



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

(21) BR 112020008565-0 A2



(22) Data do Depósito: 01/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 20/10/2020

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

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

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2017 US 62/580,435; 10/11/2017 US 62/584,687; 17/07/2018 US 62/699,709; 28/07/2018 US 62/711,494.

(71) Depositante(es): JUNO THERAPEUTICS INC; CELGENE CORPORATION.

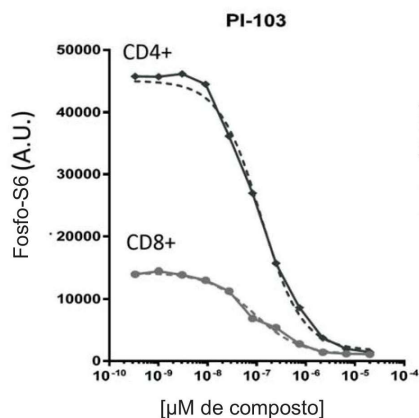
(72) Inventor(es): ARCHANA BRAHMANDAM; LUCAS JAMES THOMPSON; DEBORAH MORTENSEN; ELLEN FILVAROFF.

(86) Pedido PCT: PCT US2018058812 de 01/11/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/090004 de 09/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 29/04/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos para a produção de células T modificadas que expressam um receptor recombinante, tal como para uso em terapia celular. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos incluem uma ou mais etapas para a incubação das células sob condições de estimulação, introduzindo um polipeptídeo recombinante nas células por meio de transdução ou transfecção, e/ou cultivando as células sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão, em que uma ou mais etapas são realizadas na presença de um agente que inibe alvo mamífero de atividade de rapamicina (mTOR). Em alguns aspectos, o cultivo é realizado na presença de um agente que inibe alvo mamífero de atividade de rapamicina (mTOR). Em alguns aspectos, os métodos fornecidos produzem células T geneticamente modificadas com persistência melhorada e/ou atividade antitumor in vivo.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULA T”.

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[0001] Este pedido reivindica prioridade para Pedido de patente provisional norteamericano 62/711.494, depositado em 28 de julho de, 2018, Pedido de patente provisional norteamericano 62/699.709, depositado em 17 de julho de 2018, Pedido de patente provisional norteamericano 62/584.687, depositado em 10 de novembro de 2017, e Pedido de patente provisional norteamericano 62/580.435, depositado em 1 de novembro de 2017, o teor dos quais é incorporado por referência em sua íntegra.

Incorporação por Referência de Listagem de Sequências

[0002] O presente pedido está sendo depositado juntamente com uma Listagem de Sequências em formato eletrônico. A Listagem de Sequências é fornecida como um arquivo intitulado 735042013440SeqList.txt, criado em 1 de novembro de 2018, que é de 57.098 bytes de tamanho. A informação no formato eletrônico da Listagem de Sequências é incorporada por referência em sua íntegra.

Campo

[0003] A presente invenção fornece métodos para a produção de células T modificadas que expressam um receptor recombinante, tal como para uso em terapia celular. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos incluem uma ou mais etapas para a incubação das células sob condições de estimulação, introduzindo um polipeptídeo recombinante nas células por meio de transdução ou transfecção, e/ou cultivando as células sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão, em que uma ou mais etapas são realizadas na presença de um agente que inibe alvo mamífero de atividade de rapamicina (mTOR). Em alguns aspectos, o cultivo é realizado na presença de um agente

que inibe alvo mamífero de atividade de rapamicina (mTOR). Em alguns aspectos, os métodos fornecidos produzem células T geneticamente modificadas com persistência melhorada e/ou atividade antitumor *in vivo*.

Antecedente

[0004] Vários métodos de terapia celular estão disponíveis para o tratamento de doenças e condições. Entre métodos de terapia celular estão métodos que envolvem células imunes, tais como células T, geneticamente modificadas com um receptor recombinante, tal como um receptor de antígeno quimérico. Métodos melhorados para fabricar e/ou modificar tais terapias celulares são necessários, incluindo prover um processo mais eficiente e/ou um produto de composição celular melhorada. São fornecidos métodos para a produção de células modificadas, as células modificadas, composições, *kits* e artigos de fabricação e métodos de tratamento que atendem a tais necessidades.

Sumário

[0005] É fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias que compreendem células modificadas com um receptor recombinante, em que células na composição não foram expostas ao agente antes de serem cultivadas; e em que o método resulta na proliferação ou expansão das células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T modificadas. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as células primárias são células T CD4+ e/ou CD8+. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de célula T modificada compreende células T CD4+ enriquecidas. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a

composição de célula T modificada compreende células T CD8+ enriquecidas.

[0006] É fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias CD4+ e/ou CD8+ enriquecidas compreendendo células T modificadas com um receptor recombinante; em que o método resulta na proliferação ou expansão de células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T CD4+ modificadas e/ou CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD4+; e/ou a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD8+; e/ou a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD8+. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que

cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% Células T humanas primárias CD4+ e CD8+; e/ou a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+ e CD8+.

[0007] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas compreendem uma ou mais de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, G-CSF, e GM-CSF. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes.

[0008] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, antes do cultivo, o método também compreende: (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada que compreende células T primárias, as referidas condições de estimulação compreendendo 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, desse modo gerando uma composição estimulada; e (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

[0009] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD4+ e/ou CD8+ primárias. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD4+ enriquecidas. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a

composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD8+ enriquecidas.

[0010] É fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo: (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T enriquecidas por células T humanas primárias CD4+ e/ou CD8+, as referidas condições de estimulação compreendendo a presença de (i) 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 (ii) um agente que inibe a atividade de mTOR; e (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

[0011] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD4+; e/ou a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T

humanas primárias CD8+; e/ou a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD8+. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% Células T humanas primárias CD4+ e CD8+; e/ou a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+ e CD8+.

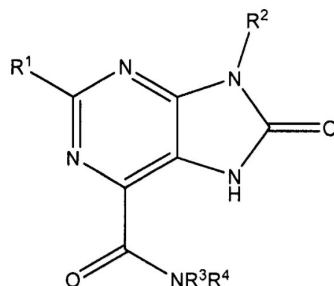
[0012] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é uma molécula pequena, uma molécula orgânica pequena, um polinucleotídeo, um oligonucleotídeo, um siRNA, ou um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é uma molécula orgânica pequena. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe atividade de mTORC1 e/ou mTORC2 cinase. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de pelo menos uma cinase adicional. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a referida pelo menos uma cinase adicional é PI3K. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI-103, SAR245409, SF1126, VS5584, ou XL765.

[0013] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR: (i) não inibe a atividade de PI3K; (ii) não inibe detectavelmente a atividade de PI3K na

IC₅₀ para atividade de mTOR; e/ou (iii) não inibe detectavelmente PI3K em todas as concentrações que inibem detectavelmente a atividade de mTOR. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 e mTORC2 cinase. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é uma pirazolopirimidina, Torina I, Torcinibe, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a, ou AZD8055. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe seletivamente a atividade de mTORC1.

[0014] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR: (i) não inibe a atividade de mTORC2; (ii) não inibe detectavelmente a atividade de mTORC2 na IC₅₀ para a atividade de mTORC1; e/ou (iii) não inibe detectavelmente mTORC2 em todas as concentrações que inibem detectavelmente a atividade de mTORC1. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é rapamicina, tensirolimus, everolimus, deforolimus, ou AZD8055.

[0015] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente compreende uma fórmula mencionada na Fórmula I,



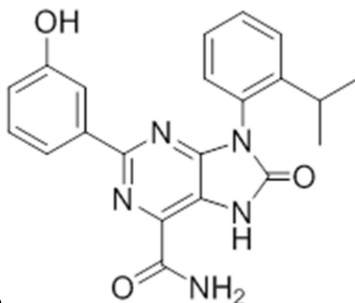
Fórmula (I)

[0016] em que R¹ é C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila

substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída, R² é C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída, e R³ e R⁴ são independentemente H ou C₁₋₈ alquila. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende um composto de Fórmula (I), ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende um composto de Fórmula (I), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

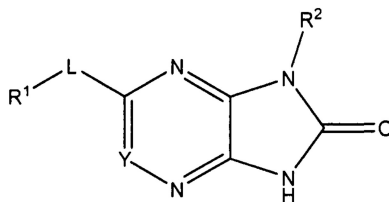
[0017] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R¹ é arila substituída, heteroarila substituída ou não substituída, tal como fenila substituída. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R² é arila substituída ou não substituída, e/ou uma fenila substituída ou não substituída. Em algumas modalidades, R² é arila substituída ou não substituída, tais como uma fenila substituída ou não substituída. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, grupos que são substituídos são substituídos com um ou mais grupos halogênicos; C₁₋₈ alquila; C₂₋₈ alquenila; C₂₋₈ alquinila; hidroxila; C₁₋₈ alcoxila; amino; nitro; tiol; tioéter; imina; ciano; amido; fosfonato; fosfina; carboxila; tiocarbonila; sulfonila; sulfonamida; cetona; aldeído; éster; carbonila; haloalquila; B(OH)₂; cicloalquila carbocíclica, heterocicloalquila, heteroarila ou arila monocíclica ou fundida ou policíclica não fundida; amino; alquila O-inferior; O-arila, arila; aril-alquila inferior; CO₂CH₃; CONH₂; OCH₂CONH₂; NH₂; SO₂NH₂; OCHF₂; CF₃; ou OCF₃. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63. Em algumas modalidades

de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende 2-(3-hidroxifenil)-9-(2-isopropilfenil)-8-oxo-8,9-di-hidro-7H-purina-6-carboxamida, ou um sal farmacologicamente aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é



ou compreende , ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0018] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente compreende a Fórmula mencionada na Fórmula (II),



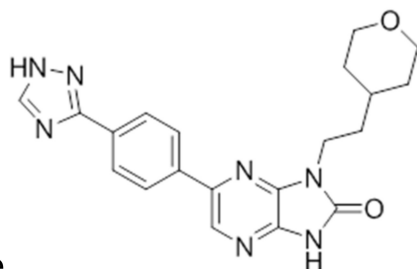
Fórmula (II)

[0019] em que L é uma ligação direta, NH ou O, Y é N ou CR³, em que R¹ é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, C₂₋₈ alquênica substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída ou heterocicloalquila substituída ou não substituída, R² é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída, R³ é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não

substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquila substituída ou não substituída, $-NHR^4$ ou $-N(R^4)_2$, e R^4 é em cada ocorrência independentemente C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende um composto de Fórmula (II), ou um sal farmacologicamente aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende um composto de Fórmula (II), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

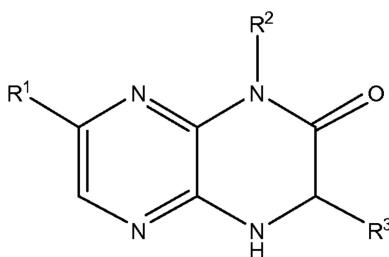
[0020] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, R^1 é arila substituída, e/ou uma fenila substituída. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R^1 é uma arila substituída, tal como uma fenila substituída. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, Y é CH. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, L é uma ligação direta. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, R^1 é arila substituída e R^2 é C_{1-8} alquila substituída por um ou mais substituintes selecionados de alcóxi, amino, hidróxi, cicloalquila, ou heterocicloalquila. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R^2 é C_{1-8} alquila substituída por uma ou mais de a heterocicloalquila. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 155. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende 6-(4-(2H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)-1-(2-(tetra-hidro-2H-piran-4-il)etil)-1H-imidazo [4,5-b]pirazina-2(3H)-ona, ou um sal farmacologicamente aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades de qualquer

um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é



ou compreende , ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0021] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente compreende uma fórmula mencionada na Fórmula III



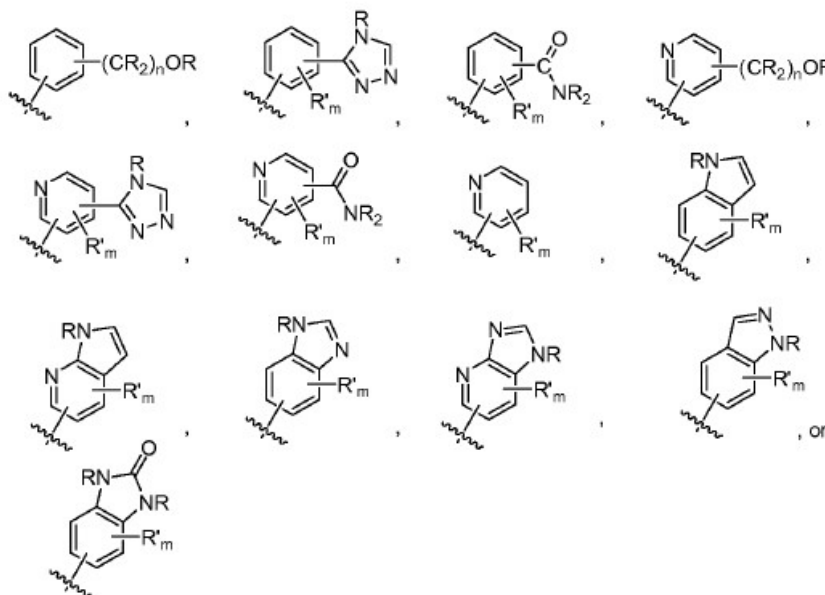
Fórmula (III)

[0022] em que R^1 é C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, ou heterociclilalquila substituída ou não substituída, R^2 é H, C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, heterociclilalquila substituída ou não substituída, substituída ou não substituída aralquila, ou cicloalquilalquila substituída ou não substituída, e R^3 é H, ou a substituída ou não substituída C_{1-8} alquila. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R^1 é arila substituída ou não substituída ou heteroarila substituída ou não substituída. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R^1 é piridila que é substituída. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende um composto

de Fórmula (III), ou um sal farmacologicamente aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende um composto de Fórmula (III), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[0023] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, R¹ é piridila substituída com um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída (halogênio, aminocarbonila, ciano, hidroxialquila, -OR, e -NR₂, em que cada R é independentemente H, ou uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída. Em certas modalidades, R¹ é 1H-pirrolo[2,3-b]piridila ou benzimidazolila, opcionalmente substituída por um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, e -NR₂, em que R é independentemente H, ou uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída.

[0024] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R¹ é

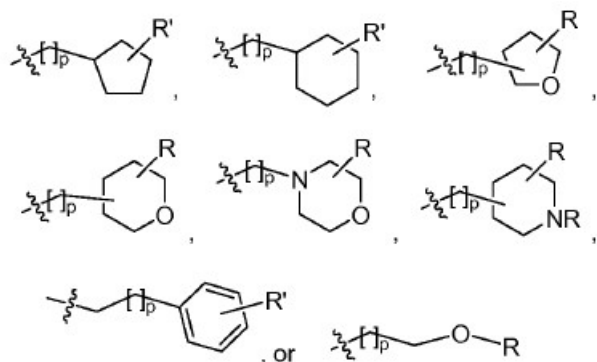


[0025] em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída (por exemplo, metila); R¹

é em cada ocorrência independentemente uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída, halogênio, ciano, -OR, ou -NR₂; m é 0 a 3; e n é 0 a 3.

[0026] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, R² é H, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, sec-butila, isobutila, *terc*-butila, n-pentila, isopentila, ciclopentila, ciclo-hexila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila, (C₁₋₄ alquil)-fenila, (C₁₋₄ alquil)-ciclopropila, (C₁₋₄ alquil)-ciclobutila, (C₁₋₄ alquil)-ciclopentila, (C₁₋₄ alquil)-ciclo-hexila, (C₁₋₄ alquil)-pirrolidila, (C₁₋₄ alquil)-piperidila, (C₁₋₄ alquil)-piperazinila, (C₁₋₄ alquil)-morfolinila, (C₁₋₄ alquil)-tetra-hidrofuranila, ou (C₁₋₄ alquil)-tetra-hidropiranila, cada uma opcionalmente substituída.

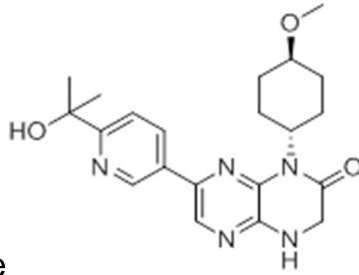
[0027] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, R² é H, C₁₋₄ alquila, (C₁₋₄ alquila)(OR),



[0028] em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou uma C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, R' é em cada ocorrência independentemente H, -OR, ciano, ou uma C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, e p é 0 a 3.

[0029] Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 246. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou compreende 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-((1r,4r)-4-metoxiciclo-hexil)-3,4-dihidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona, ou um sal farmacologicamente

aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente que inibe a atividade de mTOR é



ou compreende CC(C)(C)C(O)c1ccc2nc3c(ncn3C(=O)NCC2)c4cnc5c4N(C5)C6CCCCC6OC, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0030] É fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias enriquecidas compreendendo células T modificadas com um receptor recombinante; em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246; e em que o método resulta na proliferação ou expansão de células na composição para produzir uma composição de saída que compreende células T modificadas.

[0031] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 µM, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 63. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 µM, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 155. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 µM, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 246.

[0032] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos

fornecidos, antes do cultivo, o método também compreende: (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T primárias na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR; 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, desse modo gerando uma composição estimulada; e em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246; e (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

[0033] É fornecido aqui um método para a produção de uma composição de células modificadas, o método compreendendo: (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T humanas primárias, as referidas condições de estimulação compreendendo a presença de (i) 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 (ii) um agente que inibe a atividade de mTOR, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246; e (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas. Em algumas modalidades, as células primárias são enriquecidas em células T CD4+ e/ou CD8+.

[0034] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o reagente estimulatório compreende um agente primário

que especificamente se liga a um membro de um complexo de TCR, opcionalmente que especificamente se liga a CD3. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, 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. Em modalidades particulares 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. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o agente primário e/ou agente secundário estão presentes na superfície de um suporte sólido. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o suporte sólido é ou compreende uma conta. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta compreende um diâmetro de mais do que ou mais do que cerca de 3,5 μm porém não mais que cerca de 9 μm ou não mais que cerca de 8 μm ou não mais que cerca de 7 μm ou não mais que cerca de 6 μm ou não mais que cerca de 5 μm . Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta compreende um diâmetro de ou cerca de 4,5 μm . Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta é inerte. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta é ou compreende uma superfície de poliestireno. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a conta é magnética ou superparamagnética. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a relação de contas para células é de ou de cerca de 4 : 1 a 0,25 : 1.

[0035] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos

fornecidos, a introdução compreende células de transdução da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o vetor viral é um vetor retroviral. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o vetor viral é um vetor lentiviral ou vetor gamaretroviral. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a introdução compreende transfecção das células da composição estimulada com um vetor compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o vetor é um transposon, opcionalmente um transposon Sleeping Beauty (SB) ou um transposon Piggybac.

[0036] Em algumas modalidades dos métodos fornecidos, subsequentes ao cultivo, o método também compreende coletar células da composição de saída. Modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos também compreendem formulação de células da composição de saída para criopreservação e/ou administração a um indivíduo, opcionalmente na presença de um excipiente farmacologicamente aceitável. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, as células da composição de saída são formuladas na presença de um crioprotetor. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o crioprotetor compreende DMSO. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as células da composição de saída são formuladas em um recipiente, opcionalmente um frasco ou um saco.

[0037] Certas modalidades dos métodos fornecidos também compreendem isolar as células T CD4+ e/ou CD8+ de uma amostra biológica antes da incubação. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o isolamento compreende selecionar

células com base em expressão de superfície de CD4 e/ou CD8, opcionalmente por seleção positiva ou negativa. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o isolamento compreende realizar seleção com base em imunoafinidade. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a amostra biológica compreende células T primárias obtidas de um indivíduo. Em algumas modalidades 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 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.

[0038] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor recombinante é capaz de se ligar 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 certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a doença, distúrbio ou condição é uma doença infecciosa ou distúrbio, uma doença autoimune, uma doença inflamatória, ou um tumor ou um câncer. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o antígeno alvo é um antígeno tumoral.

[0039] Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o antígeno alvo é selecionado dentre 5T4, 8H9, avb6 integrina, B7-H6, antígeno de maturação de célula B (BCMA), CA9, um antígeno de testículos de câncer, anidrase 9 carbônica (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 carcinoembriogênico (CEA), CE7, uma ciclina, ciclina A2, c-Met, antígeno duplo, EGFR, glicoproteína epitelial 2 (EPG-2), glicoproteína epitelial 40 (EPG-40), EPHa2, efrinB2, 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, Receptor 5D acoplado à Proteína G (GPRC5D), gp100, Her2/neu (receptor de tirosina cinase erbB2), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor alfa 2 de IL-13 (IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve kappa, Lewis Y, molécula de adesão à célula L1 (L1-CAM), antígeno associado à Melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV murina, mucina 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, ligantes NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno de melanoma preferencialmente expresso (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, tEGFR, receptores de VEGF, VEGF-R2, Tumor de Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno e um antígeno associado com um marcador universal.

[0040] Em certas modalidades 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. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor recombinante é um CAR anti-CD19. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor de antígeno quimérico compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação ao antígeno.

[0041] Em algumas modalidades 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 modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o fragmento compreende regiões

variáveis de anticorpo juntas por um ligante flexível. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o fragmento compreende um scFv. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor de antígeno quimérico também compreende um espaçador e/ou uma região de articulação. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o receptor de antígeno quimérico compreende uma região de sinalização intracelular. Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização primária, 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 *motif* de ativação de imunoreceptor com base em tirosina (ITAM). Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, o domínio de sinalização intracelular é ou compreende um domínio de sinalização intracelular de uma cadeia de CD3, opcionalmente uma cadeia CD3-zeta (CD3 ζ), ou uma porção de sinalização da mesma.

[0042] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, em que o receptor de antígeno quimérico também compreende um domínio de membrana disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização intracelular também compreende uma região de sinalização coestimulatória. Em certas modalidades 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 do mesmo. Em modalidades

particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de um CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização dos mesmos. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, a região de sinalização coestimulatória está entre o domínio de transmembrana e a região de sinalização intracelular.

[0043] Em certas modalidades de qualquer um dos métodos fornecidos, as células T primárias compreendem composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas, e em que as composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são cultivadas separadamente. Em modalidades particulares de qualquer um dos métodos fornecidos, as células T primárias compreendem composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas, e em que as composições são misturadas de modo a cultivar as células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas juntas.

[0044] É fornecida aqui uma composição compreendendo células modificadas produzidas por qualquer método fornecido aqui. Em modalidades particulares, a composição também compreendia um veículo farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição compreende um crioprotetor, opcionalmente DMSO.

[0045] É fornecido aqui um artigo de fabricação, compreendendo qualquer composição fornecida aqui e instruções para administrar a composição de saída a um indivíduo. Em certas modalidades, 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. Em modalidades particulares, a composição de saída é uma composição de células T CD4+

modificadas. Em algumas modalidades, a composição de saída é uma composição modificada de células T CD8+. Em certas modalidades, a composição de saída é uma composição modificada de células T CD4+ e CD8+.

[0046] É fornecido aqui um artigo de fabricação compreendendo uma composição de células T CD4+ modificadas produzidas por um método fornecido aqui, uma composição de células T CD8+ modificadas produzidas por um método fornecido aqui, e instruções para administrar as células T CD4+ modificadas e as células T CD8+ modificadas a um indivíduo. Em certas modalidades, as instruções especificam separadamente a administração das células T CD4+ e CD8+ ao indivíduo. Em certas modalidades, as instruções especificam administração das células T CD4+ e das células T CD8+ ao indivíduo em uma relação desejada. É também fornecida aqui é um artigo de fabricação compreendendo uma composição de células T CD4+ e CD8+ produzidas por um método fornecido aqui, e instruções para administrar as células T CD4+ e CD8+ a um indivíduo.

[0047] É fornecido aqui um método de estimulação em longo prazo para avaliar uma composição celular incluindo incubar, durante um período de tempo de pelo menos 10 dias, uma composição de entrada sob condições para estimular uma atividade dependente de CAR em células na composição de entrada, a referida composição de entrada contendo células T expressando um receptor de antígeno quimérico (CAR) contendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular que especificamente se liga a ou reconhece um antígeno, desse modo produzindo uma composição de saída; e avaliando um ou mais fenótipo ou atividade de uma ou mais células da composição de saída.

