré-transdução inferior a 48 horas, tal como uma duração aproximada de 24 horas.

Tabela E1: Manchamento de CAR e CTV após incubação com células alvo K562-BCMA

	Tipo celular	MFI de CAR médio	MFI de CTV médio
24 horas de estimulação	Células T CD4+	14463	4057
	Células T CD8+	16187	4116
48 horas de estimulação	Células T CD4+	5659	22932
	Células T CD8+	12862	8099

B. Densidade de célula de ativação

[001146] O efeito da densidade celular durante a incubação pré-

transdução com contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28, citocinas e meios, também foi avaliado pela comparação de características de composições de células modificadas que foram geradas por um processo no qual a incubação foi iniciada com células em uma densidade inicial de células de $1,5 \times 10^6$ células/mL, *versus* aquelas geradas por um processo no qual a incubação foi iniciada com células 3×10^6 células/mL, *versus* aquelas geradas por um processo no qual a etapa de incubação foi iniciada com células a uma densidade inicial de 5×10^6 células/mL. Em cada caso, a duração da incubação foi de aproximadamente 24 horas.

[001147] Para avaliar o impacto da densidade celular na atividade funcional das células geradas por esses processos, essas células foram submetidas a um ensaio de estimulação serial, no qual as células CAR-T anti-BCMA geradas foram incubadas em coculturas com células alvo K562-BCMA irradiadas em várias rodadas de exposição ao antígeno durante 7 ou mais dias. No dia 4 da cocultura, as células foram colhidas, contadas e reincubadas com novas células alvo nas mesmas condições de cultura após a redefinição do número de células para a densidade inicial de semeadura. As células T foram coletadas nos dias 4 e 7 e avaliadas quanto à proliferação como descrito acima.

[001148] Em geral, os processos nos quais a incubação pré-transdução foi iniciada em uma densidade celular de $1,5 \times 10^6$ células/mL ou 3×10^6 células/mL foram observados para produzir composições celulares através de vários doadores humanos, com funcionalidade específica ao antígeno consistente e capacidade proliferativa ao longo de várias rodadas de estimulação neste ensaio, em comparação com composições de células modificadas exemplares geradas pelo processo no qual a etapa de incubação foi iniciada na densidade celular de 5×10^6 células/mL. Esses resultados foram consistentes com uma conclusão que uma consistência aprimorada na capacidade de

proliferação e exibição de função específica do antígeno em várias rodadas de estimulação nas composições de células modificadas geradas por um processo no qual a incubação antes da transdução foi iniciada em uma densidade celular abaixo de 5×10^6 células/mL.

C. Condições de Transdução

[001149] O impacto das condições de transdução foi avaliado. As composições de células geradas pelos processos como descrito acima com variações nas condições de transdução. Especificamente, nos diferentes processos, a transdução foi realizada com ou sem espinoculação (por exemplo, a 1600 g durante 60 minutos usando uma centrífuga vertical), e com ou sem um adjuvante de transdução. Transdução com espinoculação foi observada ter frequências significativamente maiores de células CD3 + CAR + em comparação com as células nas quais a transdução foi realizada sem espinoculação. Eficiências de transdução similares foram observadas nesses processos, mesmo quando um adjuvante de transdução não estava presente durante a etapa de transdução.

Exemplo 7: Relação de conta anti-CD3/anti-CD28:célula durante expansão

[001150] Impactos sobre as características das células modificadas produzidas por um processo similar aos descritos no Exemplo 1 e Exemplo 6, de variação da relação de contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28 para célula durante a etapa dos processos de incubação pós-transdução (expansão) como descrito no Exemplo 1, exceto que o meio contendo soro foi usado na etapa de expansão, na qual relações de 1:1 ou 3:1 de contas para células no meio contendo soro. Durante a fase de expansão pós-transdução dos processos, as composições de células foram avaliadas diariamente quanto aos níveis de expansão, viabilidade, pH extracelular e lactato. Neste ensaio, as células para as quais esta etapa de incubação foi realizada usando uma relação de

3:1 de conta:célula exibiram um maior grau de expansão 5 dias após a inoculação em biorreatores de movimento de balanço, mas exibiram uma tendência decrescente na viabilidade celular 3 dias após a inoculação. Os níveis de pH extracelular e lactato foram observados serem inversamente correlacionados. Para células incubadas na relação de 1:1, o acúmulo de lactato extracelular e a queda de pH diminuíram após 3 dias, mesmo quando as células continuaram se expandindo. Para células incubadas na relação de 3:1, os níveis de lactato extracelulares continuaram a se acumular e o pH continuou a cair além do dia 3, consistente com a viabilidade celular diminuída.

[001151] Foram avaliados processos para gerar células modificadas com diferentes relações de contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28 para células. As composições de células modificadas foram geradas por um processo que incluiu a seleção de células T CD4+ e CD8+ a partir de amostras de leucaferese de indivíduos doadores, seguido pela mistura das células na relação aproximada de 1:1 antes da ativação com contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28 em uma relação de conta para célula de 1:1 ou 3:1 no meio contendo soro, transdução com um CAR anti-BCMA exemplar e cultivo para expandir as células.

[001152] As células das composições modificadas foram examinadas por citometria de fluxo. As células foram manchadas para expressão de CAR usando um reagente BCMA-Fc recombinante, e para expressão de superfície de CD3, CD4, CD8 e caspase ativa 3, um marcador de apoptose exemplar. Aproximadamente 50% das células CD3 + que foram estimuladas na relação de 3:1 de conta para célula foram positivas para a caspase 3 ativada, aproximadamente metade das quais foram positivas para expressão de CAR anti-BCMA. Por outro lado, aproximadamente 10% das células CD3 + estimuladas na relação de 1:1 foram positivas para a caspase ativa 3, 31% das quais expressavam o CAR. Foram observadas relações similares de células CD4 +

para CD8 + positivas para a caspase ativa 3.

[001153] Esses resultados são consistentes com a viabilidade aprimorada nas composições de células modificadas estimuladas na relação de 1:1 de contas conjugadas de anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 para células.

Exemplo 8: Inclusão de citocinas durante o processo de fabricação para gerar composições de células contendo células T CAR

[001154] Foram avaliados os impactos nas características das células modificadas produzidas por um processo similar ao descrito nos Exemplo 1 e Exemplo 6, exceto com a variação dos tipos de citocinas presentes no meio. As composições modificadas contendo células T CD4+ e CD8+ que expressam um CAR anti-BCMA foram geradas a partir de células T isoladas na presença de diferentes combinações de IL-2, IL-7 e IL-15. As células T de seis doadores individuais com mieloma múltiplo foram testadas.

[001155] As células T CD4+ e CD8+ foram isoladas de amostras derivadas de pacientes com mieloma múltiplo. As células foram estimuladas na presença de contas magnéticas anti-CD3 / anti-CD28, transduzidas com um vetor viral que codifica um CAR anti-BCMA e cultivadas para expandir as células. Cada uma das etapas de estimulação, transdução e expansão foi realizada em meio livre de soro na presença de citocinas, IL-2 somente; IL-2, IL-7 e IL-15; IL-2 e IL-15; ou IL-2 e IL-7.

[001156] As células das composições modificadas foram avaliadas por citometria de fluxo para expressão do CAR anti-BCMA usando um reagente BCMA-Fc recombinante, e para expressão de superfície de CD3, CD4, CD8 e caspase ativa 3.

[001157] Altas frequências de células CD3 + CAR + foram observadas em todas as composições de células modificadas produzidas na presença de diferentes combinações de citocinas. A combinação das

três citocinas apresentou as percentagens mais baixas e mais consistentes de células T CD3 + positivas para a caspase ativa 3.

[001158] A atividade estimulada por antígeno foi avaliada com manchamento intracelular de citocina (ICS). As células das composições modificadas foram cocultivadas com células MM.1S irradiadas, uma linhagem celular de mieloma múltiplo humano que expressa BCMA, na presença de um inibidor de Golgi. As células foram avaliadas quanto ao acúmulo intracelular de citocina de IL-2, IFN-gama, ou TNF-alfa, ou pelo manchamento polifuncional de todas as três citocinas. Os resultados indicaram que as composições de células modificadas produzidas a partir de cada doador continham células T CD4+ CAR+ e CD8+ CAR+ funcionais. As células CD4+ e CD8+ estimuladas pelo antígeno que foram positivas para IL-2, IFN-gama, TNF-alfa internas e células polifuncionais positivas para todas as três foram observadas nas composições de células modificadas produzidas com cada combinação de citocinas.

[001159] As células das composições modificadas foram avaliadas quanto aos subfenótipos por citometria de fluxo por manchamento com CD45RA, CCR7, CD27 e CD28. Os resultados do manchamento de CD45RA e CCR7 indicaram que as composições de células modificadas geradas em cada condição eram predominantemente compostas por células T CD45RA + CCR7 + CD4+ e CD8+. Baixos níveis de células CD45RA + CCR7 foram observados em todas as composições de células modificadas. Os resultados dos manchamentos de CD27 e CD28 indicaram que as composições de células modificadas geradas em cada condição continham principalmente células T CD27 + CD28 + CD4+ e CD8+. Níveis baixos de células T CD27-CD28- CD4+ e CD8+ foram observados em todas as composições de células modificadas.

Exemplo 9: Correlação entre o fenótipo de composição de partida e a relação de células que expressam CAR CD4 + para CD8 + em

uma composição de célula T CAR +

[001160] Composições de célula T CAR + contendo células T autólogas que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) foram geradas a partir de aferese coletada de 11 doadores separados com quatro amostras teste processadas separadamente de cada amostra de doador. Um doador era um paciente com mieloma e os demais doadores eram saudáveis. Após lavagem de cada amostra de aferese, cada amostra foi avaliada por citometria de fluxo quanto à viabilidade celular, utilizando um marcador apoptótico e para expressão de superfície de CD4 e CD8 para determinar a relação de células T viáveis CD4 + para CD8 + (relação CD4 / CD8) em cada execução de amostra de aferese.

[001161] As células T CD4+ e CD8+ foram selecionadas a partir de amostras de aferese por seleção baseada em imunoafinidade. As células T CD4 + e as células T CD8 + foram combinadas na relação de 1:1 de células viáveis CD4 + para CD8 +. Uma amostra das células combinadas foi avaliada por citometria de fluxo quanto à viabilidade celular, utilizando um marcador específico apoptótico e quanto expressão de superfície de marcadores que incluíam CD4, CD8, CD45RA e CCR7. A relação de CD45RA + / CCR7 + CD4 + viáveis para CD45RA + / CCR7 + CD8 + viáveis (relação CD45RA + / CCR7 + CD4 / CD8) na mistura das células CD4 e CD8 selecionadas foi determinada.

[001162] Para gerar uma composição de células T CAR +, as células T combinadas CD4+ e CD8+ foram ativadas por incubação com contatos revestidas de anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 na presença de citocinas, e depois foram transduzidas com um vetor lentiviral que codifica um CAR anti-BCMA. O CAR continha um domínio de ligação ao antígeno scFv específico para BCMA, um espaçador, uma região transmembranar CD28, uma região de sinalização coestimulatória de 4-1BB e um domínio de sinalização intracelular derivado de CD3-zeta. Após a

transdução, as células foram expandidas e congeladas por criopreservação. As células na composição congelada foram descongeladas e avaliadas por citometria de fluxo quanto à viabilidade, expressão de superfície de CD4 e CD8 e expressão de CAR usando um reagente BCMA-Fc. A relação de células CAR + viáveis que eram CD4 + para células CAR + viáveis que eram CD8 + foi determinada (relação CAR + CD4 / CD8).

[001163] A relação de CD4 / CD8 nas amostras de aferese, ou a relação de CD45RA + / CCR7 + CD4 / CD8 na mistura de células CD4 e CD8 selecionadas, foi comparada, *post facto*, à relação de CAR + CD4 / CD8 na composição de células T CAR. O grau de correlação das relações médias de cada indivíduo foi avaliado por análise bivariada e a elipse normal bivariada representando a região de probabilidade 0,990 para os dados plotados é mostrada nas FIGS. 1A e 1B, respectivamente. A Tabela E2A e a Tabela E2B exibem os resultados de uma análise de correlação de Pearson realizada com relação aos dados plotados na FIG. 1A e FIG. 1B, respectivamente.

Tabela E2A: Elipse Normal bivariada P = 0,990; relação de CD4/CD8 em amostra de eferese				
Variável	Média	Desvio Padrão	Correlação	Signif. Prob.
Relação CD4/CD8 de partida	1,57	0,42	-0,11	0,75
Relação CAR+ CD4/CD8 Final	1,35	1,00		

Tabela E2B: Elipse Normal bivariada P = 0,990; relação de CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 em mistura de células CD4 e CD8 selecionadas				
Variável	Média	Desvio Pa- drão	Correlação	Signif. Prob.
Relação de CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 de partida	1,52	1,09	0,99	<0,0001
Relação de CAR+ CD4/CD8 Final	1,35	1,00		

[001164] Como mostrado na FIG. 1A e Tabela E2A, neste experimento, a relação CD4 / CD8 viável de células T CD4+ e CD8+ da amostra de aferese não se correlacionou com a relação CAR + CD4 / CD8 na composição final. Esse resultado é consistente com as observações de que a mistura de células T CD4 e CD8 purificadas na relação de 1:1 antes da ativação com base no total de células viáveis não necessariamente se correlaciona com a relação de 1:1 de células T CD4+ e CD8+ em uma composição de célula T de saída.

[001165] Como mostrado na FIG. 1B e Tabela E2B, neste experimento, a relação CAR + CD4 / CD8 na composição final de células T correlacionou-se positivamente com a relação de células T CD4 / CD8 de células naïve de partida, conforme determinado pela relação de CD45RA + / CCR7 + CD4 / CD8 na mistura de células CD4 e CD8. Em particular, os resultados na FIG. 1B mostram que a correlação entre a relação de células CD45RA + / CCR7 + / CD4 + para células CD45RA + / CCR7 + / CD8 + na amostra de partida para a relação de CAR + CD4 / CD8 na composição de célula T é alta com base no coeficiente de correlação de Pearson e valor de p <0,0001. Essa correlação foi mantida apesar das variações na composição de entrada e entre execuções do processo. Com base neste modelo, a partir deste conjunto de amostras exemplar, determinou-se uma relação de CD45RA + /

CCR7 + / CD4 + para CD45RA + / CCR7 + / CD8 + de cerca de 1,1:1 para resultar em uma relação de CAR + CD4 / CD8 de cerca de 1:1 na composição de células T saída.

[001166] Esses dados sustentam a hipótese de que é possível controlar e/ou ajustar a relação e/ou composição das células CD4+ e CD8+ em uma composição de células T de saída, controlando a relação de um subconjunto CD4 + tpo naive para um indivíduo de célula T CD8 + tipo naive, tal como determinado pela expressão da superfície CD45RA + e CCR7 +.

Exemplo 10: Correlação entre fenótipos da população de célula T de partida e a relação de células T CAR + CD4 + para CAR + CD8 + em composições de células T CAR + modificadas

[001167] Um total de 50 composições de células T CAR + modificadas foram geradas a partir de amostras de aferese coletadas de 15 doadores saudáveis e um paciente de mieloma múltiplo. Para gerar as composições CAR-T, as células T CD4+ e CD8+ selecionadas viáveis foram combinadas em uma composição celular de partida na relação de 1: 1 e, em seguida, ativadas, transduzidas e expandidas conforme descrito no Exemplo 9. Amostras das composições de partida de células T CD4+ e CD8+ viáveis combinadas foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à viabilidade e expressão de superfície de marcadores que incluíam CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7 e CD62L.