[0048] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, as condições para estimular uma atividade dependente de CAR incluem a presença de uma molécula de

ligação que especificamente se liga ao domínio de ligação ao antígeno do CAR. Em algumas modalidades, a molécula de ligação é ligada a um suporte. Em algumas modalidades, o suporte é um suporte sólido. Em algumas modalidades, o suporte sólido é a superfície de um poço de uma microplaca ou uma conta. Em algumas modalidades, o suporte sólido é uma microplaca tendo a molécula de ligação ligada à microplaca, e a incubação é realizada na microplaca. Em algumas modalidades, o suporte sólido é uma conta tendo ligação à molécula de ligação, e a incubação é realizada na presença de uma pluralidade das contas.

[0049] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, a molécula de ligação é ou compreende um antígeno recombinante ou uma porção do mesmo reconhecida pelo domínio de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o antígeno recombinante ou porção do mesmo é BCMA, ou é uma porção do mesmo que é reconhecida pelo domínio de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, a molécula de ligação é ou inclui um anticorpo anti-ídótipo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga ao domínio de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno do receptor antigênico é ou compreende anticorpo SJ25C1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno do receptor antigênico é ou inclui anticorpo FMC63 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0050] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, o método é realizado *in vitro* ou *ex vivo*.

[0051] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, a composição de entrada é incubada na presença de um meio que não compreende citocinas recombinantes. Em algumas modalidades, a incubação é realizada continuamente ou

não é interrompida pelo período de tempo. Em algumas modalidades, durante a incubação, células não são substituídas, o meio não é alterado e a molécula de ligação não é adicionada.

[0052] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, o método inclui avaliar um ou mais fenótipos de ativação, esgotamento ou estado de diferenciação das uma ou mais células da composição de saída. Em algumas modalidades, o fenótipo é esgotamento e a avaliação inclui medir a expressão, opcionalmente expressão de superfície, de um ou mais marcadores selecionados de CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA, ou CD96. Em algumas modalidades, o fenótipo é ativação e a avaliação inclui medir a expressão, opcionalmente expressão de superfície, de um ou mais marcadores selecionados de CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3, ou Ki67. Em algumas modalidades, o fenótipo é estado de diferenciação e a avaliação inclui medir um ou mais marcadores selecionados de (i) um ou mais de CD25, CD45RO, CD56, KLRG1, CD95 e/ou (ii) um ou mais de CD45RA, CD27, CD28, CD62L, e CCR7, opcionalmente em que os um ou mais marcadores são positivamente ou inversamente associados com células T virgens.

[0053] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, o método inclui avaliação de uma ou mais atividades das uma ou mais células da composição de saída. Em algumas modalidades, as uma ou mais atividades compreendem uma atividade dependente de CAR, opcionalmente uma atividade estimulada por antígeno. Em algumas modalidades, as uma ou mais atividades compreendem atividade citolítica ou produção de citocina.

[0054] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, o período de tempo é pelo menos ou pelo menos cerca de 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, ou 15 dias. Em

algumas modalidades, o período de tempo é ou é cerca de 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias ou 15 dias.

[0055] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, a composição de entrada contém células que foram expostas ou contatadas com um agente teste ou composto antes da incubação, opcionalmente em que a exposição ou contato é realizado durante uma ou mais etapas de um processo para produção da composição de entrada compreendendo as células T expressando o CAR. Em algumas modalidades, o método é realizado em várias composições de entrada, cada uma das referidas composições de entrada da pluralidade sendo produzidas por um processo diferente.

[0056] Em algumas de quaisquer das modalidades de um método de estimulação em longo prazo, o método também inclui comparar o fenótipo ou atividade da composição de saída ao fenótipo ou atividade de uma composição de controle, opcionalmente em que a composição de controle é uma composição de células T que foram incubadas por pelo menos 10 dias sob as mesmas condições para estimular a atividade dependente de CAR, a referida composição de células T não foi produzida na presença do agente teste ou composto ou foi produzida por um processo alternativo comparado a uma composição de entrada. Em algumas modalidades, o método também inclui identificar uma composição de saída que exibe esgotamento reduzido, ativação reduzida ou diferenciação reduzida, tal como comparada às composições de controle. Em algumas modalidades, a diferenciação reduzida compreende expressão aumentada de um ou mais marcadores de célula T tipo virgem.

Breve Descrição dos Desenhos

[0057] FIGURAS 1A-1D mostram gráficos exibindo os níveis de S6 fosforilado detectado em células T CD4+ e CD8+ incubadas com

conjugado de contas magnéticas de anticorpo anti-CD3 e anti-CD28 na presença de concentrações variantes de PI-103 (FIGURA 1A), Composto 155 (FIGURA 1B), Composto 246 (FIGURA 1C), ou Composto 63 (FIGURA 1D).

[0058] FIGURA 2 mostra gráficos exibindo a porcentagem de número inicial de células para células T CD8+ (painel superior) e CD4+ (painel inferior) modificadas que estão presentes durante uma incubação em um controle apenas de meio, ou na presença de DMSO, PI-103, ou concentrações variantes de Composto 155, Composto 63, ou Composto 246. Setas indicam a maior dose tolerada de Composto 155, Composto 63, e Composto 246 que resultam em níveis similares de expansão de célula T CD8 e CD4. Linhas horizontais pontilhadas indicam 70% do valor médio do meio e controles de DMSO.

[0059] FIGURAS 3A-3C mostram gráficos do metabolismo glicolítico celular em células T CD8+ dentre a composição de célula CAR-T anti-CD19 gerada. FIGURA 3A fornece gráficos exibindo a taxa de acidificação extracelular (ECAR) em tempo real de células CAR-T CD8+ dentre células CAR-T anti-CD19 geradas pela expansão na presença de apenas meio, DMSO, PI-103, ou Composto 63. FIGURA 3B exibe a área sob a curva (AUC) calculada para as taxas ECAR (mpH / min) com relação a controles apenas de meio. FIGURA 3C mostra relação de ruptura glicolítica de ECAR máxima em relação a controles apenas de meio.

[0060] FIGURAS 4A-4B fornecem gráficos exibindo o resultado de ensaios realizados em composições de célula CAR-T anti-CD19 que foram geradas por expansão na presença de apenas meio, DMSO, PI-103, ou Composto 63. FIGURA 4A mostra a intensidade fluorescente média de mancha com fosfo-S6 em células T CD8+ e CD4+ das composições de célula CAR-T anti-CD19 CAR-T geradas após cocultura com células K-562 irradiadas transduzidas para expressar CD19

(células alvo K562-CD19 irradiadas) e células que não foram expostas a um antígeno (sem estímulo). Painéis superiores exibem pontos de dados individuais medidos de composições celulares separadas. Painéis inferiores exibem valores médios + / - desvio padrão. FIGURA 4B fornece gráficos exibindo a atividade citolítica das composições de célula CAR-T geradas co-cultivadas com células alvo K562-CD19 em uma relação de 3 : 1 ou 1 : 1 de células efetoras para células alvo. Medidas de composições de célula CAR-T geradas e CD19 expressando células K562 são fornecidas como controles.

[0061] FIGURA 5 fornece gráficos exibindo secreção de TNF-alfa (painel esquerdo), IFN-gama (painel do meio), e IL-2 (painel direito), de composições celulares CAR-T anti-CD19 que foram co-cultivadas com células alvo K562-CD19 irradiadas. A duplicação de produção de citocina observada em sobrenadantes de co-cultura de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada expandidas na presença de PI-103, Composto 63 ou veículo de DMSO comparado às células expandidas em apenas meio é exibida.

[0062] FIGURAS 6A e 6B mostram gráficos exibindo o perfil de citocina polifuncional de células T CD8+ (FIGURA 6A) e CD4+ (FIGURA 6B) de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada que foram co-cultivadas com células alvo K562-CD19 irradiadas e em seguida incubadas com PMA / Ionomicina (painéis esquerdos) ou inibidor de Golgi (painéis direitos). A frequência aumentada de células positivamente manchadas para combinações diferentes de CD107a, IFN-gama (IFNg), IL-2, IL-17a, e TNF-alfa (TNFa) em composições de célula CAR-T anti-CD19 geradas expandidas na presença de PI-103, Composto 63 ou veículo de DMSO quando comparado às células expandidas em apenas meio é exibida.

[0063] FIGURAS 7A-7D mostram gráficos exibindo atividade de células T de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada que foram

expandidas na presença de apenas meio, DMSO, PI-103, ou Composto 63 após estímulos repetidos. FIGURA 7A mostra duplicação da população das células T de composições de célula CAR-T anti-CD19 geradas cocultivadas com células alvo K562-CD19 irradiadas. Após 4 ciclos de re-estimulação, células T foram recultivadas sem células alvo no dia 11. FIGURA 7B exibe a área sob a curva (AUC) calculada para duplicações de população em relação aos controles apenas de meio. FIGURA 7C mostra um gráfico exibindo a produção de TNF-alfa (TNF), IFN-gama (IFNg), e IL-2 por células T de composições de célula T-CAR anti-CD19 gerada após estimulação com uma cocultura de 16 horas com células alvo K562-CD19 irradiadas após 4 ciclos de estímulos repetidos com células alvo K562-CD19 irradiadas. A quantidade de mudança de TNF-alfa extracelular (TNF), IFN-gama (IFNg), e IL-2 quando comparada à condição de apenas meio é mostrada. FIGURA 7D mostra gráficos retratando os perfis de citocina polifuncional de células T CD8+ de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada que seguiram 4 ciclos de reestimulação com células alvo K562-CD19 irradiadas.

[0064] FIGURAS 8A-8D mostram gráficos exibindo atividade de células T de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada que foram expandidas na presença de apenas meio, DMSO, PI-103, ou Composto 63 após estimulação com superfície de contas conjugadas com anticorpo anti-idiotipo específico para o CAR anti-CD19. FIGURA 8A mostra as contas de célula T vivas totais por poço de células T de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada cocultivadas com superfície de contas conjugadas com o anticorpo anti-idiotipo. FIGURA 8B exibe a área sob a curva (AUC) calculada para as contas de célula T vivas em relação aos controles apenas de meio. FIGURA 8C mostra um gráfico exibindo a produção de TNF-alfa (TNF), IFN-gama (IFNg), e IL-2 por células T de composições de célula T-CAR anti-CD19 geradas

após estimulação com uma cocultura de 16 horas com células alvo K562-CD19 irradiadas que seguiram 15 dias de incubação com superfície de contas conjugadas ao anticorpo anti-idiotipo seguiram 15 dias. A quantidade de mudança de TNF-alfa extracelular (TNF), IFN-gama (IFNg), e IL-2 quando comparada à condição apenas de meio é mostrada. FIGURA 8D mostra gráficos descrevendo os perfis de citocina polifuncional de células T CD8+ de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada que seguiram 15 dias de incubação com contas conjugadas com o anticorpo anti-idiotipo.

[0065] FIGS 9A-9C mostram gráficos exibindo resultados de uma análise de RNA-Seq de células T CD4+ e CD8+ de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada que foram expandidas na presença apenas de meio, DMSO, PI-103, ou Composto 63. FIGURA 9A mostra plotes de vulcão retratando a expressão de gene diferencialmente expresso por CD4+ (painéis esquerdos), CD8+ (painéis do meio), e células T CD4+ e CD8+ (painéis direitos) combinadas de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada. Expressão de gene diferencial é mostrada para células T expandidas em apenas meio (linha superior), PI-103 (linha do meio), e Composto 63 (linha inferior) quando comparados a células T expandidas com DMSO. FIGURA 9B mostra um gráfico retratando duplicação \log_2 (Log₂FC) de genes diferencialmente expressos medidos em células T de composições de célula CAR-T anti-CD19 gerada que foram expandidas na presença de PI-103 (X-axis) e Composto 63 (Y-axis) em relação a uma expressão em células T de composições de célula CAR-T anti-CD19 geradas que foram expandidas na presença de DMSO. FIGURA 9C mostra uma tabela e gráfico retratando categorias de ontologia de gene identificado exemplares (GO) e suas correspondentes pontuações Z.

[0066] FIGURAS 10A e 10B mostram gráficos exibindo a carga tumoral e sobrevivência em camundongos portando tumor após

tratamento com células CAR-T anti-CD19. FIGURA 10A mostra gráficos exibindo a carga tumoral e sobrevivência até o dia 80 em camundongos portando tumor após tratamento com células CAR-T anti-CD19. FIGURA 10B mostra um gráfico exibindo sobrevivência até o dia 100 em camundongos portando tumor após tratamento com células CAR-T anti-CD19. Camundongos imunodeficientes em Nod scid gama (NSG) foram implantados com células Raji que expressaram vaga-lume luciferase e receberam ou nenhum tratamento, ou tratamento com uma dose alta (painéis esquerdos) ou baixa (painéis direitos) de célula CAR-T anti-CD19 que foi expandida na presença de DMSO ou PI-103. Carga tumoral de camundongo individual como medido por bioluminescência (painéis superiores) e curvas de sobrevivência dos grupos de tratamento (painéis inferiores) são mostradas nos tempos indicados como mostrado na FIGURA 10A e 10B.

[0067] FIGURAS 11A e 11B mostram gráficos exibindo a carga tumoral e sobrevivência em camundongos portando tumor após tratamento com células CAR-T anti-CD19. FIGURA 11A mostra gráficos exibindo a carga tumoral e sobrevivência até o dia 80 em camundongos portando tumor após tratamento com células CAR-T anti-CD19. FIGURA 10B mostra um gráfico exibindo sobrevivência até o dia 100 em camundongos portando tumor após tratamento com células CAR-T anti-CD19. Camundongos imunodeficientes em NSG foram implantados com células Raji que expressaram vaga-lume luciferase e receberam ou nenhum tratamento, ou tratamento com uma dose alta (painéis esquerdos) ou baixa (painéis direitos) de célula CAR-T anti-CD19 que foi expandida na presença de DMSO ou Composto 63. Carga tumoral de camundongos individuais como medida por bioluminescência (painéis superiores) e curvas de sobrevivência dos grupos de tratamento (painéis inferiores) são mostradas nos tempos indicados como mostrado na FIGURA 11A e 11B.

[0068] FIGURAS 12A e 12B apresenta gráficos mostrando atividade de composições de célula T contendo células T CAR+ anti-CD19. Células foram incubadas com contas conjugadas anti-ID de anticorpo anti-CD19 durante 14 dias (Dia 14; secundárias) ou não foram incubadas antes da atividade de avaliação. Resultados de um ensaio de citotoxicidade (FIGURA 12A) e um ensaio de manchamento de citocina interna (ICS) após exposição a células expressando CD19 (FIGURA 12B) são mostrados.

[0069] FIGURAS 13A-13C apresentam gráficos mostrando características de composições de célula T contendo células T CAR+ anti-CD19 durante ou após incubação com contas conjugadas anti-ID de anticorpo anti-CD19 durante 14 dias. Resultados de composições de célula T que foram gerados na presença de PI-103, Composto 63, ou um veículo são mostrados. FIGURAS 13A e 13B mostram atividade em resposta a exposição a células CD19 de composições de célula T que não foram incubadas (primárias) ou incubadas durante 14 dias (secundárias). Resultados de manchamento polifuncional por ICS (FIGURA 13A) e a atividade citolítica (FIGURA 13B) após exposição a CD19 expressando células são mostrados. FIGURA 13C retrata níveis de citocina secretada de sobrenadante de composições celulares contendo CAR anti-CD19 expressando células que foram incubadas em uma relação de 1 : 1 com CD19 expressando células durante 20 horas. Quantidades de IL2, TNF, e IFN-gama foram medidas e a média das pontuações em escala para todas as três citocinas é mostrada.

[0070] FIGURA 14 retrata expressão da caspase intracelular pró-apoptótica 3 em células CAR-T descongeladas preparadas na presença de DMSO ou Composto 63. Plotes de FACS mostra células T CD3+CAR+ viáveis, preparadas de três doadores diferentes.

[0071] FIGURA 15 apresenta um gráfico mostrando números de célula viável durante o tempo de células CAR-T preparadas na presença

de DMSO, PI103, ou Composto 63. Símbolos representam média e SEM de poços de cultura de três doadores individuais.

[0072] FIGURA 16 apresenta um gráfico mostrando morte de célula alvo por células CAR-T descongeladas preparadas na presença de DMSO, PI103, ou Composto 63. Ensaios de morte foram criados diretamente após degelo (dia 0) ou no fim da cultura de estímulo de CAR (dia 14) descrito em FIGURA 15. Símbolos representam média e SEM de poços de cultura de três doadores individuais.

[0073] FIGURAS 17A-17B apresentam gráficos mostrando células CAR-T preparadas na presença de PI103 ou Composto 63 tendo perfis de citocina efetora melhorados e sustentados. Células CAR-T foram misturadas em 1 : 1 (CAR-T : alvo) com células alvo portando antígeno diretamente pós degelo (“Primárias”, painéis superiores) ou no final da cultura de estímulo de CAR como descrito na FIGURA 15 (“Secundárias”, painéis inferiores). Polifuncionalidade de células T foi avaliada por expressão intracelular de citocinas IL2, TNF e IFN γ por FACS de células CAR-T incubadas com alvos na presença de um inibidor de Golgi durante 5 horas (FIGURA 17A). Secreção de citocina em sobrenadantes de cultura de células CAR-T incubadas com alvos durante 20 horas foi também medida (FIGURA 17B). Valores de ensaio foram normalizados e classificados por escala de características em cada coorte de doador.

[0074] FIGURA 18 apresenta resultados de uma análise de expressão diferencial (DESeq2) de RNAseq realizada em células CAR-T CD8+ e CD4+ enriquecidas geradas na presença de PI103 ou Composto 63 como descrito no FIGURA 15. Expressão diferencial de genes com valor p ajustado (p-adj) < 0,1 para PI103 versus DMSO ou Composto 63 versus DMSO foi selecionada e valores de expressão de gene de duplicação log₂ são mostrados. Genes diferencialmente significativamente expressos em células tratadas com PI103 apenas

são mostrados com quadrados. Genes significativamente diferencialmente expresso em células tratadas com Composto 63 apenas são mostrados com círculos. Genes expressos em ambas as composições de célula T são mostradas com diamantes. Os valores de expressão diferencial são a média de três doadores individuais por grupo.

[0075] FIGURAS 19A-19B mostram gráficos exibindo a carga tumoral e sobrevivência em camundongos portando tumor após tratamento com células CAR-T anti-CD19. FIGURA 19A mostra gráficos exibindo a carga tumoral em camundongos após tratamento com uma dose alta (1×10^6 células CAR-T / camundongo) ou uma dose baixa ($2,5 \times 10^5$ células CAR-T / camundongo) de células CAR-T anti-CD19. FIGURA 19B mostra gráficos exibindo sobrevivência de camundongos portando tumor após tratamento com uma dose alta ou uma dose baixa de células CAR-T anti-CD19.

[0076] FIGURAS 20A-20B mostram gráficos exibindo a carga tumoral e sobrevivência em camundongos portando tumor após tratamento com células CAR-T anti-CD19. FIGURA 20A mostra gráficos exibindo a carga tumoral em camundongos após tratamento com uma dose alta (1×10^6 células CAR-T / camundongo) ou uma dose baixa ($2,5 \times 10^5$ células CAR-T / camundongo) de células CAR-T anti-CD19. FIGURA 20B mostra gráficos exibindo sobrevivência de camundongos portando tumor após tratamento com uma dose alta ou uma dose baixa de células CAR-T anti-CD19.

[0077] FIGURAS 21A-21B mostram gráficos ilustrando a persistência de células CAR-T anti-CD19 durante um tempo no sangue de camundongos portadores. FIGURA 21A mostra contagens de células T CD4⁺ e CD8⁺ no dia 18, dia 25 e dia 36 após a injeção em camundongos que receberam uma dose alta (1×10^6 células CAR-T / camundongo) de células CAR-T preparadas na presença de DMSO (D),

Composto 63 (C), ou PI103 (P). FIGURA 21B mostra contagens de células T CD4⁺ e CD8⁺ no dia 18, no dia 25 e no dia 36 após injeção em camundongos que receberam uma dose baixa ($2,5 \times 10^5$ células CAR-T / camundongo) de células CAR-T preparadas na presença de DMSO (D), Composto 63 (C), ou PI103 (P).

Descrição Detalhada

[0078] São fornecidos aqui métodos de produção de uma composição de células modificadas, tais como células CD4⁺ e/ou CD8⁺ modificadas, expressando um receptor recombinante em que uma ou mais etapas do processo, tais como incubação, estímulo e/ou cultivo das células, são realizadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, a composição celular modificada é uma composição celular de células T primárias CD4⁺ enriquecidas ou CD8⁺ enriquecidas que incluem células T modificadas com um receptor recombinante. Em certas modalidades, as células T são células T humanas. Em alguns aspectos, cultivo das células, tal como para expansão e/ou proliferação das células, é realizado na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em algumas modalidades, as células na composição não foram contatadas com, incubadas com, e/ou expostas ao agente antes de serem cultivadas. Em certas modalidades, o cultivo resulta na proliferação ou expansão das células na composição para produzir uma composição de saída que compreende células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ modificadas.

[0079] Fabricação de células T geneticamente modificadas, tais como as células CAR-T, para uso em terapia celular envolve isolamento de células, ativação de células, transdução ou modificação de células com um receptor recombinante e expansão de células T para dosagem clínica. Este processo pode resultar em uma porção do produto de fármaco de célula T modificada que, em alguns casos, pode incluir células que foram levadas a um estado de esgotamento terminal e/ou

em que as células não têm persistência e/ou não exibem eficácia ótima. Em alguns casos, multipotência e potencial replicativo de célula T são diminuídos. Em alguns aspectos, um produto de fármaco de célula T modificada contendo células esgotadas pode, em alguns casos, limitar a eficácia potencial do produto de fármaco de célula T. Métodos alternativos para fabricação de terapias de célula modificada são necessários para minimizar ou reduzir a percentagem ou número de células que são ou provavelmente se tornarão esgotadas, não têm persistência e/ou têm eficácia reduzida quando administradas a um indivíduo.

[0080] Os métodos fornecidos aqui são baseados em observações que a persistência, falta de esgotamento e/ou eficácia de células modificadas, por exemplo, células CAR-T, são melhorados por fabricação ou produção das células na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em alguns aspectos, o agente é um inibidor de alvo mamífero de rapamicina (mTOR), tal como mamífero, por exemplo, humano, mTOR. Em algumas modalidades, o agente é específico para mTOR e não inibe ou tem atividade alvo contra outras cinases relacionadas, tais como uma cinase da família fosfoinositida 3-cinase (PI3-cinase). mTOR é uma cinase evolutivamente conservada com homologia de sequência substancial com a família fosfoinositida 3-cinase (PI3-cinase). Ao contrário de PI3K, mTOR não é uma cinase lipídica, mas sim uma proteína cinase serina-treonina. Em células de mamífero, mTOR é codificado como um único gene cujo produto de proteína sinaliza por meio de dois complexos distintos (mTORC1 e mTORC2). Em geral, mTOR é pensado para regular vários processos celulares incluindo crescimento celular e proliferação. Em células T, mTOR pode ser ativado por vários estímulos que incluem ativação de receptores de citocina e receptores de célula T.

[0081] Em alguns aspectos, os métodos fornecidos são usados em

conexão com um processo pelo qual células T modificadas são incubadas, cultivadas, e/ou submetidas à cultura na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, que pode, em alguns aspectos, melhorar ou realçar expansão, persistência, e/ou eficácia, por exemplo, atividade antitumor, das células. Em alguns aspectos, um agente que inibe a atividade de mTORC1 e mTORC2 cinase é usado. Em certas modalidades, o agente é um inibidor de mTOR seletivo, por exemplo, não inibe uma cinase adicional, por exemplo, PI3K. Em alguns aspectos, o agente é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246.

[0082] Em alguns aspectos, os métodos fornecidos produzem composições de células que incluem células T primárias modificadas para expressar um receptor recombinante (“células modificadas”), tal como para uso em terapia celular, que contém menos células esgotadas e/ou menos células que exibem marcadores ou fenótipos associados com esgotamento quando comparadas a composições de células modificadas que são produzidas por métodos alternativos, tais como métodos alternativos que não são realizados na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em modalidades particulares, as células modificadas produzidas pelos métodos fornecidos contêm uma percentagem aumentada de células T tipo memória, tais como células T de memória de vida longa, comparadas a células de composições de células modificadas produzidas por processos alternativos, tais como métodos que não são realizados na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, por exemplo, atividade de cinase, tal como atividade de cinase mTORC1 ou mTORC2. Em certos aspectos, as células modificadas produzidas pelos métodos fornecidos são menos diferenciadas que células modificadas produzidas por métodos alternativos. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos produzem células modificadas com expansão melhorada ou realçada, persistência, e/ou atividade antitumor quando comparadas às células

modificadas que são geradas por métodos alternativos, tais como métodos alternativos que não realizados na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Portanto, em alguns aspectos, os métodos fornecidos podem gerar composições de células modificadas com eficácia terapêutica melhorada quando comparadas às composições de célula modificadas produzidas por métodos alternativos, tais como métodos alternativos que não são realizados na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, os métodos fornecidos podem gerar composições de células modificadas com uma durabilidade clínica de resposta quando comparadas às composições de célula modificada produzidas por métodos alternativos. Em algumas das modalidades, a comparação a um processo alternativo é o mesmo processo que difere apenas na medida em que o processo alternativo não é realizado na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR.

[0083] Todas as publicações, incluindo documentos de patente, artigos científicos e base de dados, referidos neste pedido são incorporados por referência em sua íntegra, para todos os propósitos na mesma extensão como se cada publicação individual fosse individualmente incorporada por referência. Se uma definição fornecida aqui é contrária a ou de outro modo inconsistente com uma definição fornecida nas patentes, pedidos, pedidos publicados, e outras publicações que são incorporadas aqui por referência, a definição fornecida aqui prevalece sobre a definição que é incorporada aqui por referência.

[0084] Os títulos das seções usados aqui são para propósitos organizacionais apenas e não são construídos como limitando o assunto descrito.

I. PROCESSO PARA ISOLAR, CULTIVAR, E MODIFICAR CÉLULAS PARA TERAPIA CELULAR ADOTIVA

[0085] São fornecidos aqui métodos para gerar uma composição de saída de células modificadas, tais como células T CD4+ primárias modificadas e/ou células T CD8+ modificadas, 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 algumas modalidades, os métodos fornecidos aqui são usados em conexão com um processo que inclui incubar, cultivar, e/ou submeter à cultura células na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63, para gerar a composição de saída de células modificadas. Em algumas modalidades, os métodos são usados em conexão com um processo que inclui cultivar uma composição de células modificadas, tal como sob condições que promovem expansão e/ou proliferação, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63, para gerar a composição de saída de células modificadas. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe atividade de uma ou mais cinases adicionais. Em algumas modalidades, o agente seletivamente e/ou especificamente inibe atividade de mTOR. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é um agente como descrito aqui, tal como na Seção II. Em algumas modalidades, o agente inibe atividade de mTOR cinase. Em certas modalidades, o agente que inibe mTORC1 e/ou mTORC2. Em modalidades particulares, o agente é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246. Em certas modalidades, o agente é Composto 63.

[0086] Em algumas modalidades, os métodos para gerar ou produzir células modificadas, por exemplo, células T CD4+ modificadas e/ou células T CD8+ modificadas, incluem um ou mais isolamentos de célula de um indivíduo, preparação, processamento, incubação sob condições de estímulo, e/ou modificação (por exemplo, transdução) das

células. Em algumas modalidades, o método inclui etapas de processamento realizadas em uma ordem em que: células de entrada, por exemplo, células primárias, são primeiramente isoladas, tal como selecionadas ou separadas, de uma amostra biológica; células de entrada são incubadas sob condições de estimulação, modificadas com partículas de vetor, por exemplo, partículas de vetor viral, para introduzir um polinucleotídeo recombinante nas células, por exemplo, por transdução ou transfecção; cultivar as células modificadas, por exemplo, células transduzidas, tal como expandir as células; e coletar, colhendo, e/ou enchendo um recipiente com todas ou uma porção das células para formular as células em uma composição de saída. Em algumas modalidades, as células da composição de saída geradas são reintroduzidas no mesmo indivíduo, antes ou após criopreservação. Em algumas modalidades, as composições de saída de células modificadas são adequadas para uso em uma terapia, por exemplo, uma terapia celular autóloga.

[0087] Em algumas modalidades, uma ou mais etapas ou estágios são realizados na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, uma ou mais etapas de isolamento, enriquecimento, incubação, modificação, transdução, transfecção, cultivo, cultura, coleta, formulação, armazenamento, e/ou criocongelamento de células das composições celulares são realizadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR.

[0088] Em algumas modalidades, células modificadas são cultivadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal como qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63, e, em certas modalidades, as células não foram contatadas com,

incubadas com, e/ou expostas a um agente que inibe a atividade de mTOR antes do cultivo. Em algumas modalidades, as células de entrada, as células estimuladas, e/ou as células modificadas, antes do cultivo das células, não induzem ou estimulam sua expansão ou proliferação, sendo contatadas, expostas, e/ou incubadas com um agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, as etapas de isolamento, enriquecimento, incubação sob uma ou mais condições de ativação, modificação, transdução, transfecção, formulação, armazenamento, e/ou criocongelamento não são realizadas na presença de um inibidor de mTOR.

[0089] Em modalidades particulares, os métodos fornecidos são usados em conexão com geração de composições de saída de células expressando um receptor recombinante de uma composição inicial e/ou de entrada de células. Em algumas modalidades, a composição de células é uma composição de células T enriquecidas, células T CD4+ enriquecidas, e/ou células T CD8+ enriquecidas (doravante também referidas como as composições de células T enriquecidas, composições de células T CD4+ enriquecidas, e composições de células T CD8+ enriquecidas, respectivamente). Em certas modalidades, a composição de células T enriquecidas, células T CD4+ enriquecidas, ou células T CD8+ enriquecidas é cultivada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em algumas modalidades, uma composição de células T CD4+ enriquecidas é cultivada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63. Em certas modalidades, uma composição de células T CD8+ enriquecidas é cultivada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR.

[0090] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos são usados em conexão com incubação de uma composição de entrada que inclui células T primárias sob condições estimulatórias. Em algumas

modalidades, as condições estimulatórias são ou incluem incubar a composição de entrada na presença de um reagente estimulatório. Em certas modalidades, o reagente estimulatório é ou inclui contos, por exemplo, contos paramagnéticos, com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 conjugados à superfície. Em modalidades particulares, as células da composição de entrada não são expostas ao agente que inibe a atividade de mTOR antes ou durante a incubação. Em alguns aspectos, incubação é realizada com uma composição de entrada de células T enriquecidas, por exemplo, células CD4+ e CD8+. Em algumas modalidades, a composição de entrada é ou inclui células T CD4+ enriquecidas. Em certas modalidades, a composição de entrada é ou inclui células CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades, composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+, por exemplo, da mesma amostra biológica, são separadamente incubadas. Em algumas modalidades, as condições estimulatórias da incubação podem ser as mesmas para ambas as composições. Em certas modalidades, as condições estimulatórias podem ser diferentes. Em certas modalidades, a incubação de uma ou mais composições de entrada sob condições estimulatórias gera uma ou mais composições estimuladas.

[0091] Em certas modalidades, um receptor recombinante é introduzido nas células da composição estimulada. Em certas modalidades, o receptor recombinante é introduzido na célula por transdução da composição estimulada com um vetor viral. Em certas modalidades, o vetor viral é ou inclui um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante. Em algumas modalidades, o vetor viral é um vetor retroviral. Em certas modalidades, o vetor viral é um vetor lentiviral ou vetor gamarretroviral. Em algumas modalidades, a composição estimulada inclui ou contém células T enriquecidas, por exemplo, células CD4+ e CD8+. Em algumas modalidades, a composição

estimulada é ou inclui células T CD4+ enriquecidas. Em modalidades particulares, a composição estimulada é ou inclui células CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades, as composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+, por exemplo, da mesma amostra biológica, são separadamente modificadas. Em modalidades particulares, o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR). Em modalidades particulares, o CAR é um CAR anti-CD19.

[0092] Em algumas modalidades, uma composição de células modificadas, por exemplo, células transduzidas ou transfectadas para expressar um receptor recombinante, é cultivada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63. Em certas modalidades, o cultivo resulta na proliferação e/ou expansão das células na composição, tal como para produzir uma composição de saída que contém células T modificadas. Em alguns aspectos, as células da composição não foram expostas a, contactadas com, e/ou incubadas com o agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63, antes do cultivo. Em certas modalidades, as células não foram previamente incubadas, cultivadas, estimuladas, modificadas, transduzidas, e/ou transfectadas na presença do agente inibidor de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63.

[0093] Em certas modalidades, a composição modificada de células é uma composição modificada de células T CD4+ enriquecidas. Em modalidades particulares, a composição modificada é uma composição de células T CD8+ modificadas. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos são usados em conexão separadamente cultivando composições modificadas separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas na presença de um agente que inibe a

atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63.

[0094] Em algumas modalidades, o agente inibe, reduz, e/ou diminui uma ou mais atividades associadas com mTOR. Em algumas modalidades, a atividade é uma atividade de cinase. Em algumas modalidades, a atividade é uma atividade de mTORC1 e/ou mTORC2. Em algumas modalidades, o agente é selecionado do grupo consistindo em BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI-103, SAR245409, SF1126, VS5584, ou XL765, pirazolopirimidina, Torin I, Torkinibe, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a, AZD8055, rapamicina, tensirolimus, everolimus, deforolimus, ou AZD8055. Em certas modalidades, o agente é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246. Em algumas modalidades, o agente é Composto 63.

[0095] Em certas modalidades, a composição de células é uma composição de células T enriquecidas, células T CD4+ enriquecidas, e/ou células T CD8+ enriquecidas (doravante também referidas como as composições de células T enriquecidas, composições de células T CD4+ enriquecidas, e composições de células T CD8+ enriquecidas, respectivamente). Em certas modalidades, a composição de células T enriquecidas, células T CD4+ enriquecidas, ou células T CD8+ enriquecidas é incubada sob condições estimulatórias na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas, células T CD4+ enriquecidas, ou células T CD8+ enriquecidas é geneticamente modificada, por exemplo, transduzida ou transfectada, para expressar um receptor recombinante na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal com qualquer um dos aqui descritos, por exemplo, Composto 63.

[0096] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos são

usados em associação com o isolamento, separação, seleção, ativação ou estímulo, transdução, lavagem, suspensão, diluição, concentração, e/ou formulação de uma única composição de células T enriquecidas. Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas é uma composição de células que inclui células T CD4+ enriquecidas. Em certas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas contém pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou 99,9% de células T CD4+. Em modalidades 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 modalidades, a composição de células T enriquecidas inclui ou contém menos que 20%, menos que 10%, menos que 5%, menos que 1%, menos que 0,1%, ou menos que 0,01% de células T CD8+, e/ou não contém células T CD8+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+. Em algumas modalidades, as populações de células consistem essencialmente em células T CD4+.

[0097] Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas é uma composição de células T CD8+ enriquecidas. Em certas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas contém pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou 99,9% de células T CD8+, ou contém ou contém cerca de 100% de células T CD8+. Em certas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas inclui ou contém menos que 20%, menos que 10%, menos que 5%, menos que 1%, menos que 0,1%, ou menos que 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém células T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+. Em algumas modalidades, as populações de células consistem essencialmente em células T CD8+.

[0098] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos são usados em conexão com geração de duas ou mais composições de saída separadas de células T enriquecidas. Em algumas modalidades,

os métodos fornecidos são separadamente realizados em duas ou mais composições separadas de células T enriquecidas. Em certas modalidades, os métodos podem ser usados em conexão separadamente ativando e/ou estimulando duas ou mais composições de células T enriquecidas; separadamente modificando duas ou mais composições de células T enriquecidas; e/ou separadamente cultivando duas ou mais composições de células T enriquecidas. Em certas modalidades, os métodos podem também ser usados em conexão com isolamento ou seleção de células diferentes de uma amostra biológica para gerar composição de entrada separada de células T enriquecidas, tal como composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas. Em modalidades particulares, os métodos fornecidos podem ser usados em conexão separadamente colhendo, coletando, e/ou formulando composições separadas de células T enriquecidas após as células terem sido incubadas, ativadas, estimuladas, modificadas, transduzidas, transfectadas, e/ou cultivadas. Em algumas modalidades, as duas ou mais composições separadas de células T enriquecidas incluem uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em certas modalidades, as duas ou mais composições separadas incluem células T CD8+. Em algumas modalidades, as duas ou mais composições separadas incluem uma composição de células T CD4+ enriquecidas e uma composição de células T CD8+ enriquecidas.

[0099] Em modalidades particulares, as composições de células T enriquecidas podem ser coletadas, formuladas para crioproteção, criocongelamento, e/ou armazenadas abaixo de 0 °C, abaixo de -20 °C, ou em ou abaixo -70 °C ou -80 °C antes, durante, ou após qualquer estágio ou etapa do processo para gerar composições de saída de células T enriquecidas expressando receptores recombinantes. Em algumas modalidades, as células podem ser armazenadas por uma quantidade de tempo inferior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 dias, ou uma

quantidade de tempo inferior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas, ou durante uma quantidade de tempo de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 semanas, ou durante mais que 8 semanas. Após armazenamento, as composições de células T enriquecidas podem ser descongeladas e o processamento pode ser tomado do mesmo ponto no processo. Em algumas modalidades, as composições de entrada de células T enriquecidas são criocongeladas e armazenadas antes do processamento adicional, por exemplo, incubação sob condições de estimulação. Em modalidades particulares, 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.

[0100] Em certas modalidades, composições de célula separadas de células T enriquecidas são combinadas em uma composição única. Por exemplo, em algumas modalidades, uma composição de células T CD4+ enriquecidas é combinada com uma composição de células T CD8+ enriquecidas em uma composição única de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas. Em certas modalidades, as composições separadas originadas, por exemplo, foram inicialmente isoladas, selecionadas, e/ou enriquecidas, da mesma amostra biológica, tal como a mesma amostra biológica obtida, coletada, e/ou tomada de um único indivíduo. Em algumas modalidades, as composições separadas são separadamente processadas para uma ou mais etapas ou estágios de um processo para gerar composições de saída, por exemplo, um processo em conexão com os métodos fornecidos. Em algumas modalidades, as composições separadas podem ser combinadas em uma composição única antes de, durante, ou subsequente a qualquer etapa ou estágio do processo para gerar composições de saída. Portanto, em algumas modalidades, composições separadas, de entrada, estimuladas, modificadas, cultivadas, formuladas, e/ou

colhidas de células T enriquecidas da mesma amostra biológica são combinadas em uma composição única e, em certas modalidades, são também processadas como uma composição única. Em certas modalidades, composições de saída separadas de células enriquecidas são combinadas em uma composição única de saída antes de administrar as células a um indivíduo.

[0101] Em certas modalidades, em qualquer estágio ou etapa no processo, uma porção das células pode ser amostrada ou coletada, por exemplo, células podem ser tomadas de uma composição de células T enriquecidas enquanto a composição permanece no sistema fechado, tal como o isolamento, incubação, modificação, cultivo, e/ou formulação. Em certas modalidades, tais células podem ser analisadas para marcadores, recursos, ou características incluindo, mas não limitadas a viabilidade, apoptose, ativação, estímulo, crescimento, e/ou esgotamento. Em algumas modalidades, as células são amostradas ou coletadas por um processo automatizado enquanto a composição de células T enriquecidas permanece no sistema fechado. Em algumas modalidades, a análise de células amostradas ou coletadas é automatizada. Em modalidades particulares, a análise é realizada em um sistema fechado sob condições estéreis.

[0102] São também fornecidas células e composições preparadas pelos métodos, incluindo composições farmacêuticas e formulações, e kits, sistemas, e dispositivos para realizar os métodos. São também fornecidos métodos para uso das células e composições preparadas pelos métodos, incluindo métodos terapêuticos, tais como métodos de terapia celular adotiva, e composições farmacêuticas para administração a indivíduos.

A. Amostras e Preparações Celulares

[0103] Em modalidades particulares, os métodos fornecidos são usados em conexão com isolamento, seleção, e/ou enriquecimento de

células de uma amostra biológica para gerar uma ou mais composições de entrada de células enriquecidas, por exemplo, células T. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos incluem isolamento de células ou composições das mesmas de amostras biológicas, tais como aquelas obtidas de ou derivadas de um indivíduo, tal como uma tendo uma doença ou condição particular ou em necessidade de uma terapia celular ou a quem a terapia celular irá ser 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 a qual as células são isoladas, processadas, e/ou modificadas. Portanto, as células em algumas modalidades são células primárias, por exemplo, células humanas primárias. As amostras incluem tecido, fluido, e outras amostras tomadas diretamente do indivíduo. A amostra biológica pode ser uma amostra obtida diretamente de uma fonte biológica ou uma amostra que é processada. Amostras biológicas incluem, mas não são limitadas a, fluidos corporais, tais como sangue, plasma, soro, líquido cefalorraquidiano, fluido sinovial, urina e suor, amostras de tecido e órgão, incluindo amostras processadas derivadas delas.

[0104] 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, cérvix, testículos, ovários, amígdala, ou outro órgão, e/ou células derivadas deles. Amostras incluem, no contexto de terapia celular, por exemplo, terapia celular adotiva, amostras de fontes autólogas e alogênicas.

[0105] Em alguns exemplos, células do sangue circulante de um indivíduo são obtidas, por exemplo, por aferese ou leucaferese. As amostras, em alguns aspectos, contém linfócitos, incluindo células T, monócitos, granulócitos, células B, outros glóbulos brancos nucleados, glóbulos vermelhos, e/ou plaquetas, e em alguns aspectos contém células que não glóbulos vermelhos e plaquetas.

[0106] Em algumas modalidades, as células sanguíneas coletadas do indivíduo são lavadas, por exemplo, para remover a fração de plasma e para colocar as células em um tampão apropriado ou meio para processamento subsequente de etapas. Em algumas modalidades, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em algumas modalidades, a solução de lavagem não tem cálcio e/ou magnésio e/ou muitos ou todos os cátions divalentes. Em alguns aspectos, uma etapa de lavagem é realizada uma centrífuga de "fluxo contínuo" semi-automatizada (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 modalidades, as células são ressuspensas em várias tampões biocompatíveis após lavagem, tais como, por exemplo, PBS livre de Ca^{++} / Mg^{++} . Em certas modalidades, componentes de uma amostra de célula sanguínea são removidos e as células diretamente ressuspensas em meio de cultura.

[0107] Em algumas modalidades, os métodos de preparação incluem etapas para congelamento, por exemplo, criopreservação, as células, antes ou após isolamento, seleção e/ou enriquecimento e/ou incubação para transdução e modificação, e/ou após cultivo e/ou colheita das células modificadas. Em algumas modalidades, a etapa de congelamento e subsequente descongelamento removem granulócitos e, até certo ponto, monócitos na população celular. Em algumas

modalidades, as células são suspensas em uma solução de congelamento, por exemplo, após uma etapa de lavagem para remover plasma e plaquetas. Qualquer de várias soluções e parâmetros de congelamento em alguns aspectos pode ser usada. Em algumas modalidades, as células são congeladas, por exemplo, criocongeladas ou criopreservadas, em meio e/ou solução com uma concentração final de ou de cerca de 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5%, ou 5,0% DMSO, ou entre 1% e 15%, entre 6% e 12%, entre 5% e 10%, ou entre 6% e 8% de DMSO. Em modalidades particulares, as células são congeladas, por exemplo, criocongeladas ou criopreservadas, em meio 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. Um exemplo envolve o uso de PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina sérica humana (HSA), ou outro meio de congelamento celular adequado. Este é em seguida diluído 1:1 com meio de modo que a concentração final de DMSO e HSA seja de 10% e 4%, respectivamente. As células são geralmente em seguida congeladas a, ou a cerca de -80°C em uma taxa de ou de cerca de 1° por minuto e armazenadas na fase de vapor de um tanque de armazenagem de nitrogênio líquido.

[0108] Em algumas modalidades, isolamento das células ou populações inclui uma ou mais etapas de preparação e/ou separação celular com base em não afinidade. Em alguns exemplos, células são lavadas, centrifugadas e/ou incubadas na presença de um ou mais reagentes, por exemplo, para remover componentes indesejados, enriquecer para os componentes desejados, lisar ou remover células sensíveis a reagentes particulares. Em alguns exemplos, as células são separadas com base em uma ou mais propriedades, tal como

densidade, propriedades de aderência, tamanho, sensibilidade e/ou resistência a componentes particulares. Em algumas modalidades, os métodos incluem métodos de separação celular com base na densidade, tal como a preparação de glóbulos brancos a partir de sangue periférico a partir da lisação dos glóbulos vermelhos e centrifugação através de um gradiente de Percoll ou Ficoll.

[0109] Em algumas modalidades, pelo menos uma parte da etapa de seleção inclui incubação de células com um reagente de seleção. A incubação com um reagente ou reagentes de seleção, por exemplo, como parte de métodos de seleção que podem ser realizados usando um ou mais reagentes de seleção para seleção de um ou mais tipos diferentes de células com base na expressão ou presença em 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 modalidades, qualquer método conhecido usando um reagente ou reagentes de seleção para separação com base nesses marcadores pode ser usado. Em algumas modalidades, o reagente ou reagentes de seleção resultam em uma separação que é uma separação com base em afinidade ou imunoafinidade. Por exemplo, a seleção em alguns aspectos inclui incubação com um reagente ou reagentes para separação de células e populações de células com base na expressão ou nível de expressão das células de um ou mais marcadores, tipicamente marcadores de superfície celular, por exemplo, por incubação com um anticorpo ou parceiro de ligação que especificamente se liga a 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.

[0110] Em alguns aspectos de tais processos um volume de células é misturado com uma quantidade desejada de reagente de seleção com

base em afinidade. A seleção baseada em imunoafinidade pode ser realizada usando qualquer sistema ou método que resulte em uma interação energética favorável entre as células sendo separadas e a molécula se ligando especificamente ao marcador na célula, por exemplo, o anticorpo ou outro parceiro de ligação na superfície do sólido, por exemplo, partícula. Em algumas modalidades, métodos são realizados usando partículas como contas, por exemplo, contas magnéticas, que são revestidas com um agente de seleção (por exemplo, anticorpo) específico para o marcador das células. As partículas (por exemplo, contas) podem ser incubadas ou misturadas com células em um recipiente, tal como um tubo ou bolsa, enquanto agitando ou misturando, com uma relação de densidade celular constante para partícula (por exemplo, conta) para ajudar na promoção de interações energeticamente favorecidas. Em outros casos, os métodos de seleção de células nas quais toda ou uma parte da seleção é realizada na cavidade interna de uma câmara centrífuga, por exemplo, sob rotação centrífuga. Em algumas modalidades, incubação de células com reagentes de seleção, tal como reagentes de seleção com base em imunoafinidade, é realizada em uma câmara centrífuga. Em certas modalidades, o isolamento ou separação é realizada usando um sistema, dispositivo, ou aparato descrito no Pedido de Patente Internacional, Publicação Número WO2009/072003, ou US 20110003380 A1. Em um exemplo, o sistema é um sistema como descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602.

[0111] Em algumas modalidades, conduzindo tais etapas de seleção ou partes das mesmas (por exemplo, incubação com partículas revestidas com anticorpo, por exemplo, contas magnéticas) na cavidade de uma câmara centrífuga, o usuário é capaz de controlar certos parâmetros, como volume de várias soluções, adição de solução durante processamento e temporização das mesmas, o que pode

oferecer vantagens em comparação com outros métodos disponíveis. Por exemplo, a capacidade de diminuir o volume de líquido na cavidade durante a incubação pode aumentar a concentração das partículas (por exemplo, reagente de contagem) usadas na seleção e, desse modo, o potencial químico da solução, sem afetar o número de células na cavidade. Isto, por sua vez, pode realçar as interações em pares entre as células que estão sendo processadas e as partículas usadas para a seleção. Em algumas modalidades, a realização da etapa de incubação na câmara, por exemplo, quando associada com os sistemas, circuitos, e controle como aqui descrito, permite que o usuário realize a agitação da solução no(s) tempo(s) desejado(s) durante a incubação, o que pode melhorar a interação.