[001168] As amostras das composições de células T CAR + modificadas foram avaliadas quanto à expressão de CAR e expressão de superfície de marcadores que incluíam CD4 e CD8. As médias foram calculadas para relações de células T CD4+ CAR+ para células T CD8+ CAR+ (relação CAR + CD4 / CD8) de composições individuais de células T CAR + do mesmo doador que foram geradas usando o mesmo processo exemplar como descrito no Exemplo 9, exceto que certos parâmetros do processo foram variados. As relações médias de

CAR + CD4 / CD8 foram analisadas para correlações com vários fenótipos das composições de partida das células combinadas viáveis CD4 + para CD8 +. A combinação das células T CD4+ e CD8+ selecionadas na relação 1:1 antes da ativação não se correlacionou necessariamente com a relação 1:1 de CAR + CD4 / CD8 nas composições das células de saída geradas.

[001169] O grau das correlações entre as relações de CAR+ CD4/CD8 médias e os fenótipos de cada doador foi avaliado por análise bivariada. As elipses normais bivariadas representando a probabilidade de 0,950 são mostradas para relações para célula T CD45RA+/CCR7+/CD4+ para CD45RA+/CCR7+/CD8+ (relação de CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8; **FIG. 2A**); CD62L-/CCR7+/CD4+ para CD62L-/CCR7+/CD8+ (relação de CD62L-/CCR7+ CD4/CD8; **FIG. 2B**); e relação de CD27+/CCR7+/CD4+ para CD27+/CCR7+/CD8+ (relação de CD27+/CCR7+ CD4/CD8; **FIG. 2C**). **Tabela E3** mostra os resultados de análise de correlação de Pearson realizada com respeito aos dados plotados nas **FIGS. 2A-2C**.

Tabela E3: Elipse Normal bivariada P = 0,950 para fenótipos exemplares					
Fenótipo	Média	Desvio Padrão	Correlação	Signif. Prob.	Número
Relação de CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8	1,14	0,56	0,88	<0,0001	16
Relação % de CD62L-/CCR7+ CD4/CD8)	1,66	0,83	0,88	<0,0001	16
Relação % de CD27+/CCR7+ CD4/CD8	2,01	0,91	0,93	<0,0001	16
Relação de CAR+ CD4/CD8 de saída	1,22	,80			

[001170] A análise indicou que, usando o protocolo exemplar descrito no Exemplo 9, a relação CAR + CD4 / CD8 correlacionou-se positivamente com a relação de células T CD45RA + / CCR7 + CD4 / CD8 para doadores saudáveis, mas, neste experimento, não para a única amostra de paciente. A relação CAR + CD4 / CD8 mostrou correlacionar-se positivamente com as relações CD62L- / CCR7 + CD4 / CD8 e CD27 + / CCR7 + CD4 / CD8 em ambas composições celulares de partida de amostras de pacientes e doadores saudáveis. Com base no ajuste do modelo, foi calculado que uma relação de partida de CD27 + / CCR7 + CD4 / CD8 de 1,69:1 seria prevista para gerar uma composição de célula de saída com uma relação CAR + CD4 / CD8 de aproximadamente 1:1. Esses resultados foram consistentes com a descoberta de que a relação CD27 + CCR7 + CD4 / CD8 pode ser ajustada na composição da célula de partida para controlar e/ou prever a relação CAR + CD4 / CD8 resultante da composição da célula modificada.

Exemplo 11: Processo para produzir composição de célula T CAR + com base no fenótipo de composição de partida

[001171] Dez composições de célula T CAR + contendo células T autólogas expressando um CAR foram geradas a partir de aferese coletada de 3 doadores separados, incluindo dois doadores saudáveis e um paciente de mieloma múltiplo. As células T CD4+ e CD8+ foram selecionadas a partir de amostras de aferese, conforme descrito no Exemplo 9. As amostras de aferese e as células T CD4+ e CD8+ selecionadas foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à viabilidade e marcadores de superfície incluindo CD27, CCR7, CD4 e CD8. A frequência de células CD27 + / CCR7 + entre as células T CD4+ e CD8+ selecionadas foi determinada, com cada doador exibindo uma relação diferente de células CD27 + / CCR7 + CD4 + para células CD27 + / CCR7 + CD8 + em amostras de aferese. Por exemplo, a amostra de paciente exibiu uma relação de células CD27 + / CCR7 + CD4 + para

células CD27 + / CCR7 + CD8 + de aproximadamente 12,2: 1, enquanto as duas amostras de doadores saudáveis exibiram relações de células CD27 + / CCR7 + CD4 + para células CD27 + / CCR7 + CD8 + de 3,56:1 e 2,15:1. As composições das células de entrada foram geradas por (1) combinação de células CD4+ e CD8+ selecionadas na relação de CD4 + para CD8 + viável de 1:1 (CD4 / CD8 viável) ou (2) combinação de células CD4+ e CD8+ na relação de 1,69:1 de CD27 + / CCR7 + CD4 + e CD27 + / CCR7 + CD8 + (CD27 + / CCR7 + CD4 / CD8) antes da ativação. Um total de 300×10^6 células ou 100×10^6 células das composições de entrada foi ativado, transduzido e expandido para gerar composições de células de saída substancialmente conforme descrito no Exemplo 9.

[001172] O número total de células na etapa de ativação não foi observado para afetar a relação CAR + CD4 / CD8. As composições das células de saída geradas a partir das composições de partida contendo células CD27 + / CCR7 + CD4 / CD8 misturadas a uma relação de cerca de 1,69:1, incluindo a amostra do paciente, exibiram relações CAR + CD4 / CD8 próximas da relação alvo desejada de 1:1 (por exemplo, entre aproximadamente 1,86:1 a 1:1,86). As composições de células de saída geradas a partir de composições de entrada contendo células CD4 / CD8 viáveis misturadas na relação 1: 1 mostraram uma variação maior nas relações CAR + CD4 / CAR + CD8, em comparação com as composições geradas a partir das composições de entrada contendo células CD4+ e CD8+ na relação 1,69:1 de células CD27 + / CCR7 + CD4 + e células CD27 + / CCR7 + CD8 +. Neste experimento, as composições de saída geradas usando material do paciente em um processo exemplar exibiram relações CAR + CD4 / CAR + CD8 de aproximadamente 7,6 e 8,6 quando 100×10^6 células ou 300×10^6 células foram ativadas, respectivamente. Quando misturada com base no fenótipo em um processo similar, por exemplo, uma relação de 1,69:1

de células T CD27 + CCR7 + CD4 +: CD27 + CCR7 + CD8 +, a relação final de CAR + CD4 / CAR + CD8 era de 1,6 e 1,3 quando células de 100×10^6 ou células de 300×10^6 foram ativadas, respectivamente. Esses resultados são consistentes com a constatação de que fenótipos específicos, por exemplo, células CD27 + / CCR7 +, podem se correlacionar com as relações CAR + CD4 / CAR + CD8 resultantes nas composições de saída geradas a partir de amostras de pacientes e doadores saudáveis.

Exemplo 12: Avaliação de amostras de indivíduos doentes de correlação entre o fenótipo de composição de partida e a relação de células que expressam CAR CD4 + para CD8 + em uma composição de célula T CAR +

[001173] Composições de célula T CAR + contendo células T autólogas que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) foram geradas a partir de aferese coletada de 7 doadores separados com mieloma múltiplo.

[001174] As células T CD4+ e CD8+ foram selecionadas a partir de amostras de aferese por seleção baseada em imunoafinidade. As células T CD4 + e as células T CD8 + foram combinadas na relação de 1:1 de células viáveis CD4 + para CD8 +. Uma amostra das células combinadas foi avaliada quanto à expressão de superfície dos marcadores que incluíam CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7 e CD62L. Na mistura de células CD4 e CD8 selecionadas, foi determinada a relação dos seguintes fenótipos celulares (1) células CD27 + / CCR7 + CD4 + para células CD27 + / CCR7 + CD8 + (relação CD27 + / CCR7 + CD4 / CD8), (2) células CD45RA + / CCR7 + CD4 + para células CD45RA + / CCR7 + CD8 + (relação CD45RA + / CCR7 + CD4 / CD8), e (3) células CD62L- / CCR7 + CD4 + para células CD62L- / CCR7 + CD8 + (relação CD62L- / CCR7 + CD4 / CD8).

[001175] Uma composição de células T CAR + expressando um CAR

anti-BCMA foi gerada usando o processo substancialmente conforme descrito no Exemplo 9, incluindo ativação, transdução, expansão e criopreservação de células geradas. As células na composição congelada foram descongeladas e avaliadas por citometria de fluxo quanto à viabilidade, expressão de superfície de CD4 e CD8 e expressão de CAR usando um reagente BCMA-Fc. A relação de células CAR + viáveis que eram células CD4 + para CAR + viáveis que eram CD8 + foi determinada (relação CAR + CD4 / CD8).

[001176] A relação de CD27 + / CCR7 + CD4 / CD8, ou a relação de CD45RA + / CCR7 + CD4 / CD8, ou a relação de CD62L- / CCR7 + CD4 / CD8 na mistura das células CD4 e CD8 selecionadas, foi comparada, *post facto*, à relação de CAR + CD4 / CD8 na composição de células T CAR modificadas. O grau de correlação das relações médias de cada indivíduo foi avaliado por elipse normal bivariada, representando a região de probabilidade 0,950 para os dados plotados, mostrados nas FIGS. 3A-3C. Como mostrado, a correlação entre a relação CD27 + / CCR7 + CD4 / CD8, relação CD45RA + / CCR7 + CD4 / CD8, ou a relação CD62L- / CCR7 + CD4 / CD8 na amostra de partida para a relação CAR + CD4 / CD8 na composição da célula T foi significativa com base na análise de correlação de Pearson. As tabelas E4A-E4C mostram os resultados da análise de correlação realizada com relação aos dados plotados nas FIGS. 3A-3C. A significância <0,05 é anotada por *.

Tabela E4A: Elipse Normal bivariada P = 0,950; relações de CD4/CD8 em amostra de partida e composição celular de saída				
Variável	Média	Desvio Pa- drão	Correlação	Signif. Prob.
Relação % de CD27+CCR7+ CD4/CD8 de partida	2,689438	1,788478	0,895786	0,0064*
Relação de CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,459516		

Tabela E4B: Elipse Normal bivariada P = 0,950; relações de CD4/CD8 e amostra de partida e composição de célula de saída				
Variável	Média	Desvio Pa- drão	Correlação	Signif. Prob.
Relação % de CD45RA+CCR7+ CD4/CD8 de partida	1,394018	0,937173	0,86723	0,0115*
Relação de CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,459516		

Tabela E4C: Elipse Normal bivariada P = 0,950; relações de CD4/CD8 e amostra de partida e composição de célula de saída				
Variável	Média	Desvio Pa- drão	Correlação	Signif. Prob.
relação % de CD62L-CCR7+ CD4/CD8 de partida	2,179702	1,153181	0,88584	0,0079*
Relação de CAR+ CD4/CD8	2,560108	2,456516		

Exemplo 13: Imagem contínua em linha para determinação da viabilidade celular durante o cultivo

[001177] Vários parâmetros ópticos das células T no processo de modificação para expressão de um receptor recombinante foram obtidos usando microscopias em linha por holografia digital diferencial

(DHM). O DHM diferencial permite imagens livre de marca de células, com imagens de alto contraste para segmentação de objetos, e obtendo uma pluralidade de características ópticas ou morfológicas que descrevem quantitativamente os objetos fotografados, por exemplo, para determinar a contagem e a viabilidade das células.

[001178] As células T primárias de um doador humano saudável foram modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico anti-BCMA (CAR) usando um processo de modificação exemplar, geralmente como descrito nos Exemplos 1 e 6 acima. Foram realizadas duas execuções experimentais (Execução 1, Execução 2). As células foram cultivadas para expansão por transferência para um biorreator (por exemplo, um biorreator de movimento de balanço). O cultivo incluiu substituição de meios com perfusão semicontínua e mistura contínua.

[001179] Imagens holográficas e parâmetros ópticos das células foram capturados continuamente durante até aproximadamente 120 horas de cultura usando um sistema de imagem diferencial em linha DHM ("contínuo"), por exemplo, um Ovizio iLine F (*Ovizio Imaging Systems NV / SA*, Bruxelas, Bélgica). O sistema DHM diferencial em linha continha um sistema de tubulação descartável conectado ao biorreator, de modo que uma amostra possa fluir do biorreator, através do sistema de tubulação, onde um sistema de imagem captura imagens holográficas e parâmetros ópticos das células que viajam e retorna a amostra ao biorreator. Viabilidade celular e contagem de células viáveis (VCC) foram determinadas a partir de imagens. A viabilidade das células modificadas também foi comparada aos resultados por amostragem manual ("manual") e contagem de células usando um contador de células automatizado, amostrados em vários pontos de tempo durante até aproximadamente 120 horas de cultura. Os dois métodos foram comparados com base na análise do curso do tempo e regressão

linear.

[001180] As FIGS. 4A e 4B mostram a comparação da contagem de células viáveis (VCC) e da viabilidade, disponível usando o monitoramento contínuo por DHM diferencial ou amostragem manual, em execução experimental 1 (FIG. 4A) e execução 2 (FIG. 4B). O R^2 e a inclinação da comparação são mostrados na Tabela E5 abaixo. A diferença no VCC, medida pelos dois métodos, caiu dentro da variação esperada do método de amostragem manual.

Tabela E5. R^2 e inclinação de comparação entre métodos de amostragem.

Experimento	R^2		Inclinação	
	VCC	Viabilidade	VCC	Viabilidade
Execução 1	0,97	0,96	0,92	0,80
Execução 2	0,99	0,98	0,94	0,98

[001181] Os resultados mostraram que a viabilidade e VCC como monitoramento contínuo e amostragem manual estavam altamente correlacionadas. Os resultados foram consistentes com a utilidade do monitoramento contínuo por DHM diferencial durante o cultivo para expansão das células no processo de modificação celular.

Exemplo 14: Comparação de expansão manual e automatizada usando imagens em linha contínuas

[001182] Um método de expansão celular totalmente automatizado e sem operador, com monitoramento contínuo das células por imagem em linha e perfusão automatizada, foi comparado a um método de expansão manual.

[001183] As células T primárias de um doador humano saudável foram ativadas e transduzidas com um vetor para expressar um receptor de antígeno quimérico exemplar (CAR), usando um processo de modificação exemplar. Após a transdução, as células foram reunidas e inoculadas para duas culturas diferentes, uma expansão automatizada com base em imagens em linha contínuas usando DHM diferencial e

um método de expansão manual.

[001184] Na cultura de expansão automatizada, as células foram cultivadas em um biorreator de movimento de balanço, com substituição de meio com perfusão semicontínua e mistura contínua. A viabilidade celular e a contagem de células viáveis (VCC) foram monitoradas usando um sistema diferencial de imagens DHM automatizado, geralmente como descrito no Exemplo 13 acima. O VCC inicial no momento da inoculação foi similar para ambas as culturas ($0,12 \times 10^6$ células/mL para cultura automatizada, $0,14 \times 10^6$ células/mL para cultura manual). A perfusão na expansão automatizada foi baseada em uma média móvel de quatro horas do VCC calculada por um algoritmo de *software*, em que a média do VCC mais que o VCC alvo era necessário para a progressão do método. O VCC alvo foi de $0,6 \times 10^6$ células/mL, 1×10^6 células/mL e 4×10^6 células/mL para 3 etapas de perfusão. Nenhuma intervenção adicional do operador ocorreu após a inoculação. Na cultura de expansão manual, a perfusão foi realizada geralmente como descrito no Exemplo 1 acima, com uma única amostragem diária. As células também foram avaliadas quanto à expressão celular de superfície dos marcadores por citometria de fluxo.

[001185] Como mostrado na FIG. 5, foi observado maior desenvolvimento de células T com o sistema de expansão automatizado. A viabilidade celular, avaliada por imagens diferenciais contínuas de DHM, e os fenótipos de células, avaliados por citometria de fluxo, foram similares entre os processos de expansão automatizados e manuais.

[001186] Os resultados foram consistentes com a utilidade do processo contínuo de imagem DHM e expansão automatizada, para cultivo e monitoramento de células durante o processo de modificação de células T, sem a necessidade de um operador humano. Em alguns aspectos, esse método pode ser usado para determinar a cinética de desenvolvimento das células T primárias e determinar o tempo de colhei-

ta das células para modificação de administração.

Exemplo 15: Avaliação de composições de células T geradas por processos de fabricação exemplares

[001187] Em um processo exemplar essencialmente como descrito no Exemplo 1, 50 composições de células T CAR + contendo células T autólogas que expressam um CAR anti-BCMA foram geradas a partir de aferese coletada de 50 indivíduos humanos separados (uma aferese de cada indivíduo), incluindo 10 doadores saudáveis e 40 pacientes com mieloma múltiplo. As células T CD4+ e CD8+ foram selecionadas das amostras de aferese e criopreservadas separadamente. As células foram descongeladas e as células T CD4 + e as células T CD8 + foram combinadas na relação de 1:1 de células viáveis CD4 + para CD8 +. As células T combinadas CD4+ e CD8+ foram ativadas, transduzidas com um vetor que codifica um CAR, expandidas e congeladas por criopreservação essencialmente como descrito no Exemplo 1.

[001188] Em um processo alternativo exemplar, as composições terapêuticas de células T foram geradas por um processo que incluía seleção baseada em imunoafinidade de células T de amostras de leucaferese de 55 indivíduos com câncer humano. As células T a granel foram submetidas à ativação e transdução com um vetor viral que codifica um CAR, expansão e criopreservação.

[001189] As células nas composições congeladas foram descongeladas e avaliadas por citometria de fluxo quanto à viabilidade, expressão de um marcador apoptótico, tal como, caspase ativa 3 (CAS), expressão de superfície de CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7, e CD45RA, e CAR. Foram determinadas a porcentagem de células CD3 +, a porcentagem de células negativas de marcador apoptótico CAR + em células CD3 + CAR + nas composições, e as porcentagens de células CD4+ CAR+ de memória central e células CD8 + CAR+ de memória central nas composições. Os fenótipos celulares da composição

celular gerados pelo processo de fabricação foram avaliados e, em alguns aspectos, comparados aos da composição celular gerados pelo processo alternativo.

[001190] O processo de fabricação deste exemplo resultou em composições de células modificadas que atendem a determinadas características pré-determinadas, incluindo números limiares de células que expressam o CAR na administração de uma composição celular a pacientes, em 100% das amostras biológicas humanas nas quais estava realizado. As figs. 6A e 6B mostram mediana (linhas horizontais), intervalo interquartil (caixa) e intervalo interquartil 1,5x (*whiskers*) para percentagens de células dos fenótipos indicados (com base na expressão da superfície CD45RA e CCR7), entre as células CD4+ CAR+ (FIG. 6A) e entre as células CD8+ CAR+ (FIG. 6B) nas composições, respectivamente, para composições geradas individualmente a partir do grupo de amostras dos 40 indivíduos com mieloma múltiplo. As figs. 6C e 6D mostram mediana (linhas horizontais), intervalo interquartil (caixa) e intervalo interquartil 1,5x (*whiskers*) para percentagens de células dos fenótipos indicados (com base na expressão da superfície CD27 e CD28), entre as células CD4+ CAR+ (FIG. 6C) e entre as células CD8+ CAR+ (FIG. 6D) nas composições, respectivamente, para composições geradas individualmente a partir do grupo de amostras dos 40 indivíduos com mieloma múltiplo. Para amostras individuais de leucaferese obtidas de uma variedade de pacientes com mieloma múltiplo, usando este processo exemplar para gerar composições de células modificadas a partir dessas amostras, observou-se que o intervalo de duração da parte do processo desde o início da ativação até a colheita foi entre 7 e 10 dias, e uma duração média entre essas amostras de aproximadamente 7,5 dias. Foi ainda determinado que o número médio de duplicações acumuladas da população ao longo do processo entre as diferentes amostras foi de aproximadamente 7,5.

[001191] Neste estudo, as populações de células T modificadas nas composições celulares produzidas pelo processo exemplar incluíam menos de 15% de células expressando um marcador apoptótico, e foram enriquecidas para um fenótipo de memória central em comparação com as amostras de partida e composições celulares geradas usando o processo alternativo exemplar.

Exemplo 16: Processo para gerar composições terapêuticas de células T modificadas que expressam um CAR anti-BCMA.

[001192] Um processo exemplar similar ao processo descrito no Exemplo 1 foi realizado para produzir composições modificadas contendo célula T CD4+ e CD8+ que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-BCMA. As células primárias CD4+ e CD8+ foram enriquecidas de amostras biológicas contendo PBMCs de uma amostra de leucaferese humana, inclusive de indivíduos com mieloma múltiplo (MM). As composições de células CD4+ enriquecidas e CD8+ enriquecidas foram criocongeladas separadamente e subsequentemente descongeladas e misturadas na relação de 1:1 de células T CD4+ viáveis para células T CD8+ viáveis, antes de realizar as etapas de estimulação, transdução e expansão.

[001193] Aproximadamente 300×10^6 células T (por exemplo, 150×10^6 CD4 + e 150×10^6 células T CD8 +) da composição de células mistas, a uma densidade de cerca de 3×10^6 células/mL, foram incubadas entre 18 e 30 horas na presença de pérolas revestidas com poliestireno paramagnético com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 ligados, na relação de 1:1 de conta para célula, em um meio de livre de soro exemplar (consulte, por exemplo, Exemplo 3) contendo IL-2, IL-7 e IL-15 recombinantes.

[001194] Após a incubação, pelo menos aproximadamente 100×10^6 e até aproximadamente 200×10^6 células viáveis da composição da celular incubada foram transduzidas, no meio livre de soro exemplar

com citocinas, com um vetor lentiviral que codifica o CAR anti-BCMA por espinoção durante 60 minutos seguidos de incubação por cerca de 18 a 30 horas a cerca de 37°C. O CAR continha um domínio de ligação ao antígeno scFv específico para BCMA, uma região transmembranar CD28, uma região de sinalização co-estimulatória de 4-1BB e um domínio de sinalização intracelular derivado de CD3-zeta.

[001195] As células transduzidas foram então expandidas pelo cultivo em um biorreator (por exemplo, um biorreator de movimento de balanço) em cerca de 500 mL do meio livre de soro exemplar contendo duas vezes a concentração de IL-2, IL-7 e IL-15, como usados durante as etapas de incubação e transdução. O meio não continha poloxâmere. Após uma densidade celular maior que, ou de cerca de $0,6 \times 10^6$ células/mL, ser considerada atingida, o meio foi adicionado em etapas com jatos de meio fresco sendo adicionados periodicamente, como entre cerca de 2 e cerca de 15 minutos para um volume de 1000 mL e as células foram cultivadas sob condições de balanço constante (sem perfusão) até uma densidade celular viável mimate maior que ou de cerca de $0,6 \times 10^6$ células/mL. Se a densidade celular viável ficou maior que $0,8 \times 10^6$ células/mL, foi iniciada uma combinação de carga/perfusão, na qual o primeiro meio foi adicionado de uma maneira de etapa a etapa, como indicado acima, até um volume alvo de 1000 mL, em seguida a perfusão foi iniciada como explicado abaixo. O meio foi então substituído por perfusão semicontínua com mistura contínua. A taxa de perfusão e/ou a velocidade de balanço foram aumentadas pelo menos uma vez durante a fase de expansão, à medida que a densidade celular aumentou. A taxa de perfusão foi aumentada pelo menos uma vez durante a fase de expansão, à medida que a densidade celular aumentou. O meio foi adicionado à cultura etapa a etapa com o volume total por dia determinado pela densidade celular viável (com taxas mais altas quando determinadas densidades foram atingi-

das), até uma taxa, por exemplo, resultando em aproximadamente 750 mL ou 1500 mL do meio fresco total adicionados à cultura por dia (com taxas mais altas quando maiores concentrações celulares foram atingidas), com jatos de meio fresco adicionados durante todo o dia periodicamente, tal como entre cerca de cada 0,5 e cerca de cada 1,5 ou 2 horas. As células foram colhidas uma vez ao dia após o número total de células nucleadas (TNC) ter atingido pelo menos ou pelo menos aproximadamente 1000×10^6 e em um ponto no qual o número de TNC havia atingido pelo menos ou pelo menos aproximadamente 2.400×10^6 células nucleadas totais, com pelo menos 85% de viabilidade. Após a colheita, as contas conjugadas com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 foram removidas de uma composição celular.

[00980] As células foram então formuladas e alíquotas da composição transferidas para recipientes, por exemplo, para armazenamento ou uso a jusante. Em algumas concretizações, composições formuladas ou porções das mesmas foram transferidas para bolsas de congelamento apropriados para a criopreservação e armazenamento de composições celulares, por exemplo, para administração potencial a indivíduos (tais como bolsas de congelamento CryoStore) e/ou composições ou partes delas foram transferidas para frascos ou outros recipientes, tal como para análise posterior das células. As células foram criopreservadas, como condições apropriadas para descongelamento a jusante e para administração. Em alguns casos, volumes de 30 mL de células formuladas foram usados em bolsas individuais. Em alguns casos, as células foram criopreservadas em uma concentração total variável de células, por exemplo, para permitir um número consistente ou concentração de células T CAR+ em cada dose no contexto das células para administração. Em algumas concretizações, o número de células CAR+CD3+ alvo é igual ou aproximadamente ao número desejado (tais como, aproximadamente $37,5 \times 10^6$) células CAR+CD3+ por

30 mL ou por bolsa, que em algumas formas de A realização envolve a variação da concentração total de células entre composições geradas por diferentes doadores ou pacientes.

[00981] Para amostras individuais de leucaferese obtidas de uma variedade de pacientes com mieloma múltiplo, determinou-se que, usando esse processo exemplar para gerar composições de célula modificada de tais amostras, resultaria em uma faixa de duração da parte do processo desde o início de ativação por colheita entre 5 e 8 dias, e duração média entre essas amostras de 5,5 dias. Foi ainda determinado que o número médio de duplicações acumulativas da população ao longo do processo para este grupo de amostras seria de aproximadamente 5.

[00982] O processo exemplar neste exemplo foi usado para gerar composições de células T modificadas a partir de várias amostras de mieloma humano múltiplo de leucaferese. Foram avaliados vários parâmetros, incluindo aqueles refletivos de fenótipo celular, função e modificação celular. A pureza das células T, a representação da linhagem das células T, a frequência de transdução e a funcionalidade foram substancialmente similares às composições geradas com esses produtos de leucaferese usando um processo descrito no Exemplo 1. Observou-se um número reduzido de duplicações populacionais e duração média de dias entre ativação de iniciação e colheita, com produção usando o processo exemplar neste exemplo em comparação com o processo exemplar no Exemplo 1. Em geral, percentagens similares ou aumentadas de células do fenótipo da memória central (e percentagens similares ou diminuídas das células do fenótipo da memória efetora) foram observados nas composições de células modificadas produzidas pelo processo exemplar neste exemplo em comparação com o exemplo 1.

[00983] A presente invenção não se destina a ser limitada em es-

copo às concretizações particulares descritas, que são fornecidas, por exemplo, para ilustrar vários aspectos da invenção. Várias modificações nos métodos de composição e descritos serão evidentes a partir da descrição e dos ensinamentos aqui contidos. Tais variações podem ser praticadas sem se afastar do verdadeiro escopo e espírito da invenção e devem se enquadrar no escopo da presente invenção.

Sequências

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
1	ESKYGPPCPPCP	espaçador (IgG4 articulação) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTG CCCT	espaçador (IgG4 articulação) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK	Articulação-C _H 3 es- paçador
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVWVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	Articulação-C _H 2-C _H 3 espaçador
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKEKEKEEQEERETKTPECPST QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKD AHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHS RLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALRE PAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFS PPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTF WAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLN ASRSLEVSIVTDH	IgD-articulação-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKD SLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA FENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEI SDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS NRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCV SCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSECIQC HPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCV KTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCT YGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVV ALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 de No. de Acesso P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP PSKP FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 de No. de Acesso P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRS	CD28 (LL a GG)
12	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEEGGCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	CD3 zeta
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	CD3 zeta
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	CD3 zeta

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDL HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFL IQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVV SLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINW KKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPD NCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYA DAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIP SIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG)5-P- em que P é prolina, G é glicina e S é serina	Ligante
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Ligante
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagc attcctcctgatccca	Sequência sinal de cadeia alfa GMCSFR
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Sequência sinal de cadeia alfa GMCSFR
26	MALPVTALLPLALLHA	Peptídeo sinal alfa CD8
27	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCASGYTFIDYYV YWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAMYYCARSQ RDGYMDYWGQGLTVTVSS	Anti-BCMA Pesada variável (V _H)
28	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQ HPGKAPKLMYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTV LG	Anti-BCMA Leve va- riável (V _H)
29	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Articulação-C _H 2-C _H 3 espaçador Homo sapiens

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
30	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSIN WVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRF AFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYA MDYWGQGTSTVTVSS	Anti-BCMA Pesada variável (V _H)
31	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHL IHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSG SRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGG TKLEIK	Anti-BCMA Leve Va- riável (V _H)
32	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGM NWKQAPGKGFKWMWINTYTGESYFADDFKG RFAFSVETSATTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEIY YGYDGGFAYWGQGLTVTVSA	Anti-BCMA Pesada Variável (V _H)
33	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAV SWYQQKPGQSPKLLIFSASYRYTGVDPDRFTGSGS GADFTLTISVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGG TKLDIK	Anti-BCMA Leve Va- riável (V _H)
34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWI GWVRQMPGKGLEWMGRIIPGSDTRYSPSFQGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYCARYSGS FDNWGQGLTVTVSS	Anti-BCMA Pesada variável (V _H)
35	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSV NWKQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGLNGLVFG GGTKLTVLG	Anti-BCMA Leve va- riável (V _H)
36	GGGGS	Ligante
37	GGGS	Ligante
38	GGGSGGGGSGGGGS	Ligante
39	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Ligante
40	SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA	Ligante
41	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRV TMTEDTSTDYMEYSSLRSEDTAVYYCARSYGS KSIVSYMDYWGQGLTVTVSS	Anti-BCMA Pesada variável (V _H)
42	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSSNIGSNV FWYQQLPGTAPKLVYRNNQRPSGVPDRFSVSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFG TGTKVTVLG	Anti-BCMA Leve va- riável (V _H)
43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGRV TITADESTSTAYMEYSSLRSEDTAVYYCARSYGS YRWEDSWGQGLTVTVSS	Anti-BCMA Pesada variável (V _H)

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
44	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYV FWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLASASYVF GTGTKVTVLG	Anti-BCMA Leve va- riável (V _H)
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV/SCKASGYTFTDYY MHWVRQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQKFKQ DRITVTRDTSSTGYMELTRLRSDDTAVYYCARS PYSGLVLDKWGQGLTVTVSS	Anti-BCMA Pesada variável (V _H)
46	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFD VHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKS SGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGYVF GTGTKVTVLG	Anti-BCMA Leve va- riável (V _H)
47	RASQDISKYLN	CDR L1
48	SRLHSGV	CDR L2
49	GNTLPYTFG	CDR L3
50	DYGVS	CDR H1
51	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
52	YAMDYWG	CDR H3
53	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQGTSVTVSS	V _H
54	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKL EIT	V _L
55	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKL EITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGPLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE WLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	scFv
56	KASQNVGTNVA	CDR L1
57	SATYRNS	CDR L2
58	QQYNRYPYT	CDR L3
59	SYWMN	CDR H1
60	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
61	KTISSVDFYFDY	CDR H3