[0112] Em algumas modalidades, pelo menos uma parte da etapa de seleção é realizada em uma câmara centrífuga que inclui incubação de 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 desejado com base na afinidade que é muito menos do que é normalmente empregado ao realizar seleções semelhantes em um tubo ou recipiente para seleção do mesmo número de células e/ou volume de células de acordo com as instruções do fabricante. Em algumas modalidades, é empregada uma quantidade de reagente ou reagentes de seleção que não é mais do que 5%, não mais do que 10%, não mais do que 15%, não mais do que 20%, não mais do que 25%, não mais do que 50%, não mais do que 60%, não mais do que 70% ou não mais do que 80% da quantidade do(s) mesmo(s) reagente(s) de seleção empregado(s) para seleção de células em uma incubação com base em tubo ou recipiente para o mesmo número de células e/ou o mesmo volume de células de acordo com as instruções do fabricante.

[0113] Em algumas modalidades, para seleção, por exemplo, seleção

das células com base em imunoafinidade, as células são incubadas na cavidade da câmara em uma composição que também contém o tampão de seleção com um reagente de seleção, como uma molécula que se liga especificamente a um marcador de superfície em uma célula desejada para enriquecer e/ou esgotar, mas não em outras células na composição, como um anticorpo, que opcionalmente é acoplado a uma estrutura, como um polímero ou superfície, por exemplo, conta, por exemplo, conta magnética, como contas magnéticas acopladas a anticorpos monoclonais específicos para CD4 e CD8. Em algumas modalidades, como descrito, o reagente de seleção é adicionado às células na cavidade da câmara em uma quantidade substancialmente menor do que (por exemplo, não mais do que 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80% da quantidade) em comparação à quantidade de reagente de seleção que é tipicamente usada ou seria necessária para atingir a mesma ou similar eficiência de seleção do mesmo número de células ou do mesmo volume de células quando a seleção é realizada em um tubo com agitação ou rotação. Em algumas modalidades, a incubação é realizada com a adição de um tampão de seleção às células e reagente de seleção para atingir um volume alvo com a incubação do reagente de, por exemplo, 10 mL a 200 mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL ou 200 mL. Em algumas modalidades, o tampão de seleção e o reagente de seleção são pré-misturados antes da adição às células. Em algumas modalidades, o tampão de seleção e o reagente de seleção são separadamente adicionados às células. Em algumas modalidades, a seleção de incubação é realizada com condição de mistura suave periódica, que pode auxiliar na promoção de interações energeticamente favorecidas e desse modo permitir o uso de menos reagente de seleção geral enquanto obtém uma alta eficiência de

seleção.

[0114] Em algumas modalidades, a duração total da incubação com o reagente de seleção é de, ou de cerca de 5 minutos a 6 horas, tal como 30 minutos a 3 horas, por exemplo, pelo menos ou cerca de pelo menos 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos ou 180 minutos.

[0115] Em algumas modalidades, a incubação geralmente é realizada sob condições de mistura, tal como na presença de rotação, geralmente em força ou velocidade relativamente baixas, como velocidade menor que aquela usada para peletizar as células, tal como de, ou de cerca de 600 rpm a 1700 rpm (por exemplo, de, 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 de cerca de 80g a 100g (por exemplo, de, ou cerca de, ou pelo menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, ou 100 g). Em algumas modalidades, a rotação é realizada usando intervalos repetidos de uma rotação em tal baixa velocidade seguida por um período de repouso, tal como uma rotação e/ou repouso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 segundos, tal como uma rotação em aproximadamente 1 ou 2 segundos seguida por um repouso durante aproximadamente 5, 6, 7, ou 8 segundos.

[0116] Em algumas modalidades, tal processo é realizado dentro do sistema totalmente fechado do qual a câmara é parte integrante. Em algumas modalidades, esse processo (e em alguns aspectos também uma ou mais etapas adicionais, como uma etapa de lavagem anterior, que lava uma amostra contendo as células, como uma amostra de aférese) é executado de uma maneira automatizada, de modo que as células, o reagente e outros componentes sejam puxados para dentro e empurrados para fora da câmara em momentos apropriados e centrifugação efetuada, de modo a concluir a etapa de lavagem e ligação em um único sistema fechado usando um programa automatizado.

[0117] Em algumas modalidades, após incubação e/ou mistura das células e reagente e/ou reagentes de seleção, as células incubadas são submetidas a uma separação para selecionar células com base na presença ou ausência do reagente ou reagentes específicos. Em algumas modalidades, a separação é realizada no mesmo sistema fechado em que foi realizada a incubação das células com o reagente de seleção. Em algumas modalidades, após a incubação com os reagentes de seleção, as células incubadas, incluindo células em que o reagente de seleção se ligou, são transferidas para um sistema de separação das células com base em imunoafinidade. Em algumas modalidades, o sistema de separação com base em imunoafinidade é ou contém uma coluna de separação magnética.

[0118] Tais etapas de separação podem ser baseadas em seleção positiva, em que as em que as células que se ligaram aos reagentes, por exemplo, anticorpo ou parceiro de ligação, são retidas para uso posterior, e/ou seleção negativa, em que as que células não se ligaram ao reagente, por exemplo, anticorpo ou parceiro de ligação, são retidas. Em alguns exemplos, ambas as frações são retidas para uso posterior. Em alguns aspectos, seleção negativa pode ser particularmente útil quando não há anticorpo disponível que identifique especificamente um tipo de célula em uma população heterogênea, tal que a separação seja melhor realizada com base em marcadores expressos por células que não a população desejada.

[0119] Em algumas modalidades, as etapas de processo ainda incluem a seleção negativa e/ou positiva das células incubadas, como o uso de um sistema ou aparato que pode executar uma seleção com base em afinidade. Em algumas modalidades, o isolamento é realizado por enriquecimento para uma população celular particular por seleção positiva, ou depleção de uma população celular específica, por seleção negativa. Em algumas modalidades, a seleção positiva ou negativa é

realizada incubando células com um ou mais anticorpos ou outro agente de ligação que se ligam especificamente a um ou mais marcadores de superfície expressos (marcador +) ou expressos em um nível relativamente mais alto (marcador^{alto}) nas células selecionadas positivamente ou negativamente, respectivamente.

[0120] A separação não precisa resultar em 100% de enriquecimento ou remoção de uma particular população de células ou células expressando um marcador particular. Por exemplo, seleção positiva de ou enriquecimento para células de um tipo particular, tal como aquelas que expressam um marcador, refere-se ao aumento do número ou porcentagem dessas células, mas não precisa resultar em uma ausência completa de células que não expressam o marcador. Da mesma forma, seleção negativa, remoção ou esgotamento de células de um tipo particular, tal como aquelas que expressam um marcador, refere-se à diminuição do número ou porcentagem dessas células, mas não precisa resultar na remoção completa de todas essas células.

[0121] Em alguns exemplos, várias rodadas de etapas de separação são realizadas, onde a fração selecionada positivamente ou negativamente de uma etapa é sujeita a outra etapa de separação, como uma seleção positiva ou negativa subsequente. Em alguns exemplos, uma única etapa de separação pode esgotar as células que expressam múltiplos marcadores simultaneamente, como incubando células com vários anticorpos ou parceiros de ligação, cada um específico para um marcador direcionado para seleção negativa. Da mesma forma, vários tipos de células podem ser simultaneamente selecionados positivamente por incubação de células com várias anticorpos ou parceiros de ligação expressos nos vários tipos de células.

[0122] Por exemplo, em alguns aspectos, subpopulações específicas de células T, tais como células positivas ou expressando

altos níveis de um ou mais marcadores de superfície, por exemplo, células T CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, e/ou CD45RO+, são isoladas por técnicas de seleção positivas ou negativas. Em algumas modalidades, tais células são selecionadas por incubação com um ou mais anticorpos ou parceiro de ligação que especificamente se liga a tais marcadores. Em algumas modalidades, o anticorpo ou parceiro de ligação pode ser conjugado, como direta ou indiretamente, a um suporte sólido ou matriz para efetuar a seleção, como uma conta magnética ou conta paramagnética. Por exemplo, células CD3+, CD28+ T podem ser positivamente selecionadas usando contas magnéticas conjugadas CD3/CD28c (por exemplo, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander, e/ou contas ExpACT®).

[0123] Em algumas modalidades, as células T são separadas de uma amostra de PBMC por seleção negativa de marcadores expressos em células não T, como células B, monócitos, ou outros glóbulos brancos, tais como CD14. Em alguns aspectos, a etapa de seleção CD4+ ou CD8+ é usada para separar células T CD4 + auxiliares e CD8 + citotóxicas. Tais populações CD4 + e CD8 + podem ser ainda classificadas em subpopulações por seleção positiva ou negativa para marcadores expressos ou expressos em um grau relativamente mais alto em uma ou mais subpopulações de células T virgens de memória e/ou efetoras.

[0124] Em algumas modalidades, as células T CD8 + são ainda enriquecidas por, ou esgotada de células tronco virgens, memória central, memória efetora, e/ou memória central, tal como por seleção positiva ou negativa com base em antígenos de superfície associados à respectiva subpopulação. Em algumas modalidades, enriquecimento para células T de memória central (TCM) é realizada para aumentar a eficácia, como melhorar a sobrevivência em longo prazo, expansão e/ou

enxerto após a administração, o que em alguns aspectos é particularmente robusto nessas subpopulações. Ver Terakura *et al.*, (2012) *Blood*. 1:72–82; Wang *et al.* (2012) *J Immunother*. 35(9):689-701. Em algumas modalidades, a combinação de células T CD8+ enriquecidas com TCM e células T CD4 + realçam ainda mais a eficácia.

[0125] Em modalidades, células T de memória estão presentes nos subconjuntos CD62L+ e CD62L- dos linfócitos do sangue periférico CD8+. O PBMC pode ser enriquecido ou reduzido das frações CD62L-CD8+ e/ou CD62L+CD8+, como o uso de anticorpos anti-CD8 e anti-CD62L.

[0126] Em algumas modalidades, o enriquecimento para células T de memória central (TCM) é baseado na expressão superficial positiva ou alta de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, e/ou CD 127; Em alguns aspectos, baseia-se na seleção negativa para células que expressam ou que expressam altamente CD45RA e/ou granzima B. Em alguns aspectos, isolamento de uma população de CD8 + enriquecida para células TCM é realizado pela depleção de células que expressam CD4, CD14, CD45RA e seleção ou enriquecimento positivo para células que expressam CD62L. Em um aspecto, o enriquecimento de células T de memória central (TCM) é realizado a partir de uma fração negativa de células selecionadas com base na expressão de CD4, que é submetida a uma seleção negativa com base na expressão de CD14 e CD45RA e a 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 usada na preparação da população ou subpopulação de células T CD8 +, também é usada para gerar a população ou subpopulação de células T CD4 +, tal que as frações positivas e negativas da separação com base em CD4 sejam retidas e usadas em etapas subsequentes dos

métodos, seguindo opcionalmente uma ou mais etapas de seleção positiva ou negativa. Em algumas modalidades, a seleção para a população de células T CD4+ e a seleção para a população de células T CD8+ são realizadas simultaneamente. Em algumas modalidades, a população de células T CD4+ e a seleção para a população de células T CD8+ são realizadas sequencialmente, em qualquer ordem. Em algumas modalidades, os métodos para selecionar células podem incluir aqueles descritos em publicação de pedido Norte americano US20170037369. Em algumas modalidades, a população de células T CD4+ selecionada e a população de células T CD8+ selecionada podem ser combinadas após a seleção. Em alguns aspectos, a população de células T CD4+ selecionada e a população de células T CD8+ selecionada podem ser combinadas em uma bolsa de biorreator como aqui descrito.

[0127] Em modalidades particulares, uma amostra biológica, por exemplo, uma amostra de PBMCs ou outros glóbulos brancos, são submetidos à seleção de células T CD4+, onde são retidas as frações positiva e negativa. Em certas modalidades, as células T CD8+ são selecionadas da fração negativa. Em algumas modalidades, uma amostra biológica é submetida à seleção de células T CD8+, onde são retidas as frações negativa e positiva. Em certas modalidades, as células T CD4+ são selecionadas da fração negativa.

[0128] Em um exemplo particular, uma amostra de PBMCs ou outra amostra de glóbulos brancos é submetida à seleção de células T CD4+, onde são mantidas as frações negativa e positiva. A fração negativa é então sujeita a seleção negativa com base na expressão de CD14 e CD45RA ou CD19, e seleção positiva com base em um marcador característico das células T da memória central, como CD62L ou CCR7, onde as seleções positiva e negativa são realizadas em ordem.

[0129] As células auxiliares T CD4+ podem ser classificadas em

células virgens, de memória central e efectoras, identificando populações de células que possuem antígenos de superfície celular. Os linfócitos CD4⁺ podem ser obtidos por métodos padrões. Em algumas modalidades, linfócitos T CD4⁺ virgens são células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ ou CD4⁺. Em algumas modalidades, as células T CD4⁺ da memória central são CD62L⁺ e CD45RO⁺. Em algumas modalidades, células T CD4⁺ efectoras são CD62L⁻ e CD45RO⁻.

[0130] Em um exemplo, para enriquecer células T CD4⁺ por seleção negativa, um coquetel de anticorpos monoclonais normalmente inclui anticorpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, e CD8. Em algumas modalidades, o anticorpo ou parceiro de ligação está ligado a um suporte ou matriz sólida, tal como uma conta magnética ou conta paramagnética, para permitir a separação de células para seleção positiva e/ou negativa. Por exemplo, em algumas modalidades, as células e as populações de células são separadas ou isoladas usando técnicas de separação imunomagnética (ou afinidade magnética) (revisadas em *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior in vitro and in vivo*, p 17-25 Editada por: S. A. Brooks e U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[0131] Em alguns aspectos a amostra ou composição incubada das células a serem separadas é incubada com um reagente de seleção contendo material pequeno, magnetizável ou responsivo magneticamente, tal como partículas ou micropartículas com resposta magnética, tal como contas paramagnéticas (por exemplo, como Dynabeads ou contas MACS®). O material responsivo magneticamente, por exemplo, partícula, geralmente é ligado direta ou indiretamente a um parceiro de ligação, por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a uma molécula, por exemplo, marcador de superfície, presente na célula, células ou população de células que se

deseja separar, por exemplo, que se deseja selecionar negativamente ou positivamente.

[0132] Em algumas modalidades, a partícula ou conta magnética compreende um material responsivo magneticamente ligado a um membro de ligação específico, tal como um anticorpo ou outro parceiro de ligação. Muitos materiais bem conhecidos responsivos magneticamente para uso em métodos de separação magnética são conhecidos, por exemplo, aqueles descritos em Molday, Patente Norte Americana No. 4.452.773, e em Relatório Descritivo de Patente Europeia EP 452342 B, que são aqui incorporados por referência. Partículas de tamanho coloidal, como as descritas em Owen Patente Norte Americana No. 4.795.698, e Liberti *et al.*, Patente Norte Americana No. 5.200.084 também podem ser usadas.

[0133] A incubação geralmente é realizada sob condições em que os anticorpos ou parceiros de ligação, ou moléculas, tais como anticorpos secundários ou outros reagentes, que se ligam especificamente a esses anticorpos ou parceiros de ligação, que são ligados à partícula ou conta magnética, se ligam especificamente às moléculas de superfície da célula se presentes nas células da amostra.

[0134] Em certas modalidades, as partículas magneticamente responsivas são revestidas com anticorpos primários ou outros parceiros de ligação, anticorpos secundários, lectinas, enzimas ou estreptavidina. Em certas modalidades, as partículas magnéticas são ligadas às células por meio de um revestimento de anticorpos primários específicos para um ou mais marcadores. Em certas modalidades, as células, em vez das contas, são marcadas com um anticorpo primário ou parceiro de ligação e, em seguida, são adicionadas partículas magnéticas revestidas com anticorpo secundário específico para o tipo de célula ou outro parceiro de ligação (por exemplo, estreptavidina). Em certas modalidades, partículas magnéticas revestidas com

estreptavidina são usadas em conjunto com anticorpos primários ou secundários biotinizados.

[0135] Em alguns aspectos, a separação é alcançada em um procedimento em que a amostra é colocada em um campo magnético e as células que possuem partículas magneticamente responsivas ou magnetizáveis ligadas a ela serão atraídas ao ímã e separadas das células não identificadas. Para seleção positiva, as células atraídas pelo ímã são retidas; para seleção negativa, as células que não são atraídas (células não marcadas) são retidas. Em alguns aspectos, uma combinação de seleção positiva e negativa é realizada durante a mesma etapa de seleção, onde as frações positiva e negativa são retidas e processadas posteriormente ou sujeitas a etapa de separação adicionais.

[0136] Em algumas modalidades, a seleção baseada em afinidade é por meio de classificação celular ativada magneticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Classificação Magnética de Células Ativadas (MACS), por exemplo, os sistemas CliniMACS são capazes de seleção de alta pureza de células com partículas magnetizadas ligadas a elas. Em certas modalidades, MACS opera em um modo em que as espécies não alvo e alvo são sequencialmente eluídas após a aplicação do campo magnético externo. Ou seja, as células ligadas a partículas magnetizadas são mantidas no lugar enquanto as espécies não acopladas são eluídas. Então, após a conclusão desta primeira etapa de eluição, as espécies que foram capturadas no campo magnético e impedidas de serem eluídas são libertadas de alguma maneira, de forma que possam ser eluídas e recuperadas. Em certas modalidades, as células não alvo são marcadas e esgotadas da população heterogênea de células.

[0137] Em algumas modalidades, as partículas magneticamente responsivas são deixadas ligadas às células que serão incubadas

posteriormente, cultivadas e/ou modificadas; em alguns aspectos, as partículas são deixadas presas às células para administração em um paciente. Em algumas modalidades, as partículas magnetizáveis ou magneticamente responsivas são removidas das células. Os métodos para remover partículas magnetizáveis das células são conhecidos e incluem, por exemplo, o uso de anticorpos não marcados concorrentes, partículas magnetizáveis ou anticorpos conjugados com ligantes cliváveis, etc. Em algumas modalidades, as partículas magnetizáveis são biodegradáveis.

[0138] Em algumas modalidades, o isolamento e/ou seleção resulta em uma ou mais composições de entrada de células T enriquecidas, por exemplo, células T CD3+, células T CD4+, e/ou células T CD8+. Em algumas modalidades, duas ou mais composições de entrada separadas são isoladas, selecionadas, enriquecidas ou obtidas de uma única amostra biológica. Em algumas modalidades, composições de entrada separadas são isoladas, selecionadas, enriquecidas e/ou obtidas de amostras biológicas separadas, coletadas, colhidas e/ou obtidas do mesmo indivíduo.

[0139] Em certas modalidades, as referidas uma ou mais composições de entrada são ou incluem uma composição de células T enriquecidas que inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células CD3+ T. Em formas de realizações particulares, a composição de entrada de células T enriquecidas consiste essencialmente em células T CD3+.

[0140] Em certas modalidades, as referidas uma ou mais composições de entrada são ou incluem uma composição de células T CD4+ enriquecidas que inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo

menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em certas modalidades, a composição de entrada de células T CD4+ inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD8+, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+. Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas consiste essencialmente em células T CD4 +.

[0141] Em certas modalidades, as referidas uma ou mais composições é ou incluem uma composição de células T CD8+ que é ou inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD8+. Em certas modalidades, a composição de células T CD8+ contém menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD4+, e/ou contém nas células T CD4+, e/ou está livre ou substancialmente livre de células T CD4 +. Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas consiste essencialmente em células T CD8+.

[0142] Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais composições de entrada de células T enriquecidas são congeladas, por exemplo, criopreservadas e/ou criocongeladas, após isolamento, seleção e/ou enriquecimento. Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais composições de entrada de congelado, por exemplo, criocongeladas e/ou criopreservadas, antes de qualquer etapa de

incubação, ativação, estimulação, alteração, transdução, transfecção, cultivo, expansão, colheita e/ou formulação de uma composição de células. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais composições criocongeladas de entradas são armazenadas, por exemplo, a ou cerca de -80°C .

B. Ativação e Estimulação Celular

[0143] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos são usados em conexão com células de incubação sob condições de estimulação. Em algumas modalidades, as condições estimulantes incluem condições que ativam ou estimulam, são capazes de ativar ou estimular um sinal na célula, por exemplo, uma célula T CD4 +, como um sinal gerado a partir de um TCR e/ou um correceptor. Em algumas modalidades, as condições estimulantes incluem uma ou mais etapas de cultura, cultivo, incubação, ativação e 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 modalidades, o reagente estimulatório estimula e/ou ativa a TCR e/ou um correceptor. Em modalidades particulares, o reagente estimulatório é um reagente descrito na Seção I-B-1.

[0144] Em certas modalidades, 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 a célula, tal como por uma técnica fornecida na Seção I-C. Em modalidades particulares, uma ou mais composições de células T enriquecidas são incubadas sob condições de estimulação após as referidas uma ou mais composições terem sido isoladas, selecionadas, enriquecidas ou obtidas de uma amostra biológica. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais composições são composições de entrada. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais

composições foram previamente criocongeladas e armazenadas, e são descongeladas antes da incubação.

[0145] Em certas modalidades, as referidas uma ou mais composições de células T enriquecidas são ou incluem duas composições separadas, por exemplo, composições separadas de entrada, de células T enriquecidas. Em modalidades particulares, duas composições separadas de células T enriquecidas, por exemplo, duas composições separadas de células T enriquecidas selecionadas, isoladas, e/ou enriquecidas da mesma amostra biológica, são separadamente incubadas sob condições de estimulação. Em certas modalidades, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em modalidades particulares, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades, duas composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são separadamente incubadas sob condições de estimulação. Em algumas modalidades, uma única composição de células T enriquecidas é incubada sob condições de estimulação. Em certas modalidades, a única composição é uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em algumas modalidades, a única composição é uma composição de células T CD8+ e CD4+ enriquecidas que foram combinadas a partir de composições separadas antes da incubação.

[0146] Em algumas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em certas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação inclui menos do que 40%, menos do que

35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD8+, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+.

Em algumas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD8+. Em certas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém células T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+.

[0147] Em algumas modalidades, composições separadas de células T CD8+ e CD4+ enriquecidas são combinadas em uma única composição e são incubadas sob condições de estimulação. Em certas modalidades, composições estimuladas separadas de células T CD4+ enriquecidas e CD8+ enriquecidas são combinadas em uma única composição após a incubação ter sido realizada e/ou concluída.

[0148] Em certas modalidades, 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 a célula, como por uma técnica fornecida na Seção I-C. Em modalidades particulares, uma ou mais composições de células T enriquecidas são incubadas sob condições de estimulação após as

referidas uma ou mais composições terem sido isoladas, selecionadas, enriquecidas ou obtidas de uma amostra biológica. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais composições são composições de entrada. Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais composições de entrada foram previamente criocongeladas e armazenadas, e são descongeladas antes da incubação.

[0149] Em algumas modalidades, a incubação sob condições de estimulação pode incluir cultura, cultivo, estimulação, ativação, propagação, inclusive por incubação na presença de condições estimulantes, por exemplo, condições projetadas para induzir proliferação, expansão, ativação e/ou sobrevivência de células na população, para imitar a exposição a antígenos, e/ou preparar as células para alteração genética, como para a introdução de um receptor de antígeno recombinante. Em modalidades particulares, as condições estimulantes podem usar um ou mais meios particulares, temperatura, conteúdo de oxigênio, conteúdo de dióxido de carbono, tempo, agentes, por exemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, íons e/ou fatores estimulantes, como citocinas, quimiocinas, antígenos, parceiros de ligação, proteínas de fusão, receptores solúveis recombinantes e quaisquer outros agentes projetados para ativar as células.

[0150] Em alguns aspectos, a estimulação e/ou incubação sob condições de estimulação é realizada de acordo com técnicas como as 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.

[0151] Em algumas modalidades, as células, por exemplo, células T, composições de células e/ou populações de células, como CD4 + e células T CD8 + ou composições, populações ou subpopulações dos mesmos, são expandidas por adição às células alimentadoras de

composição iniciadoras de cultura, tal como células mononucleares do sangue periférico não divisíveis (PBMC), (por exemplo, de modo que a população resultante de células contenha menos de 5, 10, 20 ou 40 células alimentadoras de PBMC para cada linfócito T na população inicial a ser expandida); e incubar a cultura (por exemplo, por um tempo suficiente para expandir o número de células T). Em alguns aspectos, as células alimentadoras não divisíveis podem compreender células alimentadoras de PBMC irradiadas por gama. Em algumas modalidades, os PBMC são irradiados com raios gama na faixa de cerca de 3000 a 3600 rads para impedir a divisão celular. Em alguns aspectos, as células alimentadoras são adicionadas ao meio de cultura antes da adição das populações de células T.

[0152] Em algumas modalidades, as condições estimulantes de temperatura adequadas para o crescimento de linfócitos T humanos, por exemplo, pelo menos cerca de 25 graus Celsius, geralmente pelo menos cerca de 30 graus e geralmente a ou cerca de 37 graus Celsius. Em algumas modalidades, uma mudança de temperatura é efetuada durante a cultura, como de 37 graus Celsius a 35 graus Celsius. Opcionalmente, a incubação pode compreender ainda a adição de células linfoblastoides transformadas por EBV não divididas (LCL) como células alimentadoras. O LCL pode ser irradiado com raios gama na faixa de cerca de 6000 a 10.000 rads. As células alimentadoras de LCL em alguns aspectos são fornecidas em qualquer quantidade adequada, tal como uma proporção de células alimentadoras de LCL para linfócitos T iniciais de pelo menos cerca de 10:1.

[0153] Nas modalidades, populações de CD4+ e CD8+ que são específicas de antígeno podem ser obtidas estimulando linfócitos T virgens ou específico de antígeno com antígeno. Por exemplo, linhas ou clones de células T específicas do antígeno podem ser geradas para antígenos do citomegalovírus, isolando células T de indivíduos

infectados e estimulando as células *in vitro* com o mesmo antígeno. Células T vírgens podem também ser usadas.

[0154] Em modalidades particulares, as condições estimulantes incluem incubação, cultura e/ou cultivo das células com um reagente estimulatório. Em modalidades particulares, o reagente estimulatório é um reagente descrito na Seção I-B-1. Em certas modalidades, o reagente estimulatório contém ou inclui uma conta. Em certas modalidades, a partida e/ou iniciação 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 modalidades particulares, as células são incubadas antes, durante e/ou após a engenharia genética das células, por exemplo, a introdução de um polinucleotídeo recombinante na célula, como, por exemplo, transdução ou transfecção.

[0155] Em algumas modalidades, a composição das células T enriquecidas é incubada na proporção de reagente estimulador e/ou contas para células 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 modalidades particulares, a proporção de reagentes estimulantes e/ou contas 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 modalidades particulares, a proporção de reagente estimulador para células é de cerca de 1:1 ou é 1:1.

[0156] Em modalidades particulares, as células não são incubadas, contatadas, e/ou expostas a um agente que inibe a atividade de mTOR, por exemplo, um agente descrito na Seção II, antes de e/ou durante a incubação sob condições estimulatórias.

[0157] Em certas modalidades, pelo menos uma porção da incubação é realizada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, por exemplo, um agente descrito na Seção II. Em algumas

modalidades, toda e/ou a incubação inteira é realizada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR.

[0158] Em modalidades particulares, as células são incubadas com o reagente estimulatório na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é um agente descrito na Seção II. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR também inibe a atividade de uma cinase adicional. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR também inibe a atividade da fosfoinositol-3 cinase (PI3K). Em certas modalidades, o agente inibe seletivamente a atividade do mTOR, por exemplo, não inibe de maneira detectável a atividade de PI3K, e/ou não inibe a atividade de PI3K na mesma extensão que a atividade de mTOR, em concentrações que são suficientes para inibir a atividade de mTOR. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de cinase. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 e/ou mTORC2. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 e mTORC2.

[0159] Em algumas modalidades, os agentes incluem, mas não estão limitados a, PI-103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, NVP-BEZ235, a pirazolopirimidina, Torina I, Torkinibe (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), AZD8055, rapamicina (sirolimus), tensirolimus (CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca), e OSI-027 (OSI). Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR tem ou inclui uma fórmula que é fornecida na Seção II, por exemplo, Fórmula (I), Fórmula (II), ou Fórmula (III). Em algumas modalidades, o agente é o Composto 155, Composto 246, ou Composto 63.

[0160] Em certas modalidades, as células são incubadas na

presença de um agente que inibe a atividade de mTOR em uma concentração que inibe, reduz e/ou diminui atividade de mTOR. Em algumas modalidades, a concentração inibe, reduz e/ou diminui uma ou mais atividades de mTOR por cerca de ou pelo menos 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 99.9%. Em algumas modalidades, a concentração do agente não impede que as células T primárias proliferem e/ou se expandam. Em algumas modalidades, as células são incubadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, entre 200 nM e 500 nM, entre 500 nM e 1 μ M, entre 1 μ M e 10 μ M, ou entre 5 μ M e 50 μ M do agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, as células são incubadas na presença de, de cerca de, ou de pelo menos 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, ou 100 μ M do agente que inibe a atividade de mTOR.

[0161] Em algumas modalidades, as células são incubadas na presença do Composto 155. Em certas modalidades, as células são incubadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM do Composto 155. Em modalidades particulares, as células são incubadas na presença de, de cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM do Composto 155.

[0162] Em certas modalidades, as células são incubadas na presença do Composto 246. Em certas modalidades, as células são incubadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM do Composto 155. Em certas modalidades, as células são incubadas na presença de, de cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM do Composto 246.

[0163] Em modalidades particulares, as células são incubadas na presença do Composto 63. Em certas modalidades, as células são incubadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM do Composto 63. Em algumas modalidades, as células são incubadas na presença de, de cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM do Composto 63.

[0164] Em algumas modalidades, as composições ou células são incubadas na presença de condições estimulantes ou um agente estimulador. Tais condições são aquelas projetadas para induzir proliferação, expansão, ativação e/ou sobrevivência de células na população, para imitar a exposição a antígenos, e/ou para preparar as células para alterações genéticas, como para a introdução de um receptor de antígeno recombinante. Reagentes estimulantes exemplares são descritos abaixo.

[0165] Em algumas modalidades, as condições para estimulação e/ou ativação pode incluir um ou mais meios particulares, 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.

[0166] Em alguns aspectos, a incubação é realizada de acordo com técnicas como as 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.

[0167] Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da incubação na presença de uma ou mais condições estimulantes ou agentes estimuladores é realizada na cavidade interna de uma câmara

centrífuga, por exemplo, sob rotação centrífuga, como descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da incubação realizada em uma câmara centrífuga inclui mistura com um reagente ou reagentes para induzir estimulação e/ou ativação. Em algumas modalidades, células, como células selecionadas, são misturadas com uma condição estimulante ou agente estimulador 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 normalmente são empregados na execução de estímulos semelhantes em uma placa de cultura de células ou em outro sistema.

[0168] Em algumas modalidades, o agente estimulador é adicionado às células na cavidade da câmara em uma quantidade substancialmente menor do que (por exemplo, não mais do que 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70% ou 80% da quantidade) em comparação com a quantidade do agente estimulante que é normalmente usado ou seria necessário para atingir a mesma ou similar eficiência de seleção do mesmo número de células ou do mesmo volume de células quando a seleção é realizada sem misturar em uma câmara centrífuga, por exemplo, em um tubo ou saco com agitação ou rotação periódica. Em algumas modalidades, a incubação é realizada com a adição de um tampão de incubação às células e agente estimulante para atingir um volume alvo com a incubação do reagente de, por exemplo, 10 mL a 200 mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de 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 modalidades, o tampão de incubação e o agente estimulante são pré-misturados antes da adição às células. Em algumas modalidades, o tampão de incubação e o agente estimulador são adicionados separadamente às células. Em algumas modalidades, a incubação

estimulante é realizada com uma condição de mistura suave periódica, que pode auxiliar na promoção de interações energéticas favoráveis e dessa maneira permitir o uso de menos agente estimulante geral, enquanto consegue estimular e ativar células.

[0169] Em algumas modalidades, a incubação geralmente é realizada sob condições de mistura, tal como na presença de rotação, geralmente em força ou velocidade relativamente baixa, como velocidade menor do que aquela usada para peletizar as células, tal como de, ou de cerca de 600 rpm a 1700 rpm (por exemplo, de, 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 de cerca de 80g a 100g (por exemplo, de, ou cerca de, ou pelo menos 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, ou 100 g). Em algumas modalidades, a rotação é realizada usando intervalos repetidos de uma rotação em tal baixa velocidade seguida por um período de repouso, tal como uma rotação e/ou repouso durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 segundos, tal como uma rotação em aproximadamente 1 ou 2 segundos seguida por um repouso durante aproximadamente 5, 6, 7, ou 8 segundos.

[0170] Em algumas modalidades, 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 modalidades, a incubação adicional é 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.

[0171] Em modalidades particulares, as condições estimulantes incluem incubação, cultura e/ou cultivo de uma composição de células T enriquecidas com e/ou na presença de uma ou mais citocinas. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais citocinas são

citocinas recombinantes. Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas humanas recombinantes. Em certas modalidades, 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 endógenos às células T. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem um membro da família de feixe 4-alfa-hélice de citocina. Em algumas modalidades, membros da família de 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 estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).

[0172] Em algumas modalidades, a estimulação resulta na ativação e/ou proliferação das células, por exemplo, antes da transdução.

1. Reagentes Estimulatórios

[0173] Em algumas modalidades, incubar uma composição de células, por exemplo, células de entrada, sob condições de estimulação é ou inclui incubar e/ou contatar a composição de células enriquecidas com um reagente estimulatório que é capaz de ativar e/ou expandir células T. Em algumas modalidades, o reagente estimulatório é capaz de estimular e/ou ativar um ou mais sinais nas células. Em algumas modalidades, os referidos um ou mais sinais são mediados por um receptor. Em modalidades particulares, os referidos um ou mais sinais são ou estão associados a uma alteração na transdução do 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

modalidades 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.

[0174] Em certas modalidades, o reagente estimulatório contém uma partícula, por exemplo, uma conta, que é conjugada ou ligada a um ou mais agentes, por exemplo, biomoléculas, capazes de ativar e/ou expandir células, por exemplo, células T. Em algumas modalidades, os referidos um ou mais agentes são ligados a uma conta. Em algumas modalidades, a conta é biocompatível, isto é, composto por um material adequado para uso biológico. Em algumas modalidades, as contas não são tóxicas para células cultivadas, por exemplo, células T cultivadas. Em algumas modalidades, as contas podem ser quaisquer partículas capazes de fixar agentes de uma maneira que permita uma interação entre o agente e uma célula.

[0175] Em algumas modalidades, um reagente estimulatório contém um ou mais agentes que são capazes de ativar e/ou expandir células, por exemplo, células T, que estão ligadas a ou anexadas a uma conta, por exemplo, à superfície da conta. Em certas modalidades, a conta é uma partícula não celular. Em modalidades particulares, uma conta pode criar uma partícula coloidal, uma microesfera, nanopartícula, uma conta magnética ou algo semelhante. Em algumas modalidades as contas são contas de agarose. Em certas modalidades, as contas são contas de sefarose.

[0176] Em modalidades particulares, o reagente estimulatório contém contas que são monodispersas. Em certas modalidades, contas que são monodispersas compreendem dispersões com um desvio padrão de diâmetro de menos do que 5% um do outro.

[0177] Em algumas modalidades, a conta contém um ou mais agentes, tal como um agente que é acoplado, conjugado ou vinculado

(direta ou indiretamente) à superfície da conta. Em algumas modalidades, um agente conforme contemplado aqui pode incluir, mas não está limitado a, RNA, DNA, proteínas (por exemplo, enzimas), antígenos, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos, carboidratos, lipídios, lectinas ou qualquer outra biomolécula com afinidade por um alvo desejado. Em algumas modalidades, o alvo desejado é um receptor de células T e/ou um componente de um receptor de células T. Em certas modalidades, o alvo desejado é CD3. Em certa modalidade, o alvo desejado é uma molécula coestimuladora de células T, por exemplo, CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, ou ICOS. Os referidos um ou mais agentes podem ser anexados direta ou indiretamente a uma conta por vários 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 modalidades, uma biomolécula (por exemplo, um anticorpo anti-CD3 biotinilado) pode ser anexada indiretamente a uma conta por meio de outra biomolécula (por exemplo, anticorpo antibiotina) diretamente ligada à conta.

[0178] Em algumas modalidades, o reagente estimulatório contém uma conta e um ou mais agentes que interagem diretamente com uma macromolécula na superfície de uma célula. Em certas modalidades, 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 da superfície celular). Em certas modalidades, uma conta (por exemplo, uma conta paramagnética) é marcada com um primeiro agente aqui descrito, como um anticorpo primário (por exemplo, um anticorpo antibiotina) ou outra biomolécula e, em seguida, um segundo agente, como um anticorpo secundário (por exemplo, um

anticorpo anti-CD3 biotinizado) ou outra segunda biomolécula (por exemplo, estreptavidina) é adicionada, pelo qual o anticorpo secundário ou outra segunda biomolécula se liga especificamente a esses anticorpos primários ou outra biomolécula na partícula.

[0179] Em algumas modalidades, o reagente estimulatório contém um ou mais agentes (por exemplo, anticorpo) que estão conectados a uma conta (por exemplo, uma conta paramagnética) e se ligam especificamente 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, 1/4 tipo Delta, Jagged 1/2, etc.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, e CXCR3 ou fragmento dos mesmos incluindo os ligantes correspondentes a essas macromoléculas ou fragmentos dos mesmos. Em algumas modalidades, um agente (por exemplo, anticorpo) ligado a uma conta se liga especificamente 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.

[0180] Em algumas modalidades, um ou mais dos agentes ligados à conta é um anticorpo. O anticorpo pode incluir anticorpo policlonal, anticorpo monoclonal (incluindo anticorpos completos que possuem uma região Fc de imunoglobulina), composições de anticorpos 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 modalidades, 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. Será apreciado que regiões constantes de qualquer isótipo podem ser usadas para os anticorpos aqui contemplados, incluindo regiões constantes 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 modalidades, o agente é um anticorpo que se liga a e/ou reconhece um ou mais componentes de um receptor de células T. Em modalidades particulares, o agente é um anticorpo anti-CD3. Em certas modalidades, o agente é um anticorpo que se liga a e/ou reconhece um correceptor. Em algumas modalidades, o reagente estimulatório compreende um anticorpo anti-CD28. Em algumas modalidades, a conta tem um diâmetro maior do que cerca de 0,001 µm, maior do que cerca de 0,01 µm, maior do que cerca de 0,1 µm, maior do que cerca de 1,0 µm, maior do que cerca de 10 µm, maior do que cerca de 50 µm, maior do que cerca de 100 µm ou maior do que cerca de 1000 µm e não mais do que cerca de 1500µm. Em algumas modalidades, a conta tem um diâmetro de cerca de 1,0 µm a cerca de 500 µm, cerca de 1,0 µm a cerca de 150 µm, cerca de 1,0 µm a cerca de 30 µm, cerca de 1,0 µm a cerca de 10 µm, cerca de 1,0 µm a cerca de 5,0 µm, cerca de 2,0 µm a cerca de 5,0 µm, ou cerca de 3,0 µm a cerca de 5,0 µm. Em algumas modalidades, a conta tem um diâmetro de cerca de 3 µm a cerca de 5 µm. Em algumas modalidades, a conta tem um diâmetro de pelo menos ou pelo menos cerca de ou cerca 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 modalidades, a conta tem um diâmetro de ou cerca de 4,5 µm. Em certas modalidades, a conta tem um diâmetro de ou cerca de 2,8 µm.

[0181] Em algumas modalidades, as contas têm uma densidade maior do que 0,001 g/cm³, maior do que 0,01 g/cm³, maior do que 0,05 g/cm³, maior do que 0,1 g/cm³, maior do que 0,5 g/cm³, maior do que 0,6 g/cm³, maior do que 0,7 g/cm³, maior do que 0,8 g/cm³, maior do que 0,9 g/cm³, maior do que 1 g/cm³, maior do que 1,1 g/cm³, maior do que 1,2 g/cm³, maior do que 1,3 g/cm³, maior do que 1,4 g/cm³, maior do que 1,5 g/cm³, maior do que 2 g/cm³, maior do que 3 g/cm³, maior do que 4 g/cm³, ou maior do que 5 g/cm³. Em algumas modalidades, as contas têm uma densidade de entre cerca de 0,001 g/cm³ e cerca de 100 g/cm³, cerca de 0,01 g/cm³ e cerca de 50 g/cm³, cerca de 0,1 g/cm³ e cerca de 10 g/cm³, cerca de 0,1 g/cm³ e cerca de 5 g/cm³, cerca de 0,5 g/cm³ e cerca de 1 g/cm³, cerca de 0,5 g/cm³ e cerca de 1,5 g/cm³, cerca de 1 g/cm³ e cerca de 1,5 g/cm³, cerca de 1 g/cm³ e cerca de 2 g/cm³, ou cerca de 1 g/cm³ e cerca de 5 g/cm³. Em algumas modalidades, as contas têm uma densidade de cerca de 0,5 g/cm³, cerca de 0,6 g/cm³, cerca de 0,7 g/cm³, cerca de 0,8 g/cm³, cerca de 0,9 g/cm³, cerca de 1,0 g/cm³, cerca de 1,1 g/cm³, cerca de 1,2 g/cm³, cerca de 1,3 g/cm³, cerca de 1,4 g/cm³, cerca de 1,5 g/cm³, cerca de 1,6 g/cm³, cerca de 1,7 g/cm³, cerca de 1,8 g/cm³, cerca de 1,9 g/cm³, ou cerca de 2,0 g/cm³. Em certas modalidades, as contas têm uma densidade de cerca de 1,6 g/cm³. Em modalidades particulares, as contas ou partículas têm uma densidade de cerca de 1,5 g/cm³. Em certas modalidades, as partículas têm uma densidade de cerca de 1,3 g/cm³.

[0182] Em certas modalidades, Várias contas têm uma densidade uniforme. Em certas modalidades, uma densidade uniforme compreende um desvio padrão de densidade de menos do que 10%, menos do que 5%, ou menos do que 1% da densidade de conta média.

[0183] Em algumas modalidades, as contas têm uma área de superfície entre cerca de 0,001 m² por cada grama de partículas (m²/g) a cerca de 1,000 m²/g, cerca de 0,01 m²/g a cerca de 100 m²/g, cerca

de 0,1 m²/g a cerca de 10 m²/g, cerca de 0,1 m²/g a cerca de 1 m²/g, cerca de 1 m²/g a cerca de 10 m²/g, cerca de 10 m²/g a cerca de 100 m²/g, cerca de 0,5 m²/g a cerca de 20 m²/g, cerca de 0,5 m²/g a cerca de 5 m²/g, ou cerca de 1 m²/g a cerca de 4 m²/g. Em algumas modalidades, as partículas ou contas têm uma área de superfície de cerca de 1 m²/g a cerca de 4 m²/g.

[0184] Em algumas modalidades, a conta contém pelo menos um material em ou próximo à superfície da conta que pode ser acoplada, ligada, ou conjugada a um agente. Em algumas modalidades, a conta é de superfície funcionalizada, isto é, compreende grupos funcionais que são capazes de formar uma ligação covalente com uma molécula de ligação, por exemplo, um polinucleotídeo ou um polipeptídeo. Em modalidades particulares, a conta compreende grupos carboxila, amino, hidroxila, tosila, epóxi, e/ou clorometila expostos na superfície. Em modalidades particulares, as contas compreendem agarose e/ou sefarose exposta na superfície. Em certas modalidades, a superfície da conta compreende reagentes estimulatórios anexados que podem ligar ou anexar moléculas de ligação. Em modalidades particulares, as biomoléculas são polipeptídeos. Em algumas modalidades, as contas compreendem proteína A, proteína G, ou biotina exposta na superfície.

[0185] Em algumas modalidades, a conta reage em um campo magnético. Em algumas modalidades, a conta é uma conta magnética. Em algumas modalidades, a conta magnética é paramagnética. Em modalidades particulares, a conta magnética é superparamagnética. Em certas modalidades, as contas não exibem quaisquer propriedades magnéticas a menos que elas sejam expostas a um campo magnético.

[0186] Em modalidades particulares, a conta compreende um núcleo magnético, um núcleo paramagnético, ou um núcleo superparamagnético. Em algumas modalidades, o núcleo magnético contém um metal. Em algumas modalidades, o metal pode ser, mas não

está limitado a, ferro, níquel, cobre, cobalto, gadolínio, manganês, tântalo, zinco, zircônio ou quaisquer combinações dos mesmos. Em certas modalidades, o núcleo magnético compreende óxidos de metal (por exemplo, óxidos de ferro), ferrites (por exemplo, ferrites de manganês, ferrites de cobalto, ferrites de níquel, etc.), hematite e ligas de metal (por exemplo, CoTaZn). Em algumas modalidades, o núcleo magnético compreende uma ou mais de um ferrite, um metal, uma liga de metal, um óxido de ferro, ou dióxido de cromo. Em algumas modalidades, o núcleo magnético compreende ferro elementar ou um composto do mesmo. Em algumas modalidades, o núcleo magnético compreende uma ou mais de magnetite (Fe_3O_4), maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), ou greigite (Fe_3S_4). Em algumas modalidades, o núcleo interno compreende um óxido de ferro (por exemplo, Fe_3O_4).

[0187] Em certas modalidades, a conta contém um núcleo magnético, paramagnético, e/ou superparamagnético que é revestido por uma cobertura ou revestimento funcionalizado de superfície. Em algumas modalidades, a cobertura pode conter um material que pode incluir, mas não está limitado a, um polímero, um polissacarídeo, a sílica, um ácido graxo, uma proteína, um carbono, agarose, sefarose, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polímero pode ser um polietileno glicol, ácido poli (lático-co-glicólico), poliglutaraldeído, poliuretano, poliestireno, ou um álcool polivinílico. Em certas modalidades, a cobertura ou revestimento externo compreende poliestireno. Em modalidades particulares, o revestimento externo é de superfície funcionalizada.

[0188] Em algumas modalidades, o reagente estimulatório compreende uma conta que contém um núcleo de óxido de metal (por exemplo, um núcleo de óxido de ferro) e uma cobertura, em que o núcleo de óxido de metal compreende pelo menos um polissacarídeo (por exemplo, dextrano), e em que a cobertura compreende pelo menos

um polissacarídeo (por exemplo, amino dextrano), pelo menos um polímero (por exemplo, poliuretano) e sílica. Em algumas modalidades o núcleo de óxido de metal é um núcleo de óxido de ferro coloidal. Em certas modalidades, os referidos um ou mais agentes incluem um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em modalidades particulares, os referidos um ou mais agentes incluem um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Em algumas modalidades, o reagente estimulatório compreende um anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD28, e um anticorpo anti-biotina. Em algumas modalidades, o reagente estimulatório compreende um anticorpo anti-biotina. Em algumas modalidades, a conta tem um diâmetro de cerca de 3 μm a cerca de 10 μm . Em algumas modalidades, a conta tem um diâmetro de cerca de 3 μm a cerca de 5 μm . Em certas modalidades, a conta tem um diâmetro de cerca de 3,5 μm .