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
62	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWM NWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQ ATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGQGTTVTVSS	V _H
63	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA WYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGS GTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGG TKLEIKR	V _L
64	GGGSGGGGSGGGGS	Ligante
65	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWM NWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQ ATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTIS SVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGT NVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTG SGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTS GGGTKLEIKR	scFv
66	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
67	HTSRLHS	LC-CDR2
68	QQGNTLPYT	LC-CDR3
69	Gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgccagcctg ggcgaccgggtgaccatcagctccgggcccagccaggacatcagc aagtacctgaactggatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagc tgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgcccagccg gttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacatctcca acctggaacaggaagatatgccacacttttgcagcagggcaac acactgccctacaccttggcggcgaacaagctggaatcaccg gcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagc accaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtg gccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtg agcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccagg aagggcctggaatggctggcgtgatctggggcagcagaccacct actacaacagcgcctgaagagccggctgacatcatcaaggaca acagcaagagccaggtgtcctgaagatgaacagcctgcagaccg acgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggc agctacgcatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtga gcagc	scFv de codificação de sequência
70	X1PPX2P X1 é glicina, cisteína ou arginina X2 é cisteína ou treonina	Articulação
71	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Ligante

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
72	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAG ADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDG SGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGG EARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVK PSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	Estreptavidina Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i> UniProt No. P22629
73	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAV GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWK NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSG TTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Estreptavidina mini- ma Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
74	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YIGARG NAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKN NYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGT TEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Estreptavidina de Muteína Ile44-Gly45- Ala-46-Arg47 Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
75	WSHPQFEK	Strep-tag® II
76	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSSWHPQFEK	Marcador Twin-Strep
77	WSHPQFEKGGGSGGGSSWHPQFEK	Marcador Twin-Strep
78	WSHPQFEKGGGSGGGSSAWSHPQFEK	Marcador Twin-Strep
79	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YIGAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWK NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSG TTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Estreptavidina de Muteína Ile44-Gly45- Ala-46-Arg47 Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
80	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	Peptídeo de ligação à estreptavidina Xaa é qualquer ami- noácido; Yaa é Gly ou Glu Zaa é Gly, Lys ou Arg
81	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	Peptídeo de ligação à estreptavidina, Strep-tag®
82	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa)n-Trp-Ser- His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	Módulos sequenciais de peptídeo de liga- ção à estreptavidina Xaa é qualquer ami- noácido; n é 8 ou 12

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
83	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)n- Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	Módulos sequenciais de peptídeo de ligação à estreptavidina n é 2 ou 3
84	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHQPFEK	Marcador Twin-Strep
85	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Marcador Twin-Strep
86	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAG ADGALTGTYY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATD GSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGG AEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKV KPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	Estreptavidina de Muteína Val44-Thr45-Ala46-Arg47 Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
87	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWK NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSG TTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Estreptavidina de Muteína Val44-Thr45-Ala46-Arg47 Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
88	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWK NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSG TTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Estreptavidina de Muteína Val44-Thr45-Ala46-Arg47 Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
89	His-Pro-Gln-Phe	Peptídeo de ligação à estreptavidina
90	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	Peptídeo de ligação à estreptavidina Oaa é Trp, Lys ou Arg; Xaa é qualquer aminoácido; Yaa é Gly ou Glu; Zaa é Gly, Lys ou Arg
91	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAG ADGALTGTYY IGAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDG SGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGG AEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVK PSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	Estreptavidina de Muteína Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>

No.	SEQUÊNCIA	ANOTAÇÃO
92	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YVTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWK NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSG TTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Estreptavidina de Muteína Val44-Thr45-Ala46-Arg47 e Glu117, Gly120, Try121 (muteína m1-9) Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
93	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIV TAG ADGALTGT YVT ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDG SGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAE EARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVK PSAAS	Estreptavidina de Muteína Val44-Thr45-Ala46-Arg47 e Glu117, Gly120, Try121 (muteína m1-9) Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>
94	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YESA VGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAW KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTS GTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Estreptavidina Mínima Espécie: <i>Streptomyces avidinii</i>

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma composição de células modificadas, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) combinar uma composição de células T CD4+ e uma composição de células T CD8+ em uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, desse modo gerando uma composição de entrada;

(b) incubar a composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias;

e em que a composição de entrada compreende pelo menos o total de 100×10^6 células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células CD4+ e CD8+ na composição de entrada são enriquecidas ou selecionadas de uma amostra primária de um indivíduo, opcionalmente em que as células CD4+ e CD8+ na composição de entrada são separadamente enriquecidas ou selecionadas de uma amostra primária de um indivíduo.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a composição de células T CD4+ compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células T CD4+.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a composição de células T CD8+ compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou

pelo menos 95% células T CD8+.

5. Método para a produção de uma composição de células modificadas, caracterizado pelo fato de que o método compreende incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que:

a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos o total de 100×10^6 células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e

as condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a incubação é realizada em um meio livre de soro.

7. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizados pelo fato de que a composição de entrada compreende pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% de células que são células T CD4+ ou células T CD8+.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende entre 100×10^6 e 500×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende a, ou cerca de 300×10^6 células T CD4+ e CD8+ totais.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o total de células T CD4+ e CD8+ são células viáveis.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma concentração entre 1×10^6 células/mL e 5×10^6 células/mL.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma concentração de, ou de cerca de 3×10^6 células/mL.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma relação entre 1,5:1 e 1:1,5 células CD4+ para CD8+.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma relação entre 1,2:1 e 0,8:1 células CD4+ para CD8+.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma relação de, ou de cerca de 1:1 células CD4+ para CD8+.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD45RA e CCR7.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a relação de células CD4+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 é de, ou é de cerca de 1.1:1.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracteriza-

do pelo fato de que a relação das células CD4+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD27 e CCR7 é de, ou é de cerca de 1,69:1.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CCR7 e superfície negativa para CD62L, opcionalmente em uma relação entre 2,0:1 a 1,5:1.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que também compreende:

introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um agente compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que:

o contato é por transfecção com um vetor, em que o vetor é um transposon, opcionalmente um transposon Sleeping Beauty (SB) ou um transposon Piggybac; ou

o contato é por transdução com um vetor viral.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que também compreende:

introduzir um receptor recombinante em células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que a introdução é realizada

em um meio livre de soro.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende menos que 300×10^6 células.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 25, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende entre 50×10^6 células e 200×10^6 células, opcionalmente cerca de 100×10^6 células, por exemplo, cerca de 100×10^6 células T CD4+ e CD8+.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 25, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende pelo menos cerca de 100×10^6 células e até cerca de 200×10^6 células, por exemplo, pelo menos cerca de 100×10^6 e até cerca de 200×10^6 células T CD4+ e CD8+.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 27, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração menor que 3×10^6 células/mL.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 28, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração entre $0,5 \times 10^6$ células/mL e 2×10^6 células/mL.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 29, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração de, ou de cerca de 1×10^6 células/mL.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 30, caracterizado pelo fato de que compreende ajustar uma composição da composição estimulada após incubação sob condições de estimulação antes de introduzir o receptor recombinante nas célu-

las da composição estimulada.

32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 31, caracterizado pelo fato de que as células da composição estimulada são células viáveis.

33. Método para a produção de uma composição de células modificadas, caracterizado pelo fato de que o método compreende introduzir um receptor recombinante em células de uma composição de célula T, a referida composição de célula T compreendendo uma concentração de pelo menos ou cerca de pelo menos 1×10^6 células viáveis por mL, em que pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% das células da composição de célula T são células T CD4+ ou células T CD8+.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a concentração da composição de célula T é menor que 5×10^6 células viáveis por mL.

35. Método de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que a composição de célula T compreende pelo menos ou pelo menos cerca de ou cerca de 100×10^6 células viáveis, ou em que a composição de célula T compreende pelo menos cerca de 100×10^6 células viáveis e até cerca de 200×10^6 células viáveis.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 35, caracterizado pelo fato de que a composição de célula T compreende menos que 300×10^6 células viáveis.

37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 36, caracterizado pelo fato de que a introdução compreende contatar as células T por transdução de um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

38. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 37, caracterizado pelo fato de que a introdução é realizada em um meio livre de soro.

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 38, caracterizado pelo fato de que uma ou mais células da composição de célula T são ativadas e/ou compreendem expressão de superfície do receptor LDL.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 39, caracterizado pelo fato de que pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% das células da composição celular:

- (i) expressam um marcador de superfície selecionado do grupo que consiste em HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L e 4-1BB;
- (ii) compreendem expressão intracelular de uma citocina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IFN-gama, TNF-alfa;
- (iii) estão na fase G1 ou posterior do ciclo celular; e/ou
- (iv) são capazes de se proliferarem.

41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 40, caracterizado pelo fato de que antes da introdução, as células da composição foram geradas por um processo compreendendo incubar uma composição de entrada compreendendo células T CD4+ e CD8+ sob condições de estimulação, em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que a incubação foi realizada em um meio livre de soro, opcionalmente a introdução é realizada em um meio livre de soro da mesma ou uma diferente composição como o meio livre de soro para a incubação.

43. Método para a produção de uma composição de células

modificadas, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada, em que:

a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+ e compreende pelo menos 100×10^6 células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e

as condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinalização intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias; e

(b) introduzir um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende contatar as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a incubação e/ou a introdução é realizada em meio livre de soro.

45. Método de acordo com a reivindicação 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que as células T CD4+ e CD8+ são células viáveis.

46. Método de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que as células da composição estimulada são células viáveis.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 46, caracterizado pelo fato de que a introdução é iniciada

dentro de 2 dias após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 2 dias após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 47, caracterizado pelo fato de que a introdução é iniciada dentro de 36 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 36 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 48, caracterizado pelo fato de que a introdução é iniciada dentro de 30 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 30 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 49, caracterizado pelo fato de que também compreende cultivar a composição modificada sob condições para promover a proliferação e/ou expansão das células modificadas, desse modo produzindo uma composição de saída compreendendo as células T modificadas.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o cultivo é realizado em um meio livre de soro.

52. Método para a produção de uma composição de células modificadas, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) incubar uma composição de entrada sob condições de estimulação, desse modo gerando uma composição estimulada; em que a composição de entrada compreende uma relação entre 2:1 e 1:2 de células T CD4+ para CD8+, e em que a composição de entrada compreende pelo menos 100×10^6 total células T CD4+ e CD8+ em uma concentração menor que 5×10^6 células/mL; e em que as referidas condições de estimulação compreendem a presença de um reagente estimulatório capaz de ativar um ou mais domínios de sinaliza-

ção intracelular de um ou mais componentes de um complexo de TCR e/ou um ou mais domínios de sinalização intracelular de uma ou mais moléculas coestimulatórias;

(b) introduzir um receptor recombinante em menos que 300×10^6 células da composição estimulada, desse modo gerando uma composição de célula modificada, em que a introdução compreende transduzir as células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante; e

(c) cultivar a composição modificada sob condições para promover a proliferação e/ou expansão das células modificadas, desse modo produzindo uma composição de saída compreendendo as células T modificadas.

53. Método de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que uma, duas, ou todas as etapas de incubação, introdução, e cultivo são realizadas em um meio livre de soro ou em meio livre de soro, opcionalmente em que os meios livres de soro têm a mesma composição ou diferentes composições.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 53, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende uma relação entre 1,5:1 e 1:1,5 células CD4+ para CD8+, entre 1,2:1 e 0,8:1 células CD4+ para CD8+, opcionalmente a, ou cerca de 1:1 de células T CD4+ para CD8+.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 54, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD45RA e CCR7.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que a relação de células CD4+ de superfície positiva para CD45RA e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para

CD45RA e CCR7 é de, ou é de cerca de 1.1:1.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 56, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a relação das células CD4+ que são de superfície positiva para CD27 e CCR7 para células CD8+ de superfície positiva para CD27 e CCR7 é de, ou é de cerca de 1,69:1.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 58, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada compreende células CD4+ e CD8+ que são de superfície positiva para CCR7 e superfície negativa para CD62L.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 59, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende menos que 300×10^6 células, opcionalmente entre 50×10^6 células viáveis e 200×10^6 células viáveis, e opcionalmente a, ou cerca de 100×10^6 células viáveis.

61. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 59, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende pelo menos cerca de 100×10^6 células viáveis e até cerca de 200×10^6 células viáveis.

62. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 61, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração menor que 3×10^6 células/mL.

63. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 62, caracterizado pelo fato de que, para a introdução, a composição estimulada compreende uma concentração entre $0,5 \times 10^6$ células/mL e 2×10^6 células/mL, opcionalmente a, ou cerca de 1×10^6

células/mL.

64. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 63, caracterizado pelo fato de ajustar a composição da composição estimulada após incubação sob condições de estimulação antes de introduzir o receptor recombinante nas células da composição estimulada.

65. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 64, caracterizado pelo fato de que a incubação é realizada na presença de uma ou mais citocinas, opcionalmente em um meio livre de soro.

66. Métodos de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

68. Método de acordo com a reivindicação 66 ou 67, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 68, caracterizado pelo fato de que pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% das células da composição estimulada:

(i) expressam um marcador de superfície selecionado do grupo que consiste em HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L e 4-1BB;

(ii) compreendem expressão intracelular de uma citocina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IFN-gama, TNF-alfa;

(iii) estão na fase G1 ou posterior do ciclo celular; e/ou

(iv) são capazes de se proliferarem.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 69, caracterizado pelo fato de que o reagente estimulatório compreende um agente primário que especificamente se liga a um membro de um complexo TCR, opcionalmente que especificamente se liga a CD3.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o reagente estimulatório também compreende um agente secundário que especificamente se liga a uma molécula coestimulatória de célula T, opcionalmente em que a molécula coestimulatória é selecionada de CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, ou ICOS.

72. Método de acordo com a reivindicação 70 ou 71, caracterizado pelo fato de que os agentes primários e/ou secundários compreendem um anticorpo, opcionalmente em que o reagente estimulatório compreende incubação com um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

73. Método de acordo com a reivindicação 71 ou 72, caracterizado pelo fato de que o agente primário e/ou agente secundário estão presentes sobre a superfície de um suporte sólido.

74. Método de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido é ou compreende uma conta.

75. Método de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a conta compreende um diâmetro maior que, ou maior do que cerca de 3,5 μm mas não mais do que cerca de 9 μm ou não mais do que cerca de 8 μm ou não mais do que cerca de 7 μm ou não mais do que cerca de 6 μm ou não mais do que cerca de 5 μm .

76. Método de acordo com a reivindicação 74 ou 75, carac-

terizado pelo fato de que a conta compreende um diâmetro de ou cerca de 4,5 μm .

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 76, caracterizado pelo fato de que a conta é inerte.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 77, caracterizado pelo fato de que a conta é ou compreende uma superfície de poliestireno.

79. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 78, caracterizado pelo fato de que a conta é magnética ou superparamagnética.

80. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 79, caracterizado pelo fato de que a relação de contas para células é menor que 3:1.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 80, caracterizado pelo fato de que a relação de contas para células é de, ou de cerca de 2:1 a 0,5:1, opcionalmente a relação de contas para células é de, ou de cerca de 1:1.

82. Método de acordo com a reivindicação 71 ou 72, caracterizado pelo fato de que o agente primário e agente secundário são reversivelmente ligados sobre a superfície de um reagente de partícula oligomérica compreendendo uma pluralidade de moléculas de estreptavidina ou de muteína de estreptavidina.

83. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 82, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante menos que 48 horas.

84. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 83, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante entre 12 e 36 horas, inclusive.

85. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 1 a 84, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante entre 18 e 30 horas, inclusive.

86. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada é incubada sob condições de estimulação durante, ou durante cerca de, 24 horas.

87. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 86, caracterizado pelo fato de que o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante menos que 48 horas.

88. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 87, caracterizado pelo fato de que o contato, opcionalmente transdução, é realizado entre 12 e 36 horas, inclusive.

89. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 88, caracterizado pelo fato de que o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante entre 18 e 30 horas, inclusive.

90. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 89, caracterizado pelo fato de que o contato, opcionalmente transdução, é realizado durante, ou durante cerca de, 24 horas.

91. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 90, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é um vetor retroviral.

92. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 91, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é um vetor lentiviral ou vetor gamarretroviral.

93. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 92, caracterizado pelo fato de que o contato, opcionalmente transdução, é realizado na ausência de um adjuvante de transdução.

94. Métodos de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 93, caracterizado pelo fato de que a introdução é realizada

na presença de uma ou mais citocinas, opcionalmente em um meio livre de soro.

95. Métodos de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante.

96. Método de acordo com a reivindicação 94 ou 95, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

97. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 94 a 96, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 10 e 200 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 1.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 10 e 200 IU/mL de IL-15 recombinante.

98. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 97, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma parte do cultivo é realizada com mistura e/ou perfusão.

99. Método de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma parte do cultivo é realizada com perfusão em uma taxa de, de cerca de, ou de pelo menos 500 mL/dia, 600 mL/dia, 700 mL/dia, 750 mL/dia, 800 mL/dia, 900 mL/dia, 1.000 mL/dia, 1.200 mL/dia, 1.400 mL/dia, 1.500 mL/dia, 1.600 mL/dia, 1.800 mL/dia, e/ou 2.000 mL/dia.

100. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma primeira parte do cultivo é realizada com uma taxa de perfusão de, de cerca de, ou de pelo menos 500 mL/dia, 750 mL/dia, ou 1.000 mL/dia, e em que pelo menos uma segunda parte do cultivo é realizada com uma taxa de perfu-

são de, de cerca de, ou de pelo menos 1.200 mL/dia, 1.400 mL/dia, ou 1.500 mL/dia.

101. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 100, caracterizado pelo fato de que a perfusão é iniciada e/ou aumentada quando as células atingem uma densidade específica.

102. Método de acordo com a reivindicação 101, caracterizado pelo fato de que a densidade específica é de, é de cerca de, ou é de pelo menos $0,4 \times 10^6$ células, $0,5 \times 10^6$ células, $0,6 \times 10^6$ células, $0,8 \times 10^6$ células, $1,0 \times 10^6$ células, $1,2 \times 10^6$ células, $1,4 \times 10^6$ células, $1,6 \times 10^6$ células, $1,8 \times 10^6$ células, $2,0 \times 10^6$ células, $2,2 \times 10^6$ células, ou $2,4 \times 10^6$ células.

103. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 102, caracterizado pelo fato de que a perfusão é iniciada e/ou aumentada para uma taxa de, ou de cerca de 750 mL/dia quando as células atingem uma densidade de, ou de cerca de $0,6 \times 10^6$ células/mL.

104. Método de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que a perfusão é iniciada e/ou aumentada para uma taxa de, ou de cerca de 1500 mL/dia quando as células atingem uma densidade de, ou de cerca de $2,0 \times 10^6$ células/mL.

105. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 104, caracterizado pelo fato de que o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas, opcionalmente em um meio livre de soro.

106. Método de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas são selecionadas de IL-2 recombinante, IL-7 recombinante, e/ou IL-15 recombinante.

107. Método de acordo com a reivindicação 105 ou 106, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas com-

preendem: entre 50 e 400 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 2.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e/ou entre 50 e 400 IU/mL de IL-15 recombinante.

108. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 105 a 107, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas compreendem: entre 50 e 400 IU/mL de IL-2 recombinante; entre 100 IU/mL e 2.000 IU/mL de IL-7 recombinante; e entre 50 e 400 IU/mL de IL-15 recombinante.

109. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 108, caracterizado pelo fato de que o cultivo é iniciado dentro de 3 dias após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 3 dias após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

110. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 109, caracterizado pelo fato de que o cultivo é iniciado dentro de 60 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 60 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

111. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 110, caracterizado pelo fato de que o cultivo é iniciado dentro de 48 horas após o início da incubação sob condições de estimulação e/ou dentro de 48 horas após as células T CD4+ e as células T CD8+ da composição de entrada serem combinadas.

112. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 111, caracterizado pelo fato de que o cultivo é realizado pelo menos até a composição compreender um número limítrofe de células T, número limítrofe de células T viáveis, concentração limítrofe de células T, concentração limítrofe de células T viáveis.

113. Método de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que o número limítrofe de células T ou número limí-

trofe de células T viáveis é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 2.400×10^6 ou 5.500×10^6 o número total de células nucleadas, opcionalmente em que a viabilidade do número total de células nucleadas é de cerca de ou pelo menos cerca de 75% ou cerca de ou pelo menos cerca de 85%.

114. Método de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que o cultivo é continuado durante pelo menos um dia após o número limítrofe de células T, número limítrofe de células T viáveis, concentração limítrofe de células T, concentração limítrofe de células T viáveis ser atingido, opcionalmente em que o número limítrofe de células T ou número limítrofe de células T viáveis é de, é de cerca de, ou é de pelo menos 900×10^6 , 1200×10^6 , ou 3500×10^6 o número total de células nucleadas.

115. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 114, caracterizado pelo fato de que o número limítrofe de células T é de, ou é de cerca de 2.400×10^6 do número total de células nucleadas com cerca de ou pelo menos cerca de 85% de viabilidade.

116. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 114, caracterizado pelo fato de que o número limítrofe de células T é de, ou é de cerca de 5500×10^6 do número total de células nucleadas.

117. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 116, caracterizado pelo fato de que compreende coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo.

118. Método de acordo com as reivindicações 50 a 117, caracterizado pelo fato de que compreende coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo, em que as células da composição de saída são coletadas pelo menos 9 dias após o início da incubação sob condições de estimulação.

119. Método de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 50 a 118, caracterizado pelo fato de que compreende coletar células da composição de saída subsequente ao cultivo, em que as células da composição de saída são coletadas pelo menos 10 dias após o início da incubação sob condições de estimulação.

120. Método de acordo com a reivindicação 118 ou 119, caracterizado pelo fato de que compreende um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída, que é dentro de 8 a 25 dias, opcionalmente entre 14 a 18 dias.

121. Método de acordo com a reivindicação 118 ou 119, caracterizado pelo fato de que compreende um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída que é dentro de 9 dias a 21 dias.

122. Método de acordo com a reivindicação 118 ou 119, caracterizado pelo fato de que compreende um intervalo de confiança de 95% do período de tempo entre o início da incubação e a coleta das células da composição de saída que é dentro de 9 dias a 16 dias.

123. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 122, caracterizado pelo fato de que também compreende formular as células da composição de saída para crioconservação e/ou administração a um indivíduo, opcionalmente na presença de um excipiente farmacologicamente aceitável.

124. Método de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que as células da composição de saída são formuladas na presença de um crioprotetor.

125. Método de acordo com a reivindicação 124, caracterizado pelo fato de que o crioprotetor compreende DMSO.

126. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 125, caracterizado pelo fato de que as células da composição de saída são formuladas em um recipiente, opcionalmente um

frasconete ou uma bolsa.

127. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 126, caracterizado pelo fato de que também compreende isolar as células T CD4+ e/ou CD8+ de uma amostra biológica antes da incubação.

128. Método de acordo com a reivindicação 127, caracterizado pelo fato de que o isolamento compreende, selecionar células com base na expressão de superfície de CD4 e/ou CD8, opcionalmente por seleção positiva ou negativa.

129. Método de acordo com a reivindicação 127 ou 128, caracterizado pelo fato de que o isolamento compreende realizar a seleção com base na imunoafinidade.

130. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 127 a 129, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica compreende células T primárias obtidas de um indivíduo.

131. Método de acordo com a reivindicação 130, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um indivíduo humano.

132. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 127 a 131, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é ou compreende uma amostra de sangue total, uma amostra da camada leucocitária, uma amostra de célula mononuclear de sangue periférico (PBMC), uma amostra de célula T não fracionada, uma amostra de linfócito, uma amostra de glóbulos brancos, um produto de aferese, ou um produto de leucaferese.

133. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 132, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é capaz de ligação a um antígeno alvo que é associado com, específico para, e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

134. Método de acordo com a reivindicação 133, caracteri-

zado pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória, ou um tumor ou um câncer.

135. Método de acordo com a reivindicação 133 ou 134, caracterizado pelo fato de que o antígeno alvo é um antígeno de tumor.

136. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 133 a 135, caracterizado pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado dentre 5T4, 8H9, integrinas avb6, B7-H6, antígeno de maturação de célula B (BCMA), CA9, um antígeno de testículos de câncer, anidrase carbônica 9 (CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, antígeno de superfície de hepatite B, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), antígeno carcinoembriônico (CEA), CE7, uma ciclina, ciclina A2, c-Met, antígeno dual, EGFR, glicoproteína 2 epitelial (EPG-2), glicoproteína 40 epitelial (EPG-40), EPHa2, efrina B2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR vIII, receptor de estrogênio, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína de ligação a folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, glicoproteína-3 (GPC3), Membro D do grupo 5 de classe C de receptor acoplado à proteína G (GPRC5D), Her2/neu (tirosina cinase receptora erbB2), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13R α 2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve kappa, Lewis Y, Molécula de adesão de célula L1 (L1-CAM), Antígeno associado ao melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, MAGE-A10, mesotelina (MSLN), murine CMV murino, mucina 1 (MUC1), ligantes MUC16, NCAM, NKG2D, NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP1, também conhecida como TYRP1 ou gp75),

Proteína 2 relacionada à tirosinase (TRP2, também conhecida como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), Receptores VEGF, VEGF-R2, Tumor 1 de Wilms (WT-1), um antígeno específico de patógeno e um antígeno associado com um marcador universal.

137. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 136, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não-TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

138. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 137, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

139. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 138, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é um CAR anti-BCMA.

140. Método de acordo com a reivindicação 138 ou 139, caracterizado pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação ao antígeno.

141. Método de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação ao antígeno é ou compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que opcionalmente é um fragmento de cadeia única.

142. Método de acordo com a reivindicação 141, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

143. Método de acordo com a reivindicação 141 ou 142, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende um scFv.

144. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 138 a 143, caracterizado pelo fato de que o receptor de antígeno

quimérico também compreende um espaçador e/ou uma região de articulação.

145. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 138 a 144, caracterizado pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico compreende uma região de sinalização intracelular.

146. Método de acordo com a reivindicação 145, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular.

147. Método de acordo com a reivindicação 146, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primário, um domínio de sinalização que é capaz de induzir um sinal de ativação primário em uma célula T, um domínio de sinalização de um componente de receptor de célula T (TCR), e/ou um domínio de sinalização compreendendo um *motif* de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM).

148. Método de acordo com a reivindicação 146 ou 147, caracterizado pelo fato de que o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3 ζ), ou uma porção de sinalização da mesma.

149. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 145 a 148, caracterizado pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico também compreende um domínio de transmembrana disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

150. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 145 a 149, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização intracelular também compreende uma região de sinalização coestimulatória.

151. Método de acordo com a reivindicação 150, caracteri-

zado pelo fato de que a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma porção de sinalização da mesma.

152. Método de acordo com a reivindicação 150 ou 151, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma CD28, uma 4-1BB ou uma ICOS ou uma porção de sinalização da mesma.

153. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 150 a 152, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização coestimulatória está entre o domínio de transmembrana e a região de sinalização intracelular.

154. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 113 a 153, caracterizado pelo fato de que a composição de saída compreendendo o número limítrofe ou número maior de células é produzido entre mais que ou mais que cerca de 85%, mais que ou mais que cerca de 90% ou mais que ou mais que cerca de 95% das iterações do método.

155. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 154, caracterizado pelo fato de que o meio livre de soro compreende:

0,5 mM a 5 mM de uma forma de dipeptídeo de L-glutamina em um meio de base;

0,5 mM a 5 mM de L-glutamina; e

pelo menos uma proteína, em que o meio é livre de soro.

156. Método de acordo com a reivindicação 155, caracterizado pelo fato de que a forma de dipeptídeo de L-glutamina é L-alanil-L-glutamina.

157. Método de acordo com a reivindicação 155 ou 156, caracterizado pelo fato de que a concentração da forma de dipeptídeo de L-glutamina no meio livre de soro é de, ou é de cerca de 2 mM.

158. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 155 a 157, caracterizado pelo fato de que a concentração de L-glutamina no meio livre de soro é de, ou é de cerca de 2 mM.

159. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 155 a 158, caracterizado pelo fato de que a referida pelo menos uma proteína compreende uma ou mais de albumina, insulina ou transferrina, opcionalmente uma ou mais de uma albumina, insulina ou transferrina humana ou recombinante.

160. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende células modificadas produzidas por um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 159 ou 165 a 177.

161. Composição de acordo com a reivindicação 160, caracterizada pelo fato de que também compreende um veículo farmacologicamente aceitável.

162. Composição de acordo com a reivindicação 160 ou 161, caracterizada pelo fato de que compreende um crioprotetor, opcionalmente DMSO.

163. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 160 a 162, e instruções para a administração da composição de saída a um indivíduo.

164. Artigo de fabricação de acordo com a reivindicação 163, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem uma doença ou condição, opcionalmente em que o receptor recombinante especificamente reconhece ou especificamente se liga a um antígeno associado com, ou expresso ou presente em células de, a doença ou condição.

165. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 159, caracterizado pelo fato de que durante pelo menos uma parte do cultivo, as células são monitoradas quanto à viabilidade celular, concentração, densidade, número, ou uma combinação dos

mesmos.

166. Método de acordo com a reivindicação 165, caracterizado pelo fato de que o monitoramento é realizado por um método óptico, opcionalmente microscopias.

167. Método de acordo com a reivindicação 165 ou 166, caracterizado pelo fato de que o monitoramento é realizado por microscopias de campo brilhante, microscopia por fluorescência, microscopias por contraste de interferência diferencial, microscopias de contraste de fase, microscopias por holografia digital (DHM), microscopias por holografia digital diferencial (DDHM), ou uma combinação dos mesmos.

168. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 165 a 167, caracterizado pelo fato de que o monitoramento é realizado por microscopias por holografia digital diferencial (DDHM).

169. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 165 a 168, caracterizado pelo fato de que o monitoramento é realizado intermitentemente ou continuamente durante a referida pelo menos uma parte do cultivo, opcionalmente é realizado pelo menos a cada 1 hora, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, ou 26 horas durante o cultivo.

170. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 165 a 169, caracterizado pelo fato de que o monitoramento é realizado até as células atingirem o número limítrofe de células T, o número limítrofe de células T viáveis, a concentração limítrofe de células T ou a concentração limítrofe de células T viáveis.

171. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 165 a 170, caracterizado pelo fato de que o monitoramento e cultivo são realizados em um sistema fechado.

172. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 159 e 165 a 171, caracterizado pelo fato de que:

pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são de um fenótipo de memória;

em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são de um fenótipo de memória central;

em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+; e/ou

em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CCR7+/CD45RA- ou são CCR7+/CD45RO+.

173. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 159 e 165 a 172, caracterizado pelo fato de que iterações do método produzem uma pluralidade das composições de saída, opcionalmente de amostras biológicas humanas em que o método é realizado entre uma pluralidade de diferentes pacientes individuais, em que:

a percentagem média de células de um fenótipo de memória na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca

de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

a percentagem média de células de um fenótipo de memória central na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

a percentagem média de células que são CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, granzima B-, e/ou CD127+ na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

a percentagem média de células que são CCR7+/CD45RA- ou CCR7+/CD45RO+ na pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

a percentagem média de células T CD4+ de memória central nas células T CD4+ modificadas, opcionalmente CAR+CD4+ T células, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%;

a percentagem média de células T CD8+ de memória central nas células T CD8+ modificadas, opcionalmente CAR+CD8+ T células, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca

de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%; e/ou a percentagem média de células T de memória central, opcionalmente células T de memória central CD4+ e células T de memória central CD8+, nas células T modificadas, opcionalmente CAR+ T células, da pluralidade das composições de saída é entre cerca de 40% e cerca de 65%, entre cerca de 40% e cerca de 45%, entre cerca de 45% e cerca de 50%, entre cerca de 50% e cerca de 55%, entre cerca de 55% e cerca de 60%, ou entre cerca de 60% e cerca de 65%.

174. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 159 e 165 a 173, caracterizado pelo fato de que os métodos produzem composições de saída exibindo uma característica predefinida, opcionalmente um número limítrofe de células expressando o CAR na composição de saída, em pelo menos cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 99%, cerca de 100%, ou 100% das amostras biológicas humanas em que é realizada entre uma pluralidade de diferentes pacientes individuais.

175. Método de acordo com a reivindicação 174, caracterizado pelo fato de que vários diferentes pacientes individuais compreendem indivíduos tendo uma doença ou condição.

176. Método de acordo com a reivindicação 175, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é um câncer.

177. Método de acordo com a reivindicação 176, caracterizado pelo fato de que o câncer é um câncer hematológico, opcionalmente mieloma múltiplo.

178. Composição de acordo com a reivindicação 160, caracterizada pelo fato de que:

pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são de um fenótipo de memória;

em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição são de um fenótipo de memória central;

em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição are CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, granzima B-, e/ou CD127+; e/ou

em que pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais que 95% das células na composição de saída são CCR7+/CD45RA- ou são CCR7+/CD45RO+.

FIG. 1A

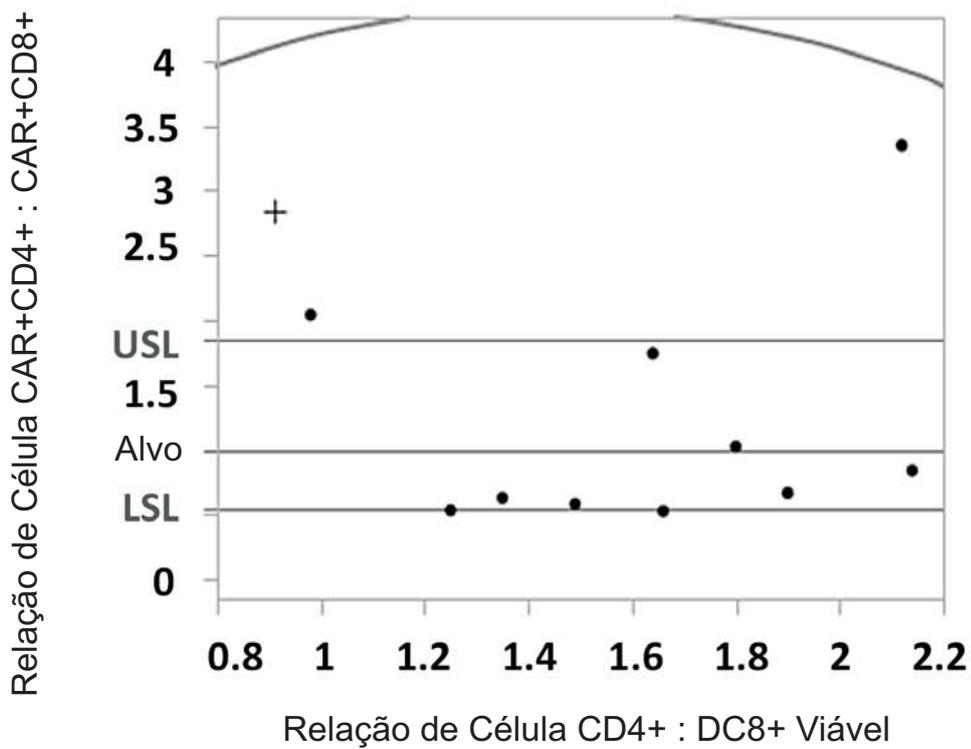


FIG. 1B

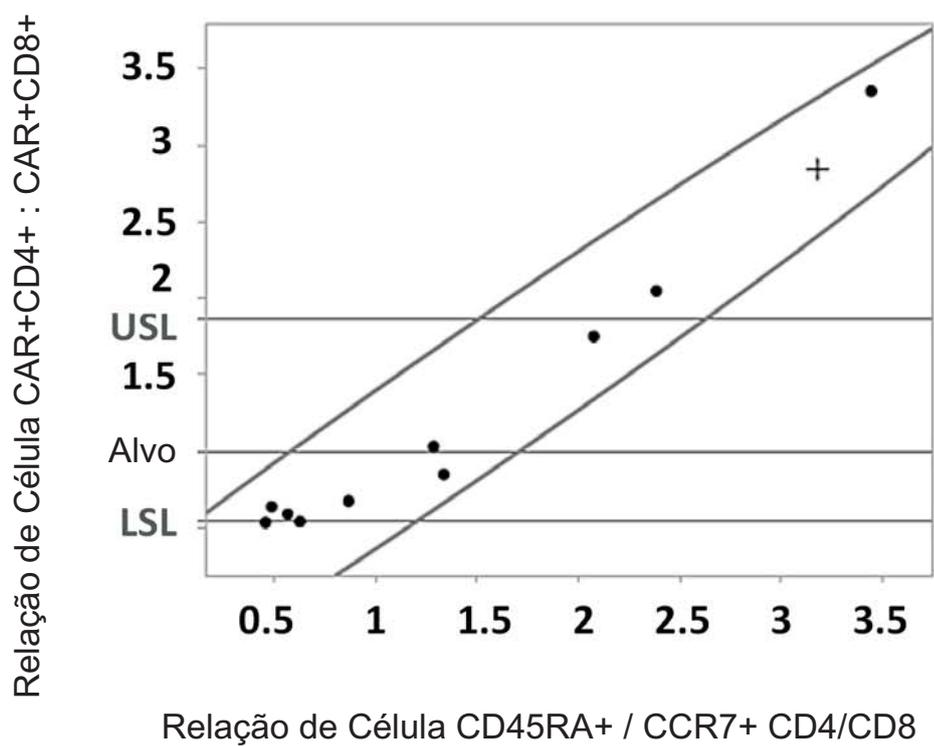
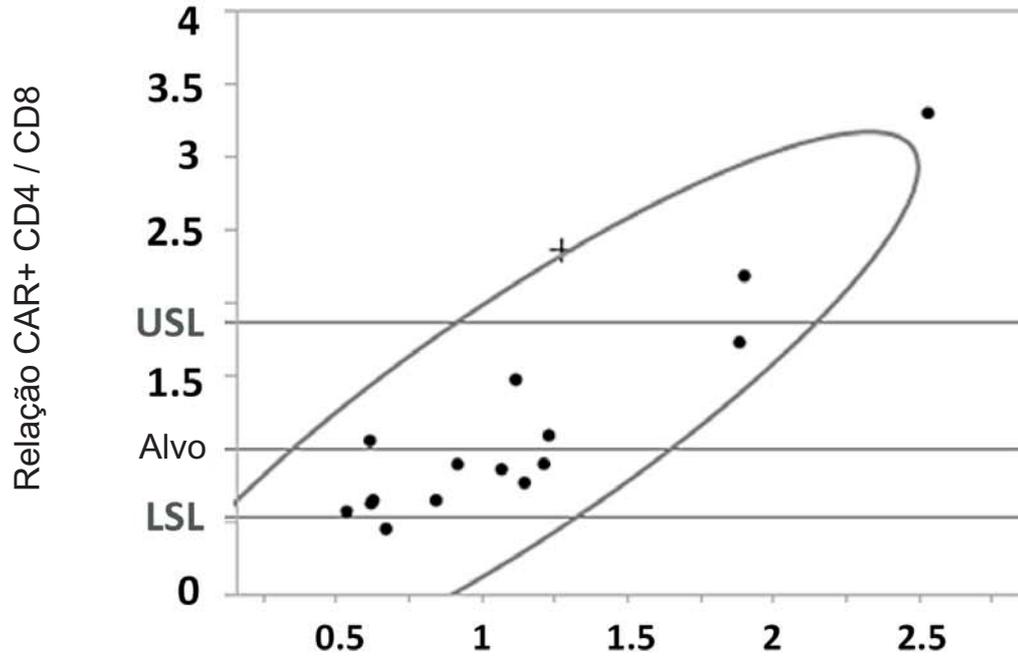
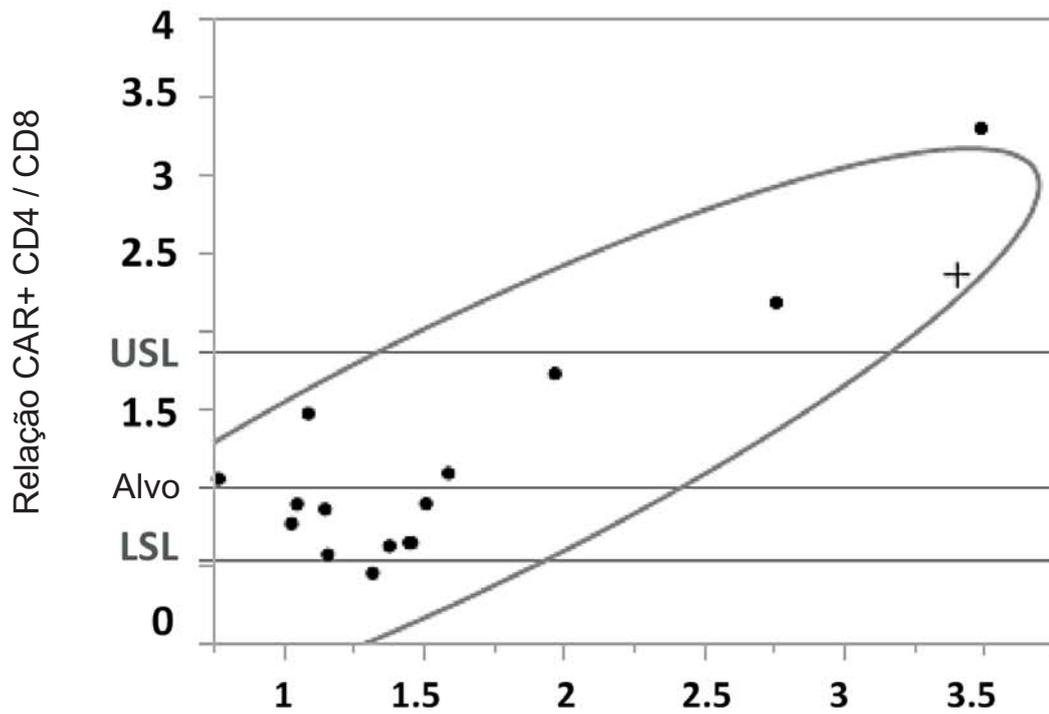


FIG. 2A



Relação Média de CD45RA+ / CCR7+ CD4 / CD8 com base no doador

FIG. 2B



Relação de Percentual Médio de CD62L- / CCR7+ CD4 / CD8

FIG. 2C

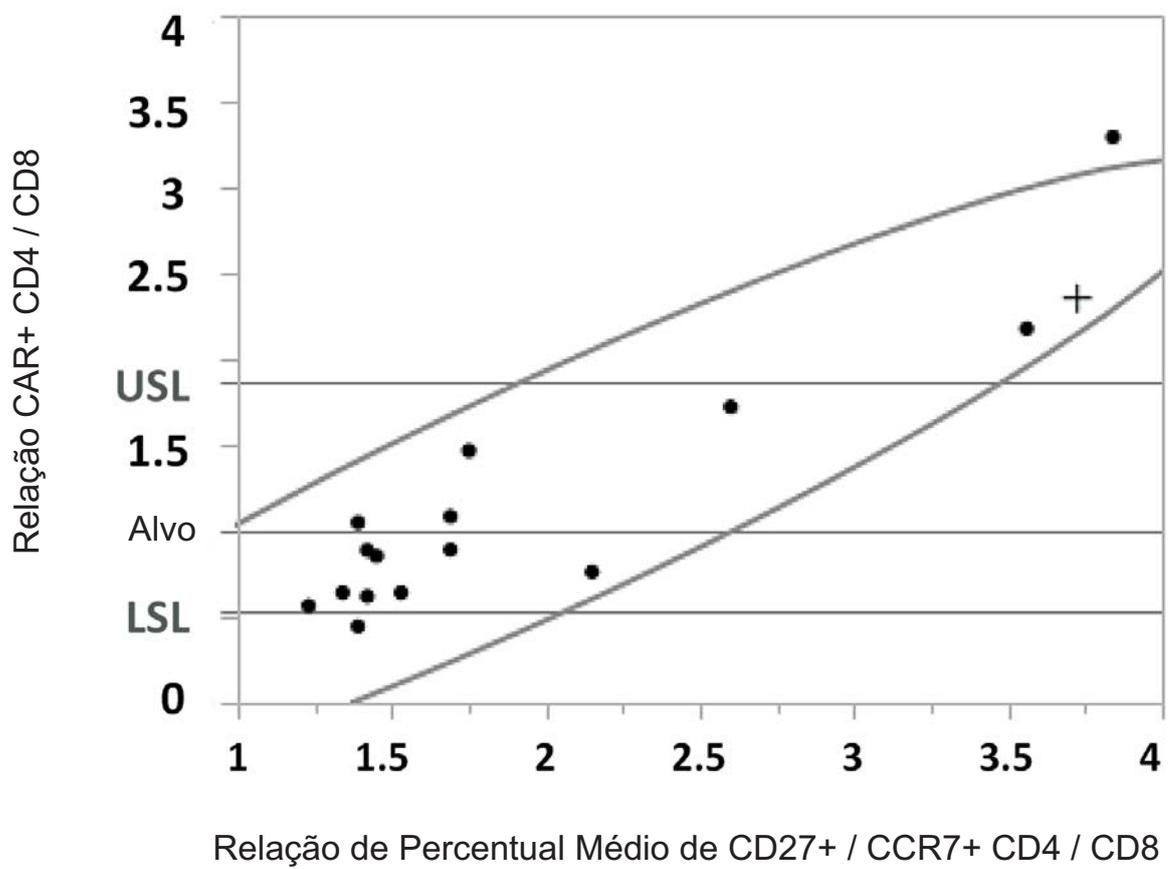


FIG. 3A

Ajuste Bivariado de Relação de CAR+ CD4 / CD8 por Relação de Percentual de Entrada de CD27+ / CCR7+ CD4 / CD8