[0189] Em algumas modalidades, o reagente estimulatório compreende um ou mais agentes que são ligados a uma conta compreendendo um núcleo de óxido de metal (por exemplo, um núcleo interno de óxido de ferro) e uma cobertura (por exemplo, uma cobertura protetiva), em que a cobertura compreende poliestireno. Em certas modalidades, as contas são contas monodispersas, paramagnéticas (por exemplo, superparamagnéticas) compreendendo um núcleo de ferro paramagnético (por exemplo, superparamagnético), por exemplo, um núcleo compreendendo magnetite (Fe_3O_4) e/ou maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) e uma cobertura ou revestimento de poliestireno. Em algumas modalidades, a conta não é porosa. Em algumas modalidades, as contas contêm uma superfície funcionalizada à qual os referidos um ou mais agentes são ligados. Em certas modalidades, os referidos um ou mais agentes são covalentemente ligados às contas na superfície. Em algumas modalidades, os referidos um ou mais agentes incluem um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em algumas

modalidades, os referidos um ou mais agentes incluem um anticorpo anti-CD3 e um anticorpo anti-CD28. Em algumas modalidades, os referidos 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 se ligar a um anticorpo marcado (por exemplo, anticorpo biotinizado), tal como um anticorpo anti-CD3 ou anti-CD28 marcado. Em certas modalidades, as contas têm uma densidade de cerca de $1,5 \text{ g/cm}^3$ e uma área de superfície de cerca de $1 \text{ m}^2/\text{g}$ a cerca de $4 \text{ m}^2/\text{g}$. Em modalidades particulares; as contas são contas superparamagnéticas monodispersas que têm um diâmetro de cerca de $4,5 \text{ }\mu\text{m}$ e uma densidade de cerca de $1,5 \text{ g/cm}^3$. Em algumas modalidades, as contas são contas superparamagnéticas monodispersas que têm um diâmetro médio de cerca de $2,8 \text{ }\mu\text{m}$ e uma densidade de cerca de $1,3 \text{ g/cm}^3$.

C. Células Modificadas

[0190] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos aqui são usados em associação com modificação de uma ou mais composições de células T. Em certas modalidades, a modificação é ou inclui a introdução de um polinucleotídeo, por exemplo, um polinucleotídeo codificando uma proteína recombinante. Em modalidades particulares, as proteínas recombinantes são receptores recombinantes, tal como qualquer uma das descritas na Seção II. Introdução das moléculas de ácido nucleico codificando a proteína recombinante, tal como receptor recombinante, na célula pode ser realizada usando qualquer um dentre vários vetores conhecidos. Tais vetores incluem sistemas virais e não virais, incluindo sistemas lentivirais e gamarretrovirais, bem como sistemas com base em transposon tais como sistemas 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 via viral, por exemplo, retroviral

ou lentiviral, transdução, transposons, e eletroporação. Em algumas modalidades, a modificação produz uma ou mais composições modificadas de células T enriquecidas.

[0191] Em certas modalidades, uma ou mais composições de células T são modificadas, por exemplo, transduzidas ou transfectadas, antes do cultivo das células, por exemplo, sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão, tais como por um método fornecido na Seção I-D. Em modalidades particulares, uma ou mais composições de células T enriquecidas são modificadas após as referidas uma ou mais composições terem sido estimuladas, ativadas, e/ou incubadas sob condições de estimulação. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais composições são composições estimuladas. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais composições estimuladas foram previamente criocongeladas e armazenadas, e são descongeladas antes da modificação.

[0192] Em certas modalidades, as referidas uma ou mais composições de células T estimuladas são ou incluem duas composições estimuladas separadas de células T enriquecidas. Em modalidades particulares, duas composições separadas de células T enriquecidas, por exemplo, duas composições separadas de células T enriquecidas que foram selecionadas, isoladas, e/ou enriquecidas da mesma amostra biológica, são separadamente modificadas. Em certas modalidades, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD4⁺ enriquecidas. Em modalidades particulares, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD8⁺ enriquecidas. Em algumas modalidades, duas composições separadas de células T CD4⁺ enriquecidas e células T CD8⁺ enriquecidas são geneticamente modificadas separadamente. Em algumas modalidades, uma única composição de células T enriquecidas é geneticamente modificada. Em certas modalidades, a

única composição é uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em algumas modalidades, a única composição é uma composição de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas que foram combinadas de composições separadas antes da modificação.

[0193] Em algumas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas que é modificada, por exemplo, transduzida ou transfectada, inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em certas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas que é modificada inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD8, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+.

[0194] Em algumas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é modificada, por exemplo, transduzida ou transfectada, inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+. Em certas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém nenhuma célula T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+.

[0195] Em algumas modalidades, composições separadas de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas são combinadas em uma única composição e são geneticamente modificadas, por exemplo, transduzidas ou transfectadas. Em certas modalidades, composições modificadas separadas de células T CD4+ enriquecidas e CD8+ enriquecidas são combinadas em uma única composição após a modificação genética ter sido realizada e/ou completada.

[0196] Em algumas modalidades, transferência de gene é realizada primeiro estimulando a célula, tal como combinando a mesma 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 cultura para números suficientes para aplicações clínicas. Em certas modalidades, a transferência de gene é realizada primeiro incubando as células sob condições de estimulação, tais como por qualquer dos métodos descritos na Seção I-B.

[0197] Em algumas modalidades, métodos para modificação genética 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 modalidades, o contato pode ser realizado com centrifugação, tal como espinoculação (por exemplo, inoculação centrífuga). Tais métodos incluem qualquer desses como descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Câmaras centrífugas exemplares incluem aquelas produzidas e vendidas por Biosafe SA, incluindo aquelas para uso com os sistemas Sepax® e Sepax® 2, incluindo uma câmara centrífuga A-200/F e A-200 e vários kits para uso com tais sistemas. Exemplares câmaras, sistemas, e instrumentação de processamento e gabinetes são descritos, por exemplo, na Patente Norteamericana No. 6.123.655, Patente Norteamericana No. 6.733.433 e Pedido de Patente

Norteamericano Publicado, Publicação No. US 2008/0171951, e Pedido de Patente Internacional Publicado, Publicação no. WO 00/38762, o teor de cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua íntegra. Kits exemplares para uso com tais sistemas incluem, mas não estão limitados a, kits de único uso vendidos por BioSafe SA sob os nomes de produto CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 ou CS-900.2.

[0198] Em algumas modalidades, as células não são incubadas, contatadas, e/ou expostas a um agente que inibe a atividade de mTOR, tal como um agente aqui descrito, por exemplo, na Seção II, antes de e/ou durante a modificação.

[0199] Em modalidades particulares, pelo menos uma parte da modificação é realizada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal como um agente aqui descrito por exemplo, um agente descrito na Seção II. Em algumas modalidades, todas e/ou uma etapa de modificação é realizada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR.

[0200] Em modalidades particulares, as células são modificadas, por exemplo, transduzidas ou transfectadas, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é um agente aqui descrito, tal como na Seção II, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR também inibe a atividade de uma cinase adicional. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR também inibe a atividade de fosfoinositol-3 cinase (PI3K). Em certas modalidades, o agente seletivamente inibe a atividade de mTOR, por exemplo, não inibe mensuravelmente a atividade de PI3K, e/ou não inibe a atividade de PI3K na mesma extensão que a atividade de mTOR, em concentrações que são suficientes para inibir a atividade de mTOR. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de cinase. Em certas modalidades, o agente que inibe

a atividade de mTOR inibe mTORC1 e/ou atividade de mTORC2. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 e mTORC2.

[0201] Em algumas modalidades, os agentes incluem, mas não estão limitados a, PI-103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, NVP-BEZ235, uma pirazolopirimidina, Torina I, Torcinibe (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), AZD8055, rapamicina (sirolimus), tensirolimus (CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca), e OSI-027 (OSI). Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR tem ou inclui uma fórmula que é fornecida na Seção II, por exemplo, Fórmula (I), Fórmula (II), ou Fórmula (III). Em algumas modalidades, o agente é Composto 155, Composto 246, ou Composto 63. Em algumas modalidades, o agente é Composto 63.

[0202] Em certas modalidades, as células são modificadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR em uma concentração que inibe, reduz, e/ou diminui a atividade de mTOR. Em algumas modalidades, a concentração inibe, reduz, e/ou diminui uma ou mais atividades de mTOR em cerca de ou pelo menos 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 99,9%. Em algumas modalidades, a concentração do agente não previne a proliferação e/ou expansão de células T primárias. Em algumas modalidades, as células são modificadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, entre 200 nM e 500 nM, entre 500 nM e 1 μ M, entre 1 μ M e 10 μ M, ou entre 5 μ M e 50 μ M do agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, as células são modificadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M,

25 μM , 50 μM , ou 100 μM do agente que inibe a atividade de mTOR.

[0203] Em algumas modalidades, as células são modificadas na presença de Composto 155. Em certas modalidades, as células são modificadas na presença de entre 1 nM e 1 μM , entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM de Composto 155. Em modalidades particulares, as células são modificadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM de Composto 155.

[0204] Em certas modalidades, as células são modificadas na presença de Composto 246. Em certas modalidades, as células são modificadas na presença de entre 1 nM e 1 μM , entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM de Composto 155. Em certas modalidades, as células são modificadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM de Composto 246.

[0205] Em modalidades particulares, as células são modificadas na presença de Composto 63. Em certas modalidades, as células são modificadas na presença de entre 1 nM e 1 μM , entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM de Composto 63. Em algumas modalidades, as células são modificadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM de Composto 63.

[0206] Em algumas modalidades, o contato pode ser realizado com centrifugação, tal como espinoculação (por exemplo, inoculação centrífuga). Em algumas modalidades, a composição contendo células, partículas virais e reagente podem ser submetidos à rotação, geralmente em força ou velocidade relativamente baixa, tal como velocidade menor que aquela usada para peletizar as células, tal como de, ou de cerca de 600 rpm a 1700 rpm (por exemplo, de, ou cerca de, ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm, ou 1500 rpm ou 1700 rpm). Em

algumas modalidades, 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, de, ou cerca de, ou pelo menos a, 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 é geralmente entendida ser a forma efetiva empregada sobre um objeto ou substância (tal como uma célula, amostra, ou pélete e/ou um ponto na câmara ou outro recipiente que está sendo submetido à rotação), relativa à força gravitacional da Terra, em um ponto particular em espaço quando comparado ao eixo de rotação. O valor pode ser determinado usando fórmulas bem conhecidas, levando em consideração a força gravitacional, velocidade de rotação e o raio de rotação (distância do eixo de rotação e o objeto, substância, ou partícula na qual RCF está sendo medida).

[0207] Em algumas modalidades, a introdução é realizada contatando uma ou mais células de uma composição com uma molécula de ácido nucleico codificando a proteína recombinante, por exemplo, receptor recombinante. Em algumas modalidades, o contato pode ser realizado com centrifugação, tal como espinoculação (por exemplo, inoculação centrífuga). Tais métodos incluem qualquer desses como descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Câmaras centrífugas exemplares incluem aquelas produzidas e vendidas por Biosafe SA, incluindo aquelas para uso com os sistemas Sepax® e Sepax® 2, incluindo uma câmara centrífuga A-200/F e A-200 e vários kits para uso com tais sistemas. Exemplares câmaras, sistemas, e instrumentação de processamento e gabinetes são descritos, por exemplo, na Patente Norteamericana No. 6.123.655, Patente Norteamericana No. 6.733.433 e Pedido de Patente Norteamericano Publicado, Publicação No. US 2008/0171951, e Pedido

de Patente Internacional Publicado, Publicação no. WO 00/38762, o teor de cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua íntegra. Kits exemplares para uso com tais sistemas incluem, mas não estão limitados a, kits de único uso vendidos por BioSafe SA sob os nomes de produto CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 ou CS-900.2.

[0208] Em algumas modalidades, 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 realizadas no sistema, por exemplo, uma ou mais etapas de processamento que podem ser realizadas com ou em conexão com o sistema de câmara centrífuga como aqui descrito ou na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Esta instrumentação em algumas modalidades está contida em um gabinete. Em algumas modalidades, a instrumentação inclui um gabinete, que inclui uma caixa contendo circuitos de controle, uma centrífuga, uma tampa, motores, bombas, sensores, displays, e uma interface do usuário. Um dispositivo exemplar é descrito na Patente Norteamericana No. 6.123.655, Patente Norteamericana No. 6.733.433 e US 2008/0171951.

[0209] Em algumas modalidades, o sistema compreende uma série de recipientes, por exemplo, bolsas, tubulações, torneiras, braçadeiras, conectores e uma câmara de centrífuga. Em algumas modalidades, os recipientes, tais como bolsas, incluem um ou mais recipientes, tais como bolsas, contendo as células a serem transduzidas e as partículas de vetor viral, no mesmo recipiente ou recipientes separados, tais como a mesma bolsa ou bolsas separadas. Em algumas modalidades, o sistema também inclui um ou mais recipientes, tais como bolsas, contendo meio, tais como diluente e/ou solução de lavagem, que é empurrada 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 a uma ou mais posições no sistema, tais como em uma posição correspondente a uma linha de entrada, linha de diluente, linha de lavagem, linha de resíduos e/ou linha de saída.

[0210] Em algumas modalidades, a câmara está associada com uma centrífuga, que é capaz de realizar a rotação da câmara, tal como em torno de seu eixo de rotação. A rotação pode ocorrer antes, durante, e/ou após a incubação em conexão com transdução das células e/ou em uma ou mais das outras etapas de processamento. Desse modo, em algumas modalidades, uma ou mais das várias etapas de processamento é realizada sob rotação, por exemplo, em uma força particular. A câmara é tipicamente capaz de rotação vertical ou geralmente vertical, de modo que a câmara fique na vertical durante a centrifugação e a parede lateral e o eixo sejam verticais ou geralmente verticais, com a parede(s) de extremidade horizontais ou geralmente horizontais.

[0211] Em algumas modalidades, a composição contendo células, o vetor, por exemplo, partículas virais, e reagente podem ser centrifugadas, geralmente em força ou velocidade relativamente baixa, tal como velocidade menor que aquela usada para peletizar as células, tal como de, ou de cerca de 600 rpm a 1700 rpm (por exemplo, de, ou cerca de, ou pelo menos 600 rpm, 1000 rpm, ou 1500 rpm ou 1700 rpm). Em algumas modalidades, 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, de, ou cerca de, ou pelo menos a, 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 é geralmente entendida ser a forma efetiva empregada sobre um objeto

ou substância (tal como uma célula, amostra, ou pélete e/ou um ponto na câmara ou outro recipiente que está sendo submetido à rotação), relativa à força gravitacional da Terra, em um ponto particular em espaço quando comparado ao eixo de rotação. O valor pode ser determinado usando fórmulas bem conhecidas, levando em consideração a força gravitacional, velocidade de rotação e o raio de rotação (distância do eixo de rotação e o objeto, substância, ou partícula na qual RCF está sendo medida).

[0212] Em algumas modalidades, durante pelo menos uma parte da modificação genética, por exemplo, transdução, e/ou subsequente à modificação genética as células são transferidas para a montagem de bolsa do biorreator para cultura das células geneticamente modificadas, tal como para cultivo ou expansão das células, como descrito acima.

[0213] São também fornecidos um ou mais polinucleotídeos (por exemplo, moléculas de ácido nucleico) codificando receptores recombinantes, vetores para geneticamente modificar células para expressar tais receptores e métodos para produzir as células modificadas. Em algumas modalidades, o vetor contém o ácido nucleico codificando o receptor recombinante. Em modalidades particulares, o vetor é um vetor viral, um vetor não viral. Em alguns casos, o vetor é um vetor viral, tal como um vetor retroviral, por exemplo, um vetor lentiviral ou um vetor gamarretroviral.

[0214] Em algumas modalidades, os vetores incluem vetores virais, por exemplo, vetores retrovirais ou lentivirais, não virais ou transposons, por exemplo, sistema transposon Sleeping Beauty, vetores derivados de vírus dos símios 40 (SV40), adenovíroses, vírus adenoassociado (AAV), vetores lentivirais ou vetores retrovirais, tais como vetores gamarretrovirais, vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina Moloney (MoMLV), vírus sarcoma mieloproliferativo (MPSV), vírus de célula tronco embriônica de murino (MESV), vírus de célula tronco de

murino (MSCV), vírus formador de foco no baço (SFFV) ou vírus adenoassociado (AAV).

[0215] Em algumas modalidades, o vetor viral ou o DNA não viral contém um ácido nucleico que codifica uma proteína recombinante heteróloga. Em algumas modalidades, a molécula recombinante heteróloga é ou inclui um receptor recombinante, por exemplo, um antígeno receptor, SB-transposons, por exemplo, para silenciamento de gene, transposons fechados por capsídeo, ácido nucleico de fita dupla homólogo, por exemplo, para recombinação genômica ou genes reporter (por exemplo, proteínas fluorescentes, tais como GFP ou luciferase).

1. Partículas de vetor viral

[0216] Em algumas modalidades, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para células usando partículas virais infecciosas recombinantes, tais como, por exemplo, vetores derivados de vírus dos símios 40 (SV40), adenovirose, vírus adenoassociado (AAV). Em algumas modalidades, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para células T usando vetores lentivirais ou vetores retrovirais recombinantes, tais como vetores gamarretrovirais (veja, por exemplo, Koste *et al.* (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 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 November 29(11): 550–557).

[0217] Em algumas modalidades, o vetor retroviral tem uma sequência de repetição terminal longa (LTR), por exemplo, um vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina Moloney (MoMLV), vírus sarcoma mieloproliferativo (MPSV), vírus de célula tronco embriônica de murino (MESV), vírus de célula tronco de murino (MSCV), vírus formador de foco no baço (SFFV), ou vírus adenoassociado (AAV). A maioria de vetores retrovirais é derivada de retrovírus murinas. Em

algumas modalidades, as retrovíroses incluem aquelas derivadas de qualquer fonte celular aviária ou mamífera. As retrovíroses tipicamente são anfotrópicas, significando que elas são capazes de infectar células hospedeiras de diversas espécies, incluindo humanos. Em uma modalidade, o gene a ser expresso substitui as sequências gag, pol e/ou env retrovirais. Vários sistemas retrovirais ilustrativos foram descritos (por exemplo, Patentes Norteamericanas 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 and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

[0218] Métodos de transdução lentiviral são conhecidos. Métodos exemplares são descritos, por exemplo, em Wang *et al.* (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper *et al.* (2003) *Blood.* 101:1637–1644; Verhoeven *et al.* (2009) *Métodos Mol Biol.* 506: 97-114; e Cavalieri *et al.* (2003) *Blood.* 102(2): 497-505.

[0219] Em algumas modalidades, as partículas de vetor viral contêm um genoma derivado de um vetor com base no genoma retroviral, tal como derivado de um vetor com base no genoma lentiviral. Em alguns aspectos dos vetores virais fornecidos, o ácido nucleico heterólogo codificando um receptor recombinante, tal como um antígeno receptor, tal como um CAR, está contido e/ou localizado entre as sequências 5' LTR and 3' LTR do genoma vetor.

[0220] Em algumas modalidades, o genoma de vetor viral é um genoma de lentivírus, tais como um genoma de HIV-1 ou um genoma de SIV. Por exemplo, vetores lentivirais foram gerados multiplamente atenuando genes de virulência, por exemplo, os genes env, vif, vpu e nef podem ser deletados, tornando o vetor mais seguro para propósitos terapêuticos. Vetores lentivirais são conhecidos. Veja Naldini *et al.*,

(1996 e 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, Patentes Norteamericanas Nos. 6.013.516; e 5.994.136). Em algumas modalidades, estes vetores virais são com base em plasmídeo ou com base em vírus, e são configurados para transportar as sequências essenciais para incorporar ácido nucleico estranho, para seleção, e para transferência do ácido nucleico para uma célula hospedeira. Lentivirose conhecidas podem ser facilmente obtidas de depositórios ou coleções tal como a American Type Culture Collection (“ATCC”; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), ou isoladas de fontes conhecidas usando técnicas comumente disponíveis.

[0221] Exemplos não limitantes de vetores lentivirais incluem aqueles derivados de um lentivírus, tais como Vírus 1 da Imunodeficiência Humana (HIV-1), HIV-2, um Vírus da Imunodeficiência dos Símios (SIV), Vírus 1 linfotrópico T Humano (HTLV-1), HTLV-2 ou vírus da anemia por infecção de equinos (E1AV). Por exemplo, vetores lentivirais foram gerados multiplamente atenuando os HIV genes de virulência por HIV, por exemplo, os genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* são deletados, tornando o vetor mais seguro para propósitos terapêuticos. Vetores lentivirais são conhecidos na técnica, see Naldini *et al.*, (1996 e 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, Patentes Norteamericanas Nos. 6.013.516; e 5.994.136). Em algumas modalidades, estes vetores virais são com base em plasmídeo ou com base em vírus, e são configurados para transportar as sequências essenciais para incorporar ácido nucleico estranho, para seleção, e para transferência do ácido nucleico para uma célula hospedeira. Lentivirose conhecidas podem ser facilmente obtidas de depositórios ou coleções tal como a American Type Culture Collection (“ATCC”; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), ou isoladas de fontes conhecidas usando técnicas comumente disponíveis.

[0222] Em algumas modalidades, o vetor de genoma viral pode

conter sequências das 5' e 3' LTRs de um retrovírus, tal como um lentivírus. Em alguns aspectos, a construção de genoma viral pode conter sequências das 5' e 3' LTRs de um lentivírus, e em particular pode conter as sequências R e U5 da 5' LTR de um lentivírus e uma 3' LTR inativada ou autoinativada de um lentivírus. As sequências de LTR podem ser sequências de LTR de qualquer lentivírus de qualquer espécie. Por exemplo, elas podem ser sequências de LTR de HIV, SIV, FIV ou BIV. Tipicamente, as sequências de LTR são sequências LTR de HIV.

[0223] Em algumas modalidades, o ácido nucleico de um vetor viral, tal como um vetor viral de HIV, não possui unidades transcricionais adicionais. O vetor genoma pode conter uma 3' LTR inativada ou autoinativada (Zufferey *et al. J Virol* 72: 9873, 1998; Miyoshi *et al., J Virol* 72:8150, 1998). Por exemplo, deleção na região U3 da 3' LTR do ácido nucleico usado para produzir o RNA de vetor viral pode ser usada para gerar vetores auto-inativantes (SIN). Esta deleção pode então ser transferida para a 5' LTR do DNA proviral durante transcrição reversa. Um vetor autoinativante geralmente tem uma deleção das sequências realçadoras e promotoras da repetição de terminal longo 3' (LTR), que é copiado para a 5' LTR durante integração do vetor. Em algumas modalidades suficiente sequência pode ser eliminada, incluindo a remoção de uma caixa TATA, para abolir a atividade transcricional da LTR. Isto pode prevenir a produção de RNA de vetor de tamanho natural em células transduzidas. Em alguns aspectos, o elemento U3 da 3' LTR contém uma deleção de sua sequência realçadora, a caixa TATA, Sp1, e sítios NF-kappa B. Como um resultado 3' LTR autoinativante, o provírus que é gerado após entrada e transcrição reversa contém uma 5' LTR inativada. Isto pode melhorar a segurança reduzindo o risco de mobilização do genoma vetor e a influência da LTR em promotores celulares próximos. A 3' LTR autoinativante pode ser construída por

qualquer método conhecido na técnica. Em algumas modalidades, isto não afeta os títulos vetores ou as propriedades *in vitro* ou *in vivo* do vetor.

[0224] Opcionalmente, a sequência U3 da 5' LTR lentiviral pode ser substituída com a sequência promotora na construção viral, tal como uma sequência promotora heteróloga. Isto pode aumentar o título do vírus recuperado da linhagem celular de empacotamento. Uma sequência realçadora também pode ser incluída. Qualquer combinação realçadora/promotora que aumenta a expressão do genoma de RNA viral na linhagem de célula de empacotamento pode ser usada. Em um exemplo, a sequência realçadora / promotora de CMV é usada (Patente Norteamericana No. 5.385.839 e Patente Norteamericana No. 5.168.062).