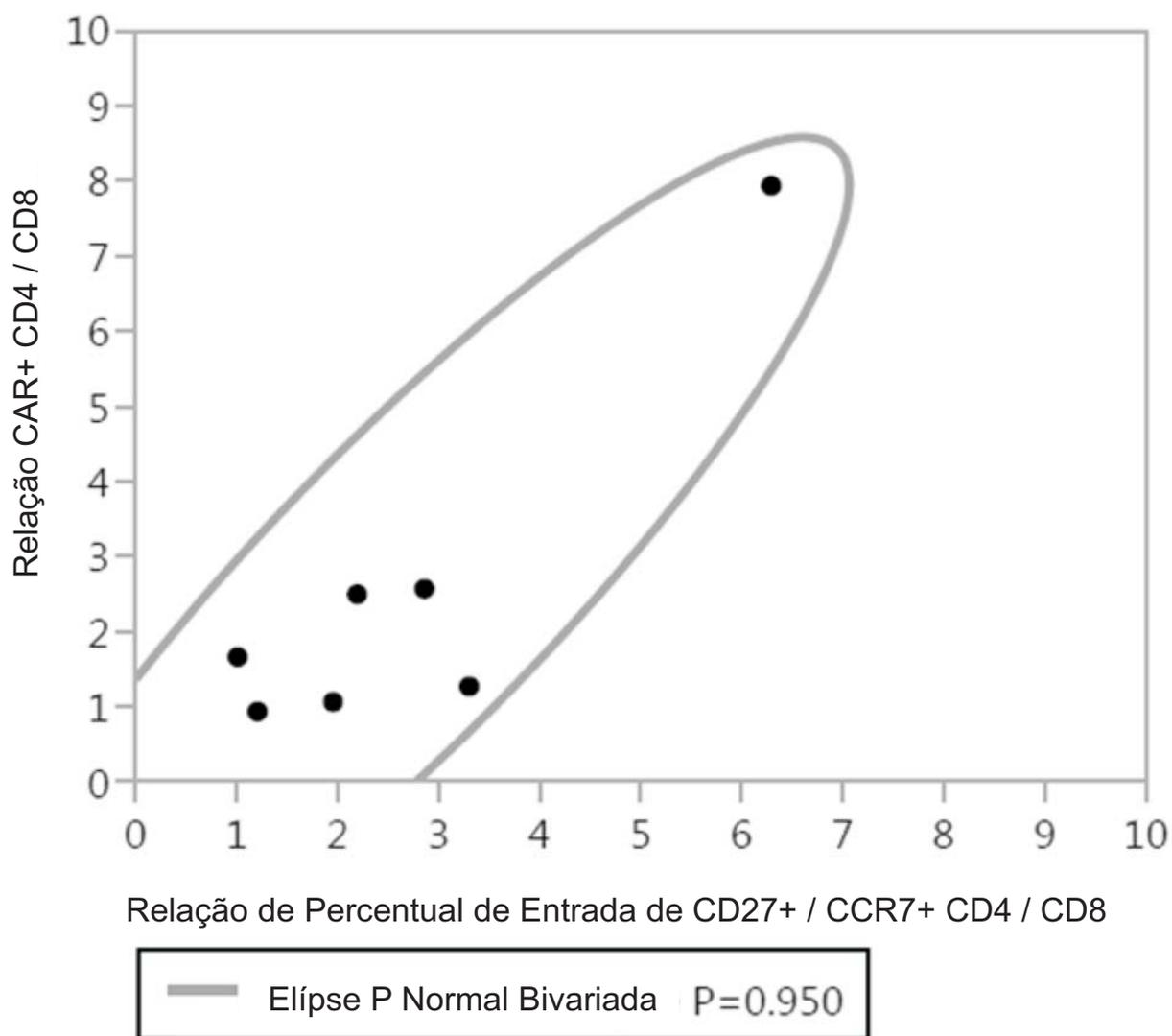
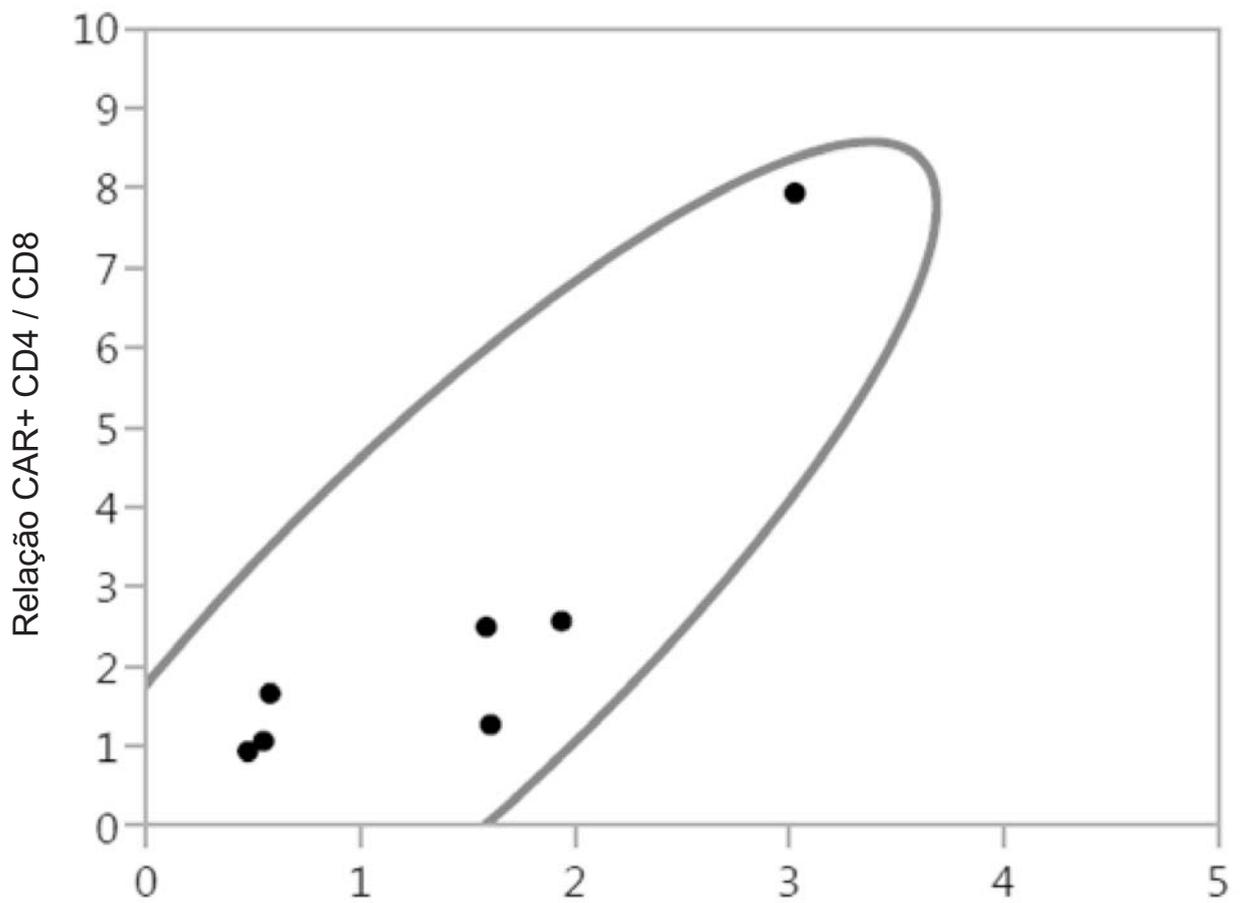


FIG. 3B

Ajuste Bivariado de Relação de CAR+ CD4 / CD8 por Relação de Percentual de Entrada de CD27+ / CCR7+ CD4 / CD8



Relação de Percentual de Entrada de CD45RA+CCR7+ CD4 / CD8

— Elipse P Normal Bivariada : P=0.950

FIG. 3C

Ajuste Bivariado de Relação de CAR+ CD4 / CD8 por Relação de Percentual de Entrada de CD62L-CCR7+ CD4 / CD8