[0225] Em certas modalidades, o risco de mutagênese insercional pode ser minimizado construindo o genoma vetor retroviral, tais como genoma vetor lentiviral, a ser de integração defeituosa. Vários métodos podem ser seguidos para produzir um genoma vetor não integrante. Em algumas modalidades, uma mutação pode ser modificada no componente de enzima integrase do gene pol, de modo que ele codifique uma proteína com uma integrase inativa. Em algumas modalidades, o próprio genoma vetor pode ser modificado para prevenir a integração, por exemplo, por mutação ou deleção de um ou ambos os sítios de ligação, ou tornando o trato de polipurina proximal da 3'LTR (PPT) não funcional por meio de deleção ou modificação. Em algumas modalidades, métodos não genéticos estão disponíveis; estes incluem agentes farmacológicos que inibem uma ou mais funções de integrase. Os não são mutuamente exclusivos; isto é, mais de um deles pode ser usado ao mesmo tempo. Por exemplo, tanto a integrase quanto os sítios de ligação podem ser não funcionais, ou a integrase e o sítio PPT podem ser não funcionais, ou os sítios de ligação e sítio PPT podem ser não

funcionais, ou todos eles podem ser não funcionais. Tais métodos e genomas de vetor viral são conhecidos e disponíveis (veja, Philpott e Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman *et al.* *J Virol* 69:2729, 1995; Brown *et al.* *J Virol* 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams *et al.*, *J Virol* 77:11150, 2003; Powell and Levin *J Virol* 70:5288, 1996).

[0226] Em algumas modalidades, o vetor contém sequências para propagação em uma célula hospedeira, tal como uma célula hospedeira procariótica. Em algumas modalidades, o ácido nucleico do vetor viral contém uma ou mais origens de replicação para propagação em uma célula procariótica, tal como uma célula bacteriana. Em algumas modalidades, vetores que incluem uma origem procariótica de replicação também podem conter um gene cuja expressão confere um marcador detectável ou selecionável, tal como resistência ao fármaco.

[0227] O genoma de vetor viral é tipicamente construído em uma forma de plasmídeo que pode ser transfectada em uma linhagem de célula de empacotamento ou produtora. Qualquer dentre vários métodos conhecidos pode ser usado para produzir partículas retrovirais cujo genoma contém uma cópia de RNA do genoma de vetor viral. Em algumas modalidades, pelo menos dois componentes estão envolvidos na preparação de um sistema de liberação de gene com base em 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. Salvaguardas de biossegurança podem ser introduzidas no planejamento de um ou ambos estes componentes.

[0228] Em algumas modalidades, o plasmídeo de empacotamento pode conter todas as proteínas retrovirais, tal como HIV-1 que não proteínas envelope (Naldini *et al.*, 1998). Em outras modalidades, vetores virais podem carecer de 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 de HIVHIV. Em algumas modalidades, vetores lentivirais, tais como 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 tipo selvagem por recombinação.

[0229] Em algumas modalidades, o genoma de vetor viral é introduzido em uma linhagem de célula 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 genes codificando componentes virais além de uma ou mais sequências, por exemplo, ácidos nucleicos recombinantes, de interesse. Em alguns aspectos, a fim de prevenir a replicação do genoma em uma célula alvo, entretanto, genes virais endógenos requeridos para replicação são removidos e fornecidos separadamente na linhagem de célula de empacotamento.

[0230] Em algumas modalidades, uma linhagem de célula de empacotamento é transfectada com um ou mais plasmídeos vetores contendo os componentes necessários para gerar as partículas. Em algumas modalidades, uma linhagem de célula de empacotamento é transfectada com um plasmídeo contendo o genoma de vetor viral, incluindo as LTRs, a sequência de empacotamento de ação cis e a sequência de interesse, isto é, um ácido nucleico codificando um antígeno receptor, tal como um CAR; e uma ou mais plasmídeos auxiliares codificando os componentes enzimáticos e/ou estruturais virais, tais como Gag, pol e/ou rev. Em algumas modalidades, múltiplos vetores são utilizados para separar os vários componentes genéticos que geram as partículas de vetor retroviral. Em algumas tais modalidades, que fornecem vetores separados para células de

empacotamento reduz a mudança de eventos recombinantes que podem de outro modo gerar viroses competentes de replicação. Em algumas modalidades, um único vetor plasmídeo tendo todos os componentes retrovirais pode ser usado.

[0231] Em algumas modalidades, a partícula de vetor retroviral, tal como partícula de vetor lentiviral, é pseudotipada para aumentar a eficiência de transdução de células hospedeiras. Por exemplo, uma partícula de vetor retroviral, tal como uma partícula de vetor lentiviral, em algumas modalidades é pseudotipada com uma glicoproteína VSV-G, que fornece uma ampla faixa de hospedeiro celular estendendo-se aos tipos de células que podem ser transduzidas. Em algumas modalidades, uma linhagem de célula de empacotamento é transfectada com um plasmídeo ou polinucleotídeo codificando uma glicoproteína envelope não nativa, tal como para incluir envelopes xenotrópicos, politrópicos ou anfotrópicos, tais como vírus envelope Sindbis, GALV ou VSV-G.

[0232] Em algumas modalidades, 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 modalidades, a linhagem celular de empacotamento pode ser qualquer linhagem celular que seja capaz de expressar proteínas lentivirais e produzir partículas de vetor lentiviral funcional. Em alguns aspectos, linhagens celulares de empacotamento adequadas incluem células 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) and Cf2Th (ATCC CRL 1430).

[0233] Em algumas modalidades, a linhagem celular de empacotamento estavelmente expressa proteína(s) viral(is). Por exemplo, em alguns aspectos, uma linhagem de célula de

empacotamento contendo os genes estruturais gag, pol, rev e/ou outros, mas sem a LTR e componentes de empacotamento pode ser construída. Em algumas modalidades, uma linhagem de célula de empacotamento pode ser transitoriamente transfectada com moléculas de ácido nucleico codificando 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 codificando uma glicoproteína envelope.

[0234] Em algumas modalidades, 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 linhagem celular de empacotamento produz partículas de vetor viral que contêm o genoma de vetor viral. Métodos para transfecção ou infecção são bem conhecidos. Exemplos não limitantes incluem métodos de fosfato de cálcio, DEAE-dextrano e lipofecção, eletroporação e microinjeção.

[0235] Quando um plasmídeo recombinante e a LTR retroviral e sequências de empacotamento são introduzidos em uma linhagem celular especial (por exemplo, por precipitação de fosfato de cálcio, por exemplo), as sequências de empacotamento podem permitir a transcrição de RNA do plasmídeo recombinante a ser empacotado em partículas virais, que então podem ser secretadas no meio de cultura. O meio contendo as retrovíroses recombinantes em algumas modalidades é então coletado, opcionalmente concentrado, e usado para transferência de gene. Por exemplo, em alguns aspectos, após cotransfecção dos plasmídeos de empacotamento e o vetor de transferência para uma linhagem celular de empacotamento, as partículas de vetor viral são recuperadas do meio de cultura e tituladas por métodos padrões usados por aqueles versados na técnica.

[0236] Em algumas modalidades, um vetor retroviral, tal como um

vetor lentiviral, pode ser produzido em uma linhagem celular de empacotamento, tal como uma linhagem de célula HEK 293T exemplar, por introdução de plasmídeos para permitir geração de partículas lentivirais. Em algumas modalidades, uma célula de empacotamento é transfectada e/ou contém um polinucleotídeo codificando gag e pol, e um polinucleotídeo codificando um receptor recombinante, tal como um antígeno receptor, por exemplo, um CAR. Em algumas modalidades, a linhagem celular de empacotamento é opcionalmente e/ou adicionalmente transfectada com e/ou contém um polinucleotídeo codificando uma proteína rev. Em algumas modalidades, a linhagem celular de empacotamento é opcionalmente e/ou adicionalmente transfectada com e/ou contém um polinucleotídeo codificando uma glicoproteína envelope não nativa, tal como VSV-G. Em algumas tais modalidades, aproximadamente dois dias após transfecção de células, por exemplo, Células HEK 293T, o sobrenadante celular contém vetores lentivirais recombinantes, que podem ser recuperados e titulados.

[0237] Partículas de vetor retroviral recuperadas e/ou produzidas podem ser usadas para transduzir células alvo usando os métodos as described. Uma vez nas células alvo, o RNA viral é reversamente transcrito, importado para o núcleo e estavelmente integrado 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.

[0238] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos envolvem métodos de transdução de células contactando, por exemplo, incubando, uma composição celular compreendendo várias células com uma partícula viral. Em algumas modalidades, as células a serem transfectadas ou transduzidas são ou compreendem células primárias obtidas de um indivíduo, tais como células enriquecidas e/ou selecionadas de um indivíduo.

[0239] Em algumas modalidades, a concentração de células a serem transduzidas da composição é de, ou de cerca de $1,0 \times 10^5$ células/mL a $1,0 \times 10^8$ células/mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de $1,0 \times 10^5$ células/mL, 5×10^5 células/mL, 1×10^6 células/mL, 5×10^6 células/mL, 1×10^7 células/mL, 5×10^7 células/mL ou 1×10^8 células/mL.

[0240] Em algumas modalidades, as partículas virais são fornecidas em certa relação de cópias das partículas de vetor viral ou unidades infecciosas (IU) dos mesmos, pelo número total de células a serem transduzidas (IU/cell). Por exemplo, em algumas modalidades, as partículas virais estão presentes durante o contato de, ou cerca de, ou pelo menos a, ou cerca de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, ou 60 IU das partículas de vetor viral por uma das células.

[0241] Em algumas modalidades, o título de partículas de vetor viral é entre ou entre cerca de 1×10^6 IU/mL e 1×10^8 IU/mL, tal como entre ou entre cerca de 5×10^6 IU/mL e 5×10^7 IU/mL, tal como pelo menos 6×10^6 IU/mL, 7×10^6 IU/mL, 8×10^6 IU/mL, 9×10^6 IU/mL, 1×10^7 IU/mL, 2×10^7 IU/mL, 3×10^7 IU/mL, 4×10^7 IU/mL, ou 5×10^7 IU/mL.

[0242] Em algumas modalidades, transdução pode ser obtida em uma multiplicidade de infecção (MOI) de menos do que 100, tais como geralmente menos do que 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 ou menos.

[0243] Em algumas modalidades, os métodos envolvem contatar ou incubar, as células com as partículas virais. Em algumas modalidades, o contato é durante 30 minutos a 72 horas, tal como 30 minutos a 48 horas, 30 minutos a 24 horas ou 1 hora a 24 horas, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas ou mais.

[0244] Em algumas modalidades, o contato é realizado em solução. Em algumas modalidades, as células e partículas virais são contatadas em um volume de, ou de cerca de 0,5 mL a 500 mL, tais como de, ou

de cerca de 0,5 mL a 200 mL, 0,5 mL a 100 mL, 0,5 mL a 50 mL, 0,5 mL a 10 mL, 0,5 mL a 5 mL, 5 mL a 500 mL, 5 mL a 200 mL, 5 mL a 100 mL, 5 mL a 50 mL, 5 mL a 10 mL, 10 mL a 500 mL, 10 mL a 200 mL, 10 mL a 100 mL, 10 mL a 50 mL, 50 mL a 500 mL, 50 mL a 200 mL, 50 mL a 100 mL, 100 mL a 500 mL, 100 mL a 200 mL ou 200 mL a 500 mL.

[0245] Em certas modalidades, as células de entrada são tratadas, incubadas, ou contatadas com partículas que compreendem moléculas de ligação que se ligam a ou reconhecem o receptor recombinante que é codificado pelo DNA viral.

[0246] Em algumas modalidades, a incubação das células com as partículas de vetor viral resulta em ou produz uma composição de saída compreendendo células transduzidas com as partículas de vetor viral.

2. Vetores Não Virais

[0247] Em algumas modalidades, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para células T por meio de eletroporação (veja, por exemplo, Chicaybam *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 e Van Tedeloo *et al.* (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). Em algumas modalidades, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para células T por meio de 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) *Métodos Mol Biol* 506: 115-126). Outros métodos de introdução e expressão de material genético em células imunes incluem transfecção de fosfato de cálcio (por exemplo, como descrito em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), fusão de protoplasto, transfecção mediada por lipossoma catiônica; bombardeio de micropartícula facilitado por partícula 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)).

[0248] Outros métodos e vetores para transferência dos ácidos

nucleicos codificando os produtos recombinantes são aqueles descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional, Publicação No. WO 2014055668, e Patente Norteamericana No. 7.446.190.

[0249] Em algumas modalidades, as células, por exemplo, células T, podem ser transfectadas durante ou após expansão, por exemplo, com um receptor de célula 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 celular geneticamente modificada pode então ser liberada a partir 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 receptor introduzido *de novo*). Este segundo tipo de estímulo pode incluir um estímulo antigênico na forma de um peptídeo/molécula de MHC, o ligante cognato (reticulação) do receptor geneticamente introduzido (por exemplo, ligante natural de uma CAR) ou qualquer ligante (tal como um anticorpo) que diretamente se liga dentro da estrutura do novo receptor (por exemplo, reconhecendo regiões constantes dentro do receptor). Veja, por exemplo, Cheadle *et al.*, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Métodos 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).

[0250] Em alguns casos, um vetor pode ser usado que não requer que as células, por exemplo, células T, sejam ativadas. Em alguns tais casos, as células podem ser selecionadas e/ou transduzidas antes de ativação. Desse modo, as células podem ser modificadas antes de, ou subsequente ao cultivo das células, e em alguns casos ao mesmo tempo que, ou durante pelo menos uma parte da cultura.

[0251] Em alguns aspectos, as células também são modificadas para promover a expressão de citocinas ou outros fatores. Entre ácidos

nucleicos adicionais, por exemplo, genes para introdução são aqueles para melhorar a eficácia de terapia, tal como promovendo a viabilidade e/ou função de 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. e Cell Biol.*, 11:6 (1991); e Riddell *et al.*, *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); veja 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 de fusão de um marcador selecionável positivo dominante com um marcador selecionável negativo. Veja, por exemplo, Riddell *et al.*, Patente Norteamericana No. 6.040.177, nas colunas 14-17.

[0252] Em algumas modalidades, ácidos nucleicos recombinantes são transferidos para 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. Estes elementos se movem por meio de um mecanismo conservador de “cortar-e-colar”: uma transposase catalisa a excisão do transposon de sua localização original e promove sua integração em outro lugar no genoma. Elementos deficientes de transposase podem ser mobilizados se uma transposase for fornecido por outro gene de transposase. Desse modo, 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.

[0253] Transfecção com base em transposon é um sistema de dois componentes que consiste em uma transposase e um transposon. Em

algumas modalidades, o sistema que compreende um transposon é modificado para compreender um DNA estranho (também referido aqui como DNA de carga), por exemplo, um gene codificando um receptor recombinante, que é flanqueado por sequências de repetição invertida / repetição direta (IR/DR) que são reconhecidas por um acompanhante de transposase. Em algumas modalidades, um plasmídeo não viral codifica uma transposase sob o controle de um promotor. Transfecção do plasmídeo dentro de uma célula hospedeira resulta em uma expressão transitória da transposase, desse modo, durante um período inicial após a transfecção, a transposase é expressa em níveis suficientes para integrar o transposon dentro do DNA genômico. Em algumas modalidades, a própria transposase não é integrada dentro do DNA genômico, e para isso a expressão da transposase diminui ao longo do tempo. Em algumas modalidades, a expressão da transposase é expressa pela célula hospedeira em níveis suficientes para integrar um correspondente transposon durante menos do que cerca de 4 horas, menos do que cerca de 8 horas, menos do que cerca de 12 horas, menos do que cerca de 24 horas, menos do que cerca de 2 dias, menos do que cerca de 3 dias, menos do que cerca de 4 dias, menos do que cerca de 5 dias, menos do que cerca de 6 dias, menos do que cerca de 7 dias, menos do que cerca de 2 semanas, menos do que cerca de 3 semanas, menos do que cerca de 4 semanas, menos do que cerca de 5 semanas, ou menos do que cerca de 8 weeks. Em algumas modalidades, o DNA de carga que é introduzido no genoma do hospedeiro não é subsequentemente removido do genoma do hospedeiro, pelo menos por que a dose hospedeira não expressa uma transposase endógena capaz de excisar o DNA de carga.

[0254] Sleeping Beauty (SB) é um membro sintético da superfamília Tc/1-mariner de transposons, reconstruído de elementos inativos alojados no genoma de peixe salmonídeo. SB transfecção com base em

transposon é um sistema de dois componentes que consiste em uma transposase e um transposon contendo sequências de repetição invertida / repetição direta (IR/DR) que resulta em precisa integração em um dinucleotídeo TA. O transposon é designado com um cassete de expressão de interesse flanqueado por IR/DRs. A transposase SB liga-se a sítios de ligação específicos que estão localizados na IR do transposon Sleeping beauty. A transposase SB media a integração do transposon, um elemento móvel codificando uma sequência de carga flanqueada sobre ambos os lados por repetições de terminal invertido que abrigam sítios de ligação para a enzima catalítica (SB). Expressão estável resulta quando SB insere sequências de gene nos cromossomas de vertebrados em um dinucleotídeo alvo TA por meio de um mecanismo corta-e-cola. Este sistema foi usado para modificar vários tipos de células de vertebrados, incluindo leucócitos primários de sangue periférico humano. Em algumas modalidades, as células são contatadas, incubadas, e/ou tratadas com um transposon SB compreendendo um gene de carga, por exemplo, um gene codificando um receptor recombinante ou um CAR, flanqueado por sequência SB IR. Em modalidades 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 codificando um CAR, flanqueado por sequência SB IR. Em certas modalidades, o plasmídeo também compreende um gene codificando uma transposase SB que não é flanqueada por sequência SB IR.

[0255] PiggyBac (PB) é outro sistema transposon que pode ser usado para integrar o DNA de carga em um DNA genômico do hospedeiro, por exemplo, de um humano. A transposase PB reconhece sequências de repetição de terminal invertido específicas de transposon PB (ITRs) localizadas sobre ambas as extremidades do transposon e

eficientemente move o teor dos sítios originais e eficientemente integra os mesmos nos sítios cromossômicos de TTAA. O sítio de transposon PB possibilita que os genes de interesse entre as duas ITRs no vetor PB sejam mobilizados dentro dos genomas alvo. O sistema PB foi usado para modificar vários tipos celulares de vertebrado, incluindo células humanas primárias. Em algumas modalidades, as células a serem transfectadas são contatadas, incubadas, e/ou tratadas com um transposon PB compreendendo um gene de carga, por exemplo, um gene codificando um CAR, flanqueado por sequências IR de PB. Em modalidades particulares, as células a serem transfectadas são contatadas, incubadas, e/ou tratadas com um plasmídeo compreendendo a PB transposon compreendendo um gene de carga, por exemplo, um gene codificando um CAR,flanqueado por sequências IR de PB. Em certas modalidades, o plasmídeo também compreende um gene codificando uma transposase SB que não é flanqueada por sequências IR de PB.

[0256] Em algumas modalidades, os vários elementos do transposon/transposase empregados nos métodos objeto, por exemplo, o(s) vetor(es) SB e PB, podem ser empregados por métodos padrão de clivagem de enzima de restrição, ligação e clonagem molecular. Um protocolo para construção dos vetores objeto inclui as seguintes etapas. Primeiramente, fragmentos de ácido nucleico purificado contendo sequências de nucleotídeo componente desejadas bem como sequências estranhas são clivados com endonucleases de restrição de fontes iniciais, por exemplo, um vetor compreendendo o gene transposase. Fragmentos contendo as sequências de nucleotídeo desejadas são então separados de fragmentos indesejados de diferentes tamanhos usando métodos convencionais de separação, por exemplo, por eletroforese de gel de agarose. Os fragmentos desejados são excisados do gel e ligados entre si na configuração apropriada de

modo que um ácido nucleico circular ou plasmídeo contendo as sequências desejadas, por exemplo, sequências que correspondem aos vários elementos dos vetores objeto, como descrito acima seja produzido. 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 nestas etapas são bem conhecidos por alguém versado na técnica e as enzimas requeridas para a ligação estão disponíveis comercialmente. (Veja, por exemplo, R. Wu, Ed., Métodos 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); Catalog 1982-83, New England Biolabs, Inc.; Catalog 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 no WO 98/40510 e WO 99/25817).

[0257] Em algumas modalidades, transdução com transposons é realizada com um plasmídeo que compreende um gene transposase e um plasmídeo que compreende um transposon que contém uma sequência de DNA de carga que é flanqueado por sequências de repetição invertida / repetição direta (IR/DR) que são reconhecidas pela transposase. Em certas modalidades, a sequência de DNA de carga codifica uma proteína heteróloga, por exemplo, um receptor de células T recombinante ou um CAR. Em algumas modalidades, o plasmídeo compreende transposase e o transposon. Em algumas modalidades, a transposase está sob controle de um promotor ubíquo, ou qualquer promotor adequado para direcionar a expressão da transposase em uma célula alvo. 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 modalidades, o DNA de carga compreende um cassete de seleção provendo a seleção de células com integração estável do DNA de carga dentro do DNA genômico. Cassetes de seleção adequados incluem, mas não estão limitados a, cassetes de seleção codificando 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.

[0258] Em algumas modalidades, os componentes para transdução com um transposon, por exemplo, plasmídeos compreendendo uma transposase SB e transposon SB, são introduzidos em uma célula alvo. Qualquer protocolo conveniente pode ser empregado, onde o protocolo pode prover introdução *in vitro* ou *in vivo* dos componentes do sistema em uma célula alvo, dependendo da localização de uma célula alvo. Por exemplo, onde uma 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, usando técnicas de transformação padrão. Tais técnicas incluem, mas não estão necessariamente limitadas a: infecção viral, transformação, conjugação, fusão de protoplasto, eletroporação, tecnologia de pistola de partícula, 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 as circunstâncias sob as quais a transformação está ocorrendo (isto é, *in vitro*, *ex vivo*, ou *in vivo*). Uma descrição geral desses métodos pode ser encontrada em Ausubel, *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3a. ed., Wiley & Sons, 1995.

[0259] Em algumas modalidades, 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 de repetição invertida do vetor transportando o transposon e subsequente integração do ácido nucleico excisado no genoma de uma célula alvo. Algumas modalidades também compreendem uma etapa para garantir que a atividade da transposase requisitada esteja presente em uma célula alvo juntamente com o transposon introduzido. Dependendo da estrutura do próprio vetor de transposon, isto é, se ou não o vector inclui uma região codificando um produto tendo atividade de transposase, o método pode também incluir introduzir um segundo vetor em uma célula alvo que codifica a atividade da transposase requisitada.

[0260] Em algumas modalidades, a quantidade de ácido nucleico do vetor compreendendo o transposon e a quantidade de ácido nucleico do vetor codificando a transposase que é introduzida na célula é suficiente para prover a excisão e inserção desejada do ácido nucleico de transposon no genoma da célula alvo. Assim sendo, a quantidade de ácido nucleico do vetor introduzido deve prover uma quantidade suficiente de atividade de transposase e um número suficiente de cópias do ácido nucleico que é desejado para ser inserido em uma célula alvo. A quantidade de ácido nucleico do vetor que é introduzida em uma célula alvo varia dependendo da eficiência do protocolo de introdução particular que empregado, por exemplo, o protocolo de administração *ex vivo* particular que é empregado.

[0261] Uma vez que o DNA vetor entrou na célula alvo em combinação com uma transposase requisitada, a região de ácido nucleico do vetor que é flanqueado por repetições invertidas, isto é, o ácido nucleico do 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. Assim sendo, introdução do vetor DNA em uma célula alvo é seguida

por subsequente excisão e inserção mediada por transposase do ácido nucleico exógeno transportado pelo vetor no genoma da célula alvo. Em modalidades particulares, o vetor é integrado nos genomas de pelo menos 1%, pelo menos 2%, pelo menos 3%, pelo menos 4%, pelo menos 5%, pelo menos 6% pelo menos 7% pelo menos 8%, pelo menos 9%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, ou pelo menos 20% das células que são transfectadas com o transposon SB e/ou transposase SB. Em algumas modalidades, integração do ácido nucleico into um genoma da célula alvo é estável, isto é, o ácido nucleico do vetor permanece presente no genoma da célula alvo durante mais que um período de tempo transitório e é passada em uma parte do material genético cromossômico para a progênie da célula alvo.