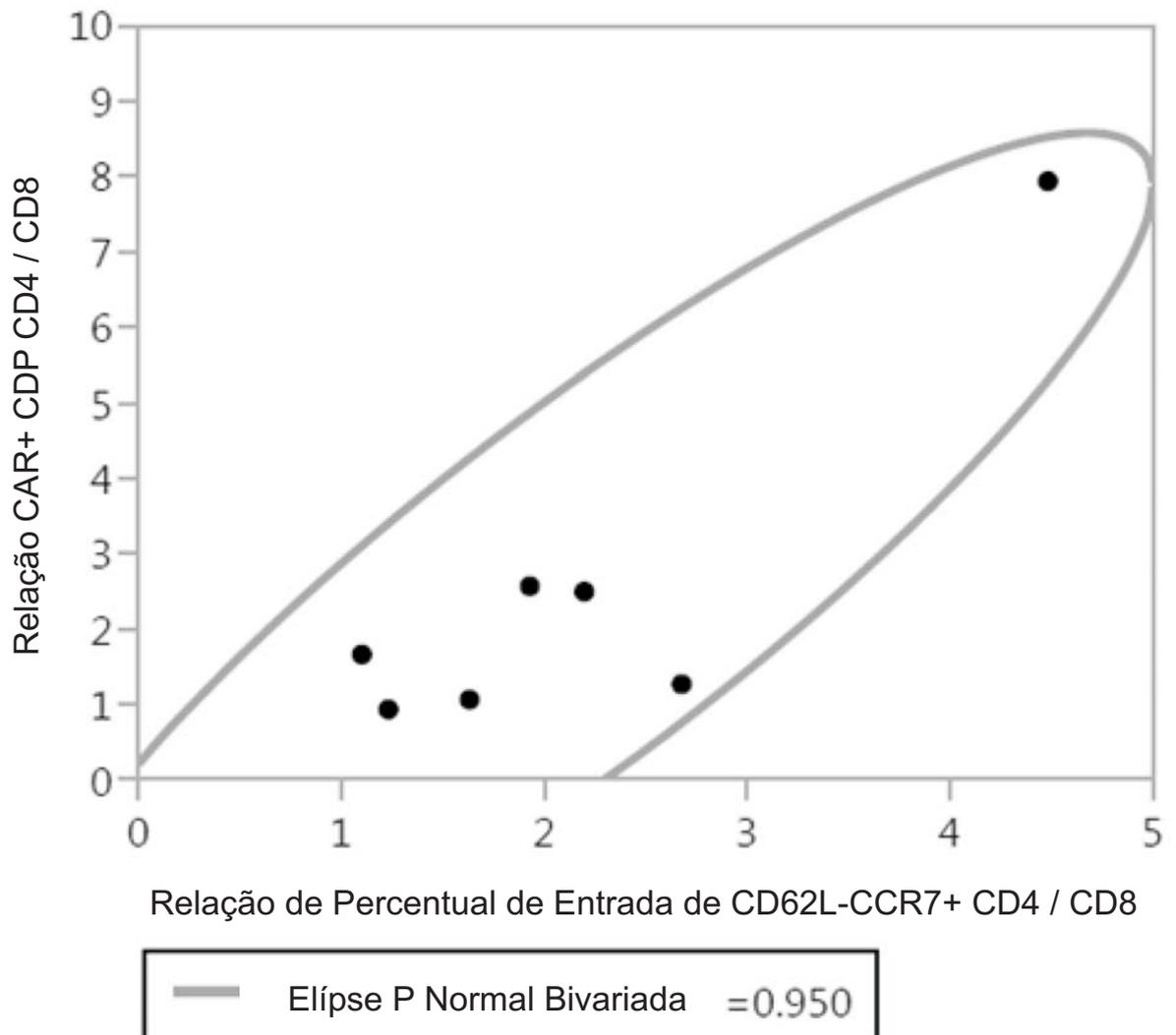


FIG. 4A

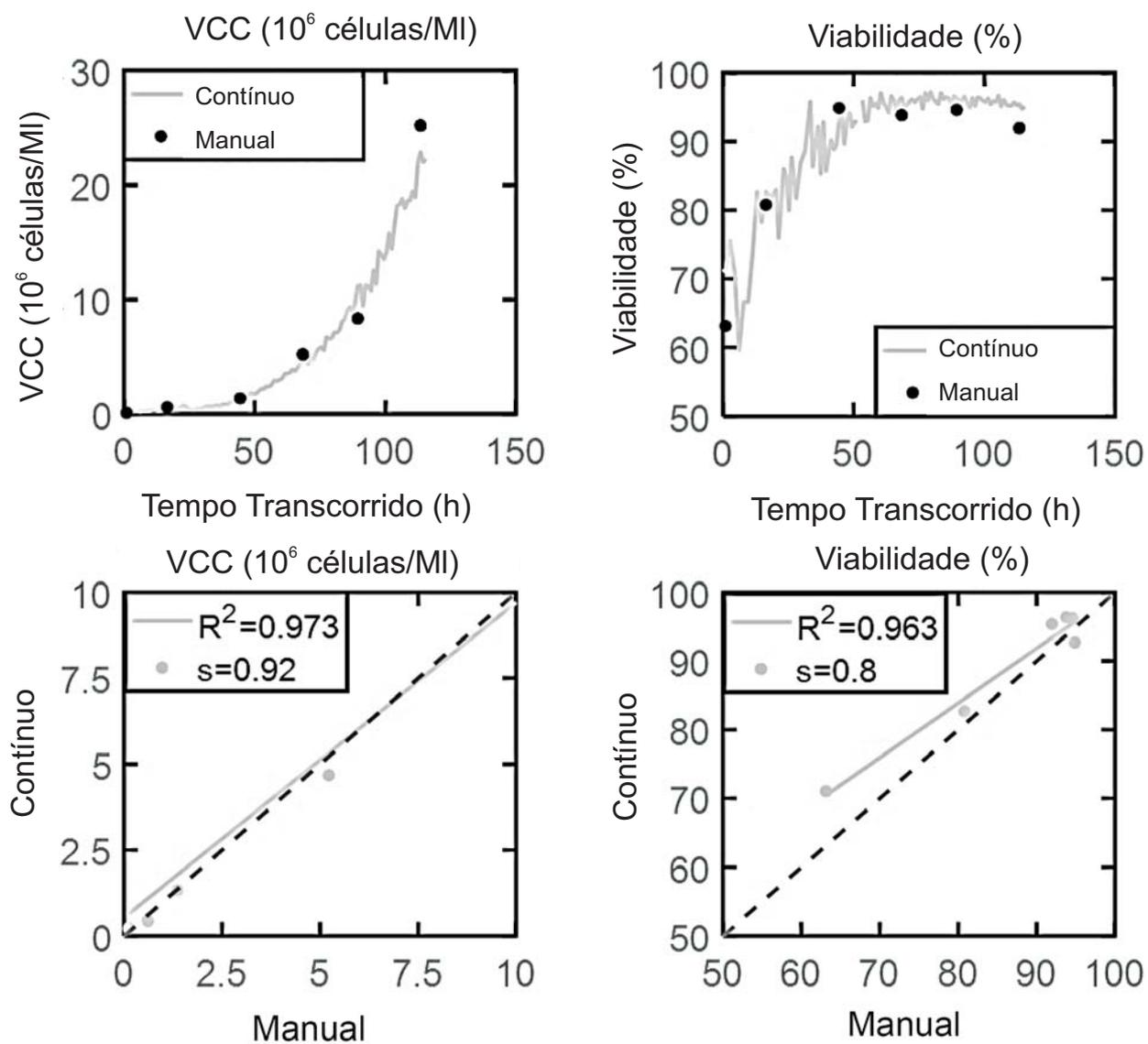


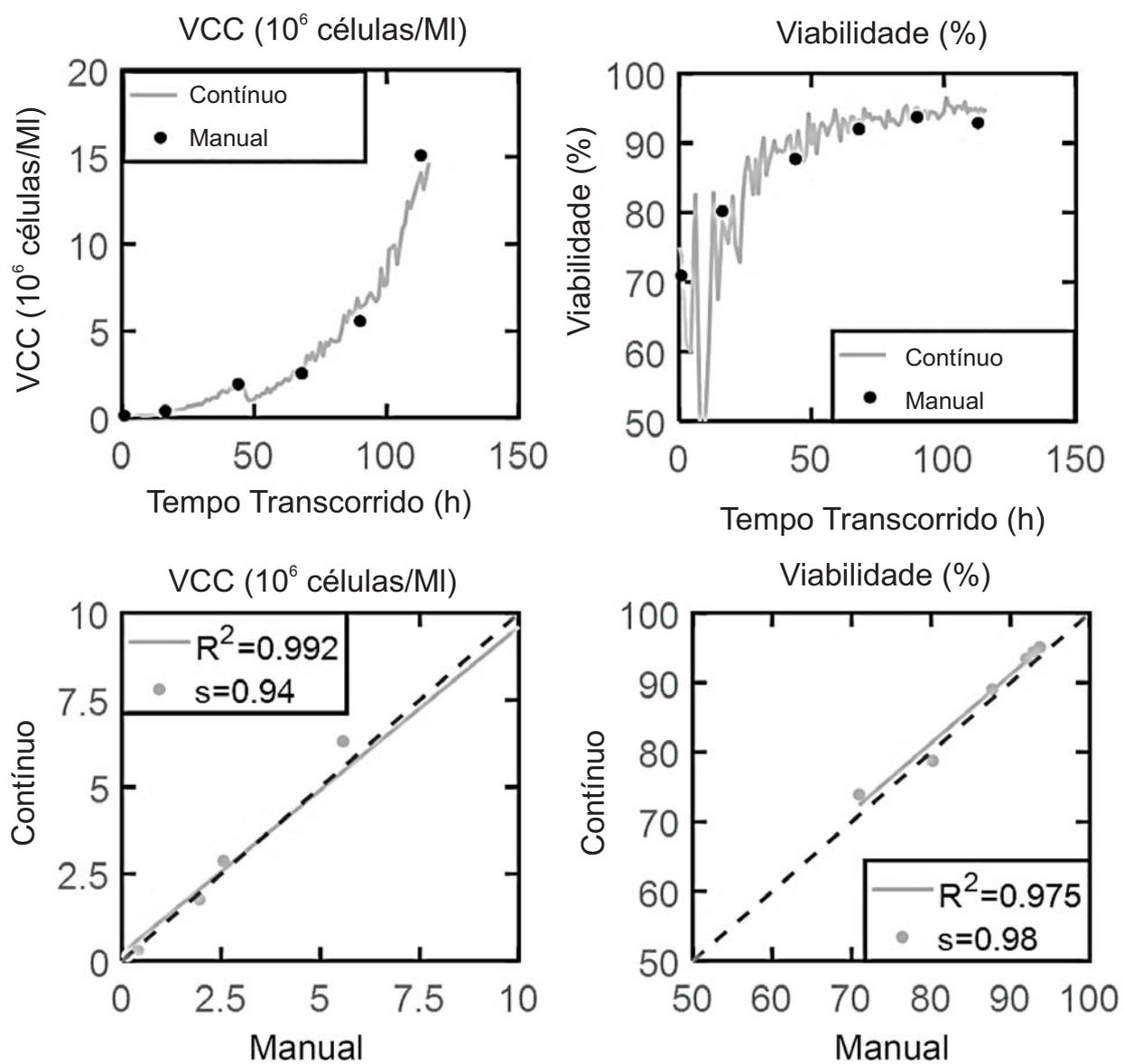
FIG. 4B

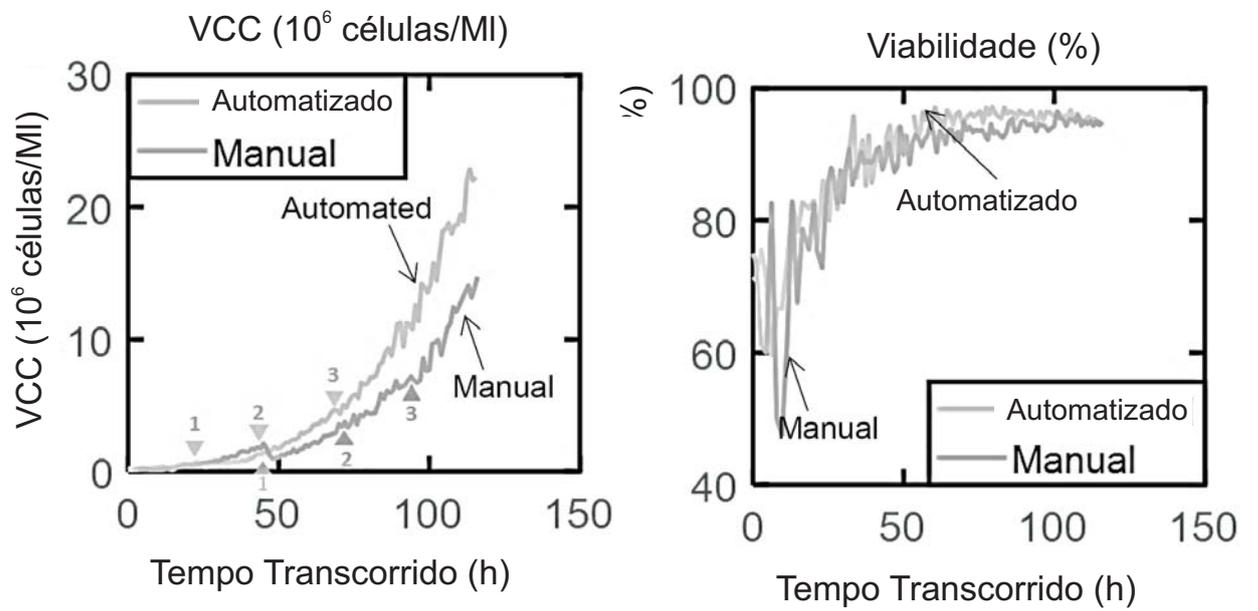
FIG. 5

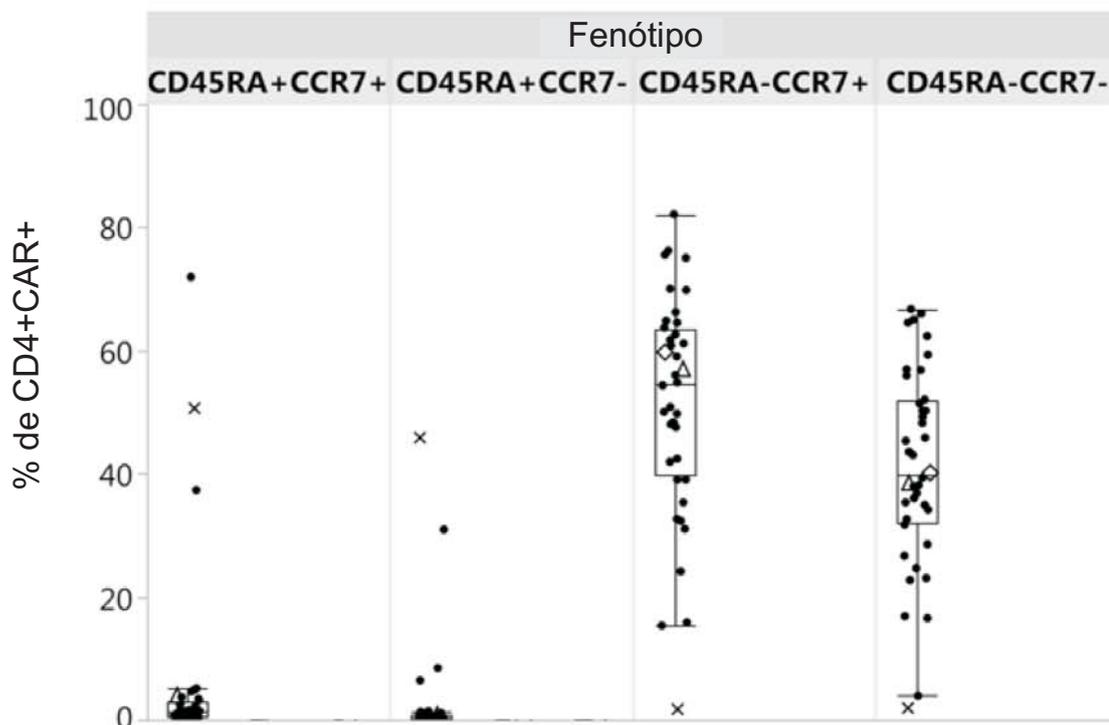
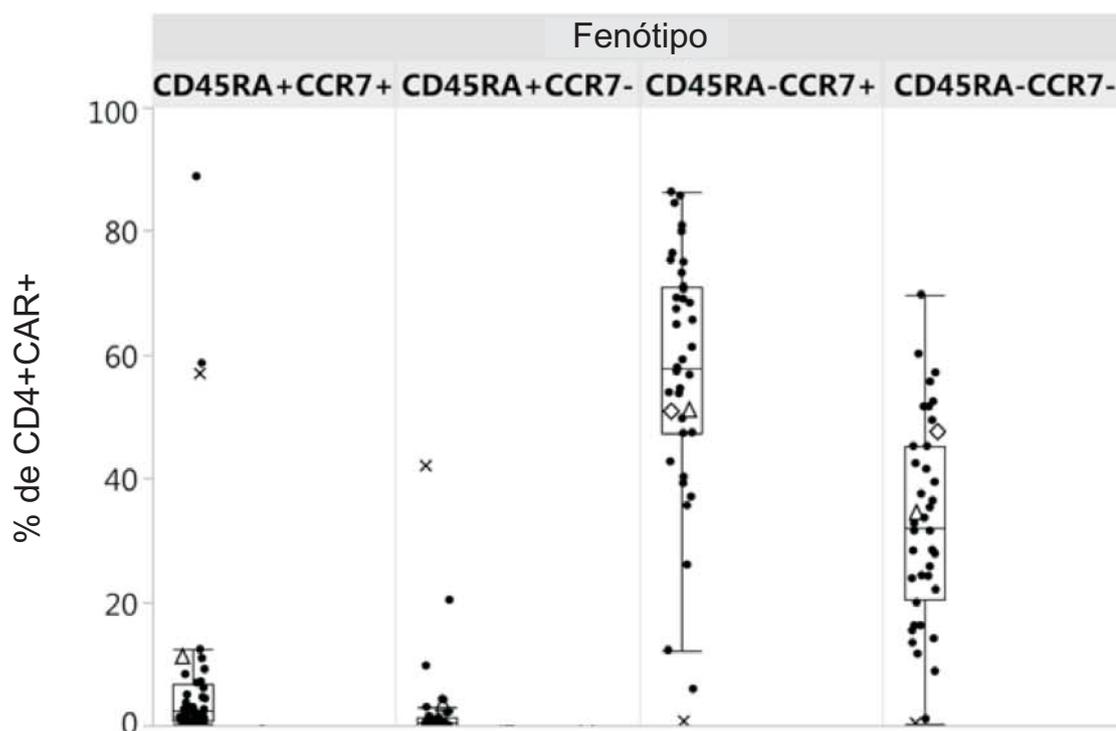
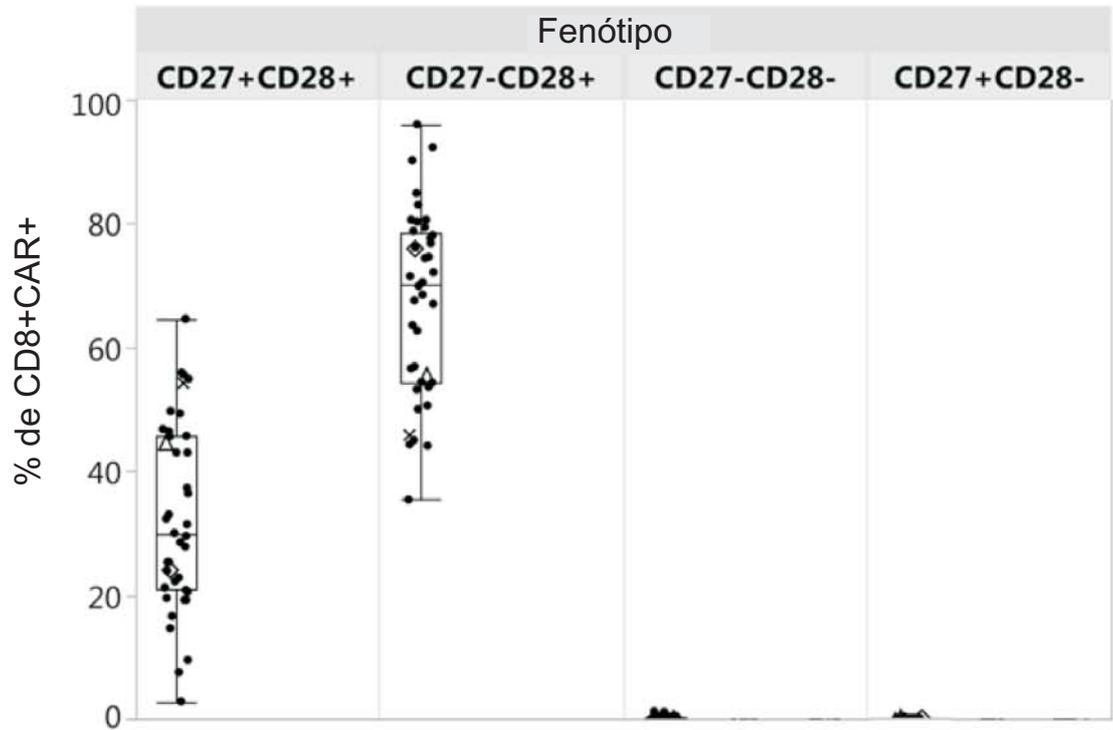
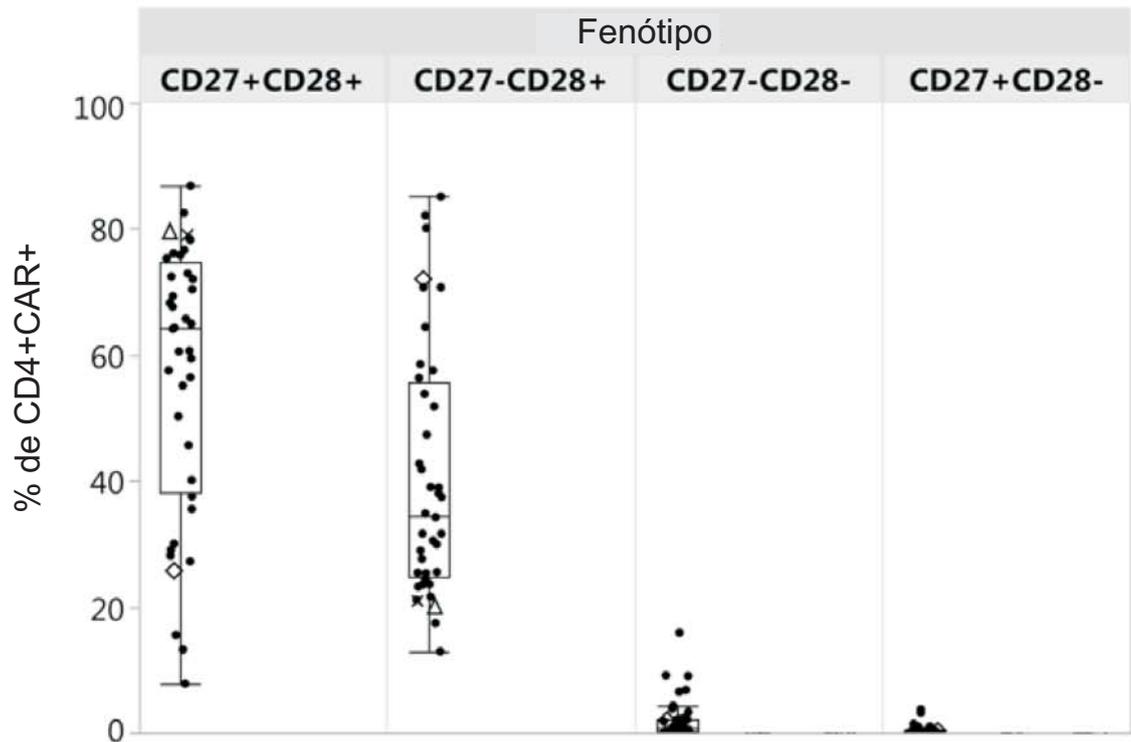
FIG. 6A**FIG. 6B**

FIG. 6C**FIG. 6D**

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS T MODIFICADAS"**.

A presente invenção refere-se a métodos para geneticamente modificar células T, tais como células T CD4+ e/ou células T CD8+, para uso em terapia celular. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos incluem uma ou mais etapas para agrupamento de células CD4+ e CD8+, tal como em uma relação de 1:1, e em seguida incubação das células sob condições de estimulação, introdução de um polinucleotídeo recombinante nas células por meio de transdução ou transfecção, e/ou cultivo das células sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos são um meio eficiente, confiável para produzir células T geneticamente modificadas cum um alto grau de sucesso.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P247518 ListSeq (JUNTADA TRADUÇÃO).txt
- Data de Geração do Código: 07/07/2020
- Hora de Geração do Código: 10:03:49
- Código de Controle:
 - Campo 1: E0E02ACA6E38C71D
 - Campo 2: C4EBC440416C10B3