[0262] Em certas modalidades, o transposons são usados para integrar ácidos nucleicos, isto é, polinucleotídeos, de vários tamanhos em um genoma da célula alvo. Em algumas modalidades, o tamanho do DNA que é inserido em um genoma de célula alvo usando os métodos objeto varia de cerca de 0,1 kb a 200 kb, de cerca de 0,5 kb a 100 kb, de cerca de 1,0 kb a cerca de 8,0 kb, de cerca de 1,0 a cerca de 200 kb, de cerca de 1,0 a cerca de 10 kb, de cerca de 10 kb a cerca de 50 kb, de cerca de 50 kb a cerca de 100 kb, ou de cerca de 100 kb a cerca de 200 kb. Em algumas modalidades, o tamanho do DNA que é inserido em um genoma de célula alvo usando os métodos objeto varia de cerca de 1,0 kb a cerca de 8,0 kb. Em algumas modalidades, o tamanho do DNA que é inserido em um genoma de célula alvo usando os métodos objeto varia de cerca de 1,0 a cerca de 200 kb. Em modalidades particulares, o tamanho do DNA que é inserido em um genoma de célula alvo usando os métodos objeto varia de cerca de 1,0 kb a cerca de 8,0 kb.

D. Cultivo e/ou Expansão de Células

[0263] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos incluem

uma ou mais etapas para o cultivo de células, por exemplo, o cultivo de células sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão subsequente a uma etapa de modificação genética, por exemplo, introduzindo um polipeptídeo recombinante nas células por transdução ou transfecção. Em modalidades particulares, as células são cultivadas após as células terem sido incubadas sob condições de estimulação e transduzidas ou transfectadas com um polinucleotídeo recombinante, por exemplo, um polinucleotídeo codificando um receptor recombinante.

[0264] Em certas modalidades, as referidas uma ou mais composições de células T modificadas são ou incluem duas composições separadas de células T enriquecidas. Em modalidades particulares, duas composições separadas de células T enriquecidas, por exemplo, duas composições separadas de células T enriquecidas selecionadas, isoladas, e/ou enriquecidas da mesma amostra biológica, são separadamente cultivadas sob condições de estimulação. Em certas modalidades, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em modalidades particulares, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades, duas composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são separadamente cultivadas, por exemplo, sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão. Em algumas modalidades, uma única composição de células T enriquecidas é cultivada. Em certas modalidades, a única composição é uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em algumas modalidades, a única composição é uma composição de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas que foram combinadas de composições separadas antes do cultivo.

[0265] Em algumas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas que é cultivada, por exemplo, sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão, inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em algumas modalidades, a composição inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas que é cultivada inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD8, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+.

[0266] Em algumas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é cultivada, por exemplo, sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão, inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+. Em modalidades particulares, a composição inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos

99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém nenhuma célula T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+.

[0267] Em algumas modalidades, composições separadas de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas são combinadas em uma única composição e são cultivadas, por exemplo, sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão. Em certas modalidades, composições cultivadas separadas de células T CD4+ enriquecidas e CD8+ enriquecidas são combinadas em uma única composição após o cultivo ter sido realizado e/ou completado.

[0268] Em algumas modalidades, uma composição de células T enriquecidas é cultivada sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão. Em algumas modalidades, tais condições podem ser designadas para induzir proliferação, expansão, ativação, e/ou sobrevivência de células na população. Em modalidades particulares, as condições estimulação podem incluir um ou dentre meio particular, temperatura, teor de oxigênio, teor 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 designados para promover o crescimento, divisão, e/ou expansão das células.

[0269] Em modalidades particulares, as células são cultivadas na

presença de uma ou mais citocinas. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes. Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais citocinas são citocinas humanas recombinantes. Em certas modalidades, 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 às células T. Em modalidades particulares, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem um membro da família de feixe 4-alfa-hélice de citocinas. Em algumas modalidades, membros da família de 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 de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF), e fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF).

[0270] Em modalidades particulares, as células não são incubadas, contatadas, e/ou expostas a um agente que inibe a atividade de mTOR, tal como um agente aqui descrito, por exemplo, na Seção II, antes do cultivo, por exemplo, um cultivo sob condições que promovem a proliferação e/ou expansão.

[0271] Em certas modalidades, pelo menos uma parte do cultivo é realizada na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tal como um agente aqui descrito, por exemplo, na Seção II. Em algumas modalidades, todo o e/ou o cultivo inteiro é realizado na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR.

[0272] Em modalidades particulares, as células são cultivadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é um agente aqui descrito, tal como na Seção II. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR também inibe a atividade de uma cinase adicional. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de

mTOR também inibe a atividade de fosfoinositol-3 cinase (PI3K). Em certas modalidades, o agente seletivamente inibe a atividade de mTOR, por exemplo, não inibe detectavelmente a atividade de PI3K, e/ou não inibe a atividade de PI3K na mesma extensão que a atividade de mTOR, em concentrações que são suficientes para inibir a atividade de mTOR. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de cinase. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe mTORC1 e/ou atividade de mTORC2. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 e mTORC2 cinase.

[0273] Em algumas modalidades, as células são cultivadas com um agente selecionado de PI-103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, NVP-BEZ235, uma pirazolopirimidina, Torina I, Torcinibe (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), AZD8055, rapamicina (sirolimus), tensirolimus (CC1779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca), e OSI-027 (OSI). Em algumas modalidades, as células são cultivadas com um agente que tem ou inclui uma fórmula que é fornecida na Seção II, por exemplo, Fórmula (I), Fórmula (II), ou Fórmula (III). Em algumas modalidades, o agente é Composto 155, Composto 246, ou Composto 63.

[0274] Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR em uma concentração que inibe, reduz, e/ou diminui a atividade de mTOR. Em algumas modalidades, a concentração inibe, reduz, e/ou diminui uma ou mais atividades de mTOR em cerca de ou pelo menos 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou 99,9%. Em algumas modalidades, a concentração do agente não previne a proliferação e/ou expansão de células T primárias. Em algumas modalidades, as células são cultivadas na presença de entre 1

nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, entre 100 nM e 250 nM, entre 200 nM e 500 nM, entre 50 nM e 250 nM, entre 100 nM e 500 nM, entre 500 nM e 1 μ M, entre 1 μ M e 10 μ M, ou entre 5 μ M e 50 μ M do agente que inibe a atividade de mTOR. Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, ou 100 μ M do agente que inibe a atividade de mTOR.

[0275] Em algumas modalidades, as células são cultivadas na presença de Composto 155. Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM de Composto 155. Em modalidades particulares, as células são cultivadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM de Composto 155.

[0276] Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de Composto 246. Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM de Composto 155. Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM de Composto 246.

[0277] Em modalidades particulares, as células são cultivadas na presença de Composto 63. Em certas modalidades, as células são cultivadas na presença de entre 1 nM e 1 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 200 nM, entre 100 nM e 250 nM, ou entre 200 nM e 500 nM de Composto 63. Em algumas modalidades, as células são cultivadas na presença de, cerca de, ou de pelo menos 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, ou 500 nM de Composto 63.

[0278] Em algumas modalidades, o cultivo é realizado sob

condições que geralmente incluem uma temperatura adequada para o crescimento de células imunes primárias, tais como linfócitos T humanos, por exemplo, pelo menos cerca de 25 graus Celsius, geralmente pelo menos cerca de 30 graus, e geralmente a ou cerca de 37 graus Celsius. Em algumas modalidades, a composição de células T enriquecidas é incubada em uma temperatura a 25 a 38°C, tais como 30 a 37°C, por exemplo, em ou cerca de 37 °C ± 2 °C. Em algumas modalidades, a incubação é realizada durante um período de tempo até a cultura, por exemplo, cultivo ou expansão, resulta em uma densidade desejada ou limítrofe, número ou dose de células. Em algumas modalidades, a incubação é por mais que, ou mais que cerca de, ou é durante cerca de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias ou mais.

[0279] Em modalidades particulares, o cultivo é realizado em um sistema fechado. Em certas modalidades, o cultivo é realizado em um sistema fechado sob condições estéreis. Em modalidades particulares, o cultivo é realizado no mesmo sistema fechado que as referidas uma ou mais etapas dos sistemas fornecidos. Em algumas modalidades 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 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems, e Pall XRS Bioreactor Systems. Em algumas modalidades, o biorreator é usado para perfundir e/ou misturar as células durante pelo menos uma parte da etapa de cultivo.

[0280] Em algumas modalidades, a mistura é ou inclui balanço e/ou movimento. Em alguns casos, o biorreator pode ser submetido a movimento ou balanço, que, em alguns aspectos, pode aumentar a transferência de oxigênio. Movimentar o biorreator pode incluir, mas não

está limitado à rotação ao longo de um eixo horizontal, girando ao longo de um eixo vertical, um movimento de balanço ao longo de um eixo horizontal inclinado ou em declive do biorreator ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, pelo menos uma parte da incubação é realizada com balanço. A velocidade de balanço e ângulo de balanço podem ser ajustados para obter uma agitação desejada. Em algumas modalidades o ângulo de balanço 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 modalidades, o ângulo de balanço é entre 6 a 16°. Em outras modalidades, o ângulo de balanço é entre 7 a 16°. Em outras modalidades, o ângulo de balanço é entre 8 a 12°. Em algumas modalidades, a taxa de balanço é de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm. Em algumas modalidades, a taxa de balanço é de entre 4 e 12 rpm, tal como entre 4 e 6 rpm, inclusive.

[0281] Em algumas modalidades, o biorreator mantém a temperatura em ou próxima a 37°C e níveis de CO₂ em ou próximos a 5% com um fluxo de ar constante em, ou cerca de, ou pelo menos 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 maior do que 2,0 L/min. Em certas modalidades, pelo menos uma parte do cultivo é realizada com perfusão, tal como com uma taxa de 290 ml/dia, 580 ml/dia, e/ou 1160 ml/dia, por exemplo, dependendo da temporização em relação ao início do cultivo e/ou densidade das células cultivadas. Em algumas modalidades, pelo menos uma parte da expansão da cultura celular é realizada com um movimento de balanço, tal como em um ângulo dentre 5° e 10°, tal como 6°, em uma velocidade de balanço constante, tal como uma velocidade entre 5 e 15 RPM, tal como 6 RMP ou 10 RPM.

E. Formulação das células

[0282] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos para

fabricação, geração ou produção de uma terapia celular e/ou células modificadas podem incluir formulação de células, tal como formulação de células geneticamente modificadas resultantes das etapas de processamento fornecidas antes de ou após a incubação, modificação, e cultivo, e/ou uma ou mais outras etapas de processamento como descrito. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos associados com 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 modalidades, a dose de células que compreendem 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 fornecidos, tal como na prevenção ou tratamento de doenças, condições, e distúrbios, ou em métodos de detecção, diagnóstico, e prognóstico.

[0283] Em alguns casos, as células são processadas em uma ou mais etapas (por exemplo, realizadas na câmara centrífuga e/ou sistema fechado) para fabricação, geração ou produção de uma terapia celular e/ou células modificadas podem incluir formulação de células, tal como formulação de células geneticamente modificadas resultantes das etapas de processamento de transdução fornecidas antes de ou após a cultura, por exemplo, cultivo e expansão, e/ou uma ou mais outras etapas de processamento como descrito. Em alguns casos, as células podem ser formuladas em uma quantidade para administração de dosagem, tal como para a administração de uma única dosagem unitária ou administração de múltiplas dosagens. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos associados com 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.

[0284] Em certas modalidades, uma ou mais composições de células T enriquecidas são formuladas. Em modalidades 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 modalidades particulares, as referidas uma ou mais composições são composições de entrada. Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais composições de entrada foram previamente criocongeladas e armazenadas, e são descongeladas antes da incubação.

[0285] Em algumas modalidades, células T, tais como células T CD4+ e/ou CD8+, geradas por uma ou mais das etapas de processamento são formuladas. Em alguns aspectos, diversas composições são separadamente fabricadas, produzidas ou geradas, cada uma contendo uma diferente população e/ou subtipos de células do indivíduo, tal como para administração separadamente ou independentemente, opcionalmente dentro de certo período de tempo. Por exemplo, formulações separadas de células modificadas contendo diferentes populações ou subtipos de células podem incluir células T CD8+ e CD4+, respectivamente, e/ou populações enriquecidas por CD8+- e CD4+, respectivamente, por exemplo, células T CD4+ e/ou CD8+ cada qual individualmente incluindo células geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, pelo menos uma composição é formulada com células T CD4+ geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, pelo menos uma composição é formulada com células T CD8+ geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, a administração da dose compreende a administração de uma composição compreendendo a dose de células T CD8+ ou uma dose

de células T CD4+ e administração de uma segunda composição compreendendo a outra dose de células T CD4+ e as células T CD8+. Em algumas modalidades, uma primeira composição compreendendo a dose de células T CD8+ ou uma dose de células T CD4+ é administrada antes da segunda composição compreendendo a outra dose de células T CD4+ e as células T CD8+. Em algumas modalidades, a administração da dose compreende a administração de uma composição compreendendo tanto uma dose de células T CD8+ quanto uma dose de células T CD4+.

[0286] Em certas modalidades, as referidas uma ou mais composições de células T enriquecidas são ou incluem duas composições separadas, por exemplo, composições modificadas e/ou cultivadas separadas, de células T enriquecidas. Em modalidades particulares, duas composições separadas de células T enriquecidas, por exemplo, duas composições separadas de células T enriquecidas selecionadas, isoladas, e/ou enriquecidas da mesma amostra biológica, são separadamente formuladas. Em certas modalidades, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em modalidades particulares, as duas composições separadas incluem uma composição de células T CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades, duas composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são separadamente formuladas. Em algumas modalidades, uma única composição de células T enriquecidas é formulada. Em certas modalidades, a única composição é uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em algumas modalidades, a única composição é uma composição de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas que foram combinadas de composições separadas antes da formulação.

[0287] Em algumas modalidades, composições separadas de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas são combinadas em uma única

composição e são formuladas. Em certas modalidades, composições formuladas separadas de células T CD4+ enriquecidas e CD8+ enriquecidas são combinadas em uma única composição após a formulação ter sido realizada e/ou completada.

[0288] Em algumas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas que é formulada, inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em algumas modalidades, a composição inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou a cerca de 100% de células T CD4+ que expressam um receptor recombinante e/ou foi transduzida ou transfectada com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas a qual é formulada inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células CD8+ T, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+.

[0289] Em algumas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é formulada, por exemplo, sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão, inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células CD8+ T. Em certas modalidades, a composição inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos

60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células CD8+ T que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas que é incubada sob condições de estimulação inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células CD4+ T, e/ou não contém nenhuma célula CD4+ T, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+.

[0290] Em certas modalidades, as células formuladas são células de saída. Em algumas modalidades, uma composição formulada de células T enriquecidas é uma composição de saída de células T enriquecidas. Em modalidades particulares, as células formuladas CD4+ T e/ou células formuladas CD8+ T são as células de saída T CD4+ e/ou CD8+. Em modalidades particulares, uma composição formulada de células T CD4+ enriquecidas é uma composição de saída de células T CD4+ enriquecidas. Em algumas modalidades, uma composição formulada de células T CD8+ enriquecidas é uma composição de saída de células T CD8+ enriquecidas.

[0291] Em algumas modalidades, as células podem ser formuladas em um recipiente, tal como uma bolsa ou frascote.

[0292] Em algumas modalidades, as células são formuladas em um tampão farmacologicamente aceitável, o qual pode, em alguns aspectos, incluir um excipiente ou veículo farmacologicamente aceitável. Em algumas modalidades, o processamento inclui a permuta de um meio em um meio ou tampão de formulação que seja farmacologicamente aceitável ou desejado para a administração a um indivíduo. Em algumas

modalidades, as etapas de processamento podem envolver a lavagem das células transduzidas e/ou expandidas para substituir as células em um tampão farmacologicamente aceitável que possa incluir um ou mais excipientes ou veículos farmacologicamente aceitáveis opcionais. Exemplos de tais formas farmacêuticas, incluindo os excipientes ou veículos farmacologicamente aceitáveis, podem ser qualquer uma das descritas abaixo em conjunto com as formas aceitáveis para administrar as células e composições a um indivíduo. A composição farmacêutica em algumas modalidades contém as células em quantidades efetivas para tratar ou prevenir a doença ou condição, tal como uma quantidade terapêuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz.

[0293] Um “veículo farmacologicamente aceitável” refere-se a um ingrediente em uma formulação farmacêutica, diferente de um ingrediente ativo, o qual seja não tóxico a um indivíduo. Um veículo farmacologicamente aceitável inclui, porém não é limitado a, um tampão, exciente, estabilizante ou conservante.

[0294] Em alguns aspectos, a escolha do veículo é determinada em parte pela célula particular e/ou pelo método de administração. Consequentemente, existem várias formulações adequadas. Por exemplo, a composição farmacêutica pode conter conservantes. Os conservantes adequados podem incluir, por exemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sódio, e cloreto de benzalcônio. Em alguns aspectos, uma mistura de dois ou mais conservantes é empregada. O conservante ou misturas do mesmo são 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, por Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980). Os veículos farmacologicamente aceitáveis são geralmente não tóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem, porém não são 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; fenol, álcool butílico ou benzílico; os alquil parabenos tal como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de peso molecular baixo (menor do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tal como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes de quelação tal como EDTA; açúcares tal como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons de formação de sal tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tal como polietileno glicol (PEG).

[0295] Agentes de tamponamento em alguns aspectos são 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, uma mistura de dois ou mais agentes de tamponamento é empregada. O agente de tamponamento ou misturas dos mesmos são tipicamente presentes em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 4% em peso da composição total. Os métodos para preparar composições farmacêuticas administráveis são conhecidos. Os métodos exemplares são descritos em mais detalhes em, por exemplo, Remington: The Science e Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21^a ed. (1^o de maio de 2005).

[0296] As formulações podem incluir soluções aquosas. A formulação ou composição pode também conter mais do que um ingrediente ativo útil para a indicação particular, doença ou condição

que está sendo tratada com as células, preferivelmente aquelas com atividades complementares para as células, onde as respectivas atividades não adversamente afetam uma a outra. Tais ingredientes ativos são adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido. Desse modo, em algumas modalidades, a composição farmacêutica também inclui outros fármacos ou agentes farmacologicamente ativos, tais como agentes quimioterápicos, por exemplo, asparaginase, busulfan, carboplatina, cisplatina, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracila, gencitabina, hidroxiureia, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, e/ou vincristina.

[0297] As composições em algumas modalidades são fornecidas como preparações líquidas estéreis, por exemplo, soluções aquosas isotônicas, suspensões, emulsões, dispersões, ou composições viscosas, que podem, em alguns aspectos, ser tamponadas para um pH selecionado. As composições líquidas podem compreender veículos, os quais podem ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, salina, salina tamponada por fosfato, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido) e misturas adequadas dos mesmos. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se as células em um solvente, tal como uma mistura com um veículo adequado, diluente ou excipiente tal como água estéril, salina fisiológica, glicose, dextrose, ou similar(es). As composições podem conter substâncias auxiliares tais como agentes umectantes, dispersantes ou emulsificantes (por exemplo, metilcelulose), agentes de tamponamento de pH, aditivos de realce de viscosidade ou gelificante, conservantes, agentes aromatizantes, e/ou colorantes, dependendo da rotina de administração e a preparação desejada. Os textos padrões podem em alguns aspectos ser consultados para preparar as preparações adequadas.

[0298] Vários aditivos que realçam a estabilidade e a esterilidade das composições, incluindo os conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelação, e tampões, podem ser adicionados. A prevenção da ação dos microorganismos pode ser obtida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabens, clorobutanol, fenol, e ácido sórbico. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser obtida pelo uso de agentes de retardo de absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0299] Em algumas modalidades, o tampão formulação contém um crioconservante. Em algumas modalidades, as células são formuladas com uma solução de crioconservante que contém de 1,0% a 30% de solução de DMSO, tal como uma solução de DMSO de 5% a 20% ou uma solução de DMSO de 5% a 10%. Em algumas modalidades, a solução de crioconservação é ou contém, por exemplo, PBS contendo 20% de DMSO e 8% de albumina de soro humano (HSA), ou outro meio de congelamento celular adequado. Em algumas modalidades, a solução crioconservante é ou contém, por exemplo, pelo menos ou cerca de 7,5% de DMSO. Em algumas modalidades, as etapas de processamento podem envolver a lavagem das células transduzidas e/ou expandidas para substituir as células em uma solução crioconservante. Em algumas modalidades, as células são congeladas, por exemplo, criocongeladas ou criopreservadas, em meio e/ou solução com uma concentração final de ou de cerca de 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5%, ou 5,0% de DMSO, ou entre 1% e 15%, entre 6% e 12%, entre 5% e 10%, ou entre 6% e 8% de DMSO. Em modalidades particulares, as células são congeladas, por exemplo, criocongeladas ou criopreservadas, em meio 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.

[0300] Em algumas modalidades, a formulação é realizada empregando-se uma ou mais etapas de processamento incluindo lavagem, diluição ou concentração das células, tais como as células cultivadas ou expandidas. Em algumas modalidades, o processamento pode incluir diluição ou concentração das células a uma concentração desejada ou número, tais como composições de forma de dose unitária incluindo o número de células para a administração em uma dose fornecida ou fração das mesmas. Em algumas modalidades, as etapas de processamento podem incluir uma redução de volume para assim aumentar a concentração de células como desejado. Em algumas modalidades, as etapas de processamento podem incluir uma adição de volume para assim diminuir a concentração de células como desejado. Em algumas modalidades, o processamento inclui adicionar um volume de um tampão de formulação às células transduzidas e/ou expandidas. Em algumas modalidades, o volume de tampão de formulação é de, ou de cerca de 10 mL a 1000 mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos ou cerca de ou 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL ou 1000 mL.

[0301] Em algumas modalidades, tais etapas de processamento para formular uma composição celular é realizada em um sistema fechado. Exemplos de tais etapas de processamento podem ser realizados empregando-se uma câmara centrífuga em conjunto com um ou mais sistemas ou *kits* associados com um sistema de processamento de célula, tal como uma câmara centrífuga produzida e vendida por Biosafe SA, incluindo aquelas para o uso com os sistemas de processamento de célula Sepax® ou Sepax 2®. Um processo e sistema exemplar é descrito na Publicação Internacional Número WO2016/073602. Em algumas modalidades, o método inclui efetuar a expressão da cavidade interna da câmara centrífuga uma composição

formulada, a qual é a composição resultante das células formuladas em um tampão de formulação, tal como um tampão farmacologicamente aceitável, em qualquer uma das modalidades como acima descrito. Em algumas modalidades, a expressão da composição formulada é para um recipiente, tais como os frascos dos vasos de material biomédico descritos aqui, os quais são operavelmente ligados como parte de um sistema fechado com a câmara centrífuga. Em algumas modalidades, os vasos de material biomédico são configurados para integração e/ou conexão operável e/ou são integrados ou operavelmente conectados, a um sistema fechado ou dispositivo que realiza uma ou mais etapas de processamento. Em algumas modalidades, o vaso de material biomédico é conectado a um sistema uma linha de saída ou posição de saída. Em alguns casos, o sistema fechado é conectado ao frasco do vaso de material biomédico no tubo de entrada. Os sistemas fechados exemplares para o uso com os vasos de material biomédicos descritos aqui incluem os sistemas Sepax® e Sepax® 2.

[0302] Em algumas modalidades, o sistema fechado, tal como associado com a câmara centrífuga ou sistema de processamento de célula, inclui um *kit* de saída multi-porta contendo múltiplas tubulações multi-caminhos, associadas em cada extremidade de uma linha de tubulação com uma porta, a qual um ou várias recipientes podem ser conectados para a expressão da composição formulada. Em alguns aspectos, um número desejado ou várias frascos, pode ser esterilmente conectados a uma ou mais, geralmente duas ou mais, tal como pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais das portas da saída de múltiplas portas. Por exemplo, em algumas modalidades, um ou mais recipientes, por exemplo, vasos de material biomédicos, podem ser ligados às portas, ou a menor de todas as portas. Desse modo, em algumas modalidades, o sistema pode efetuar a expressão da

composição de saída em várias frasconetes dos vasos de material biomédicos.

[0303] Em alguns aspectos, as células podem ser expressas a uma ou mais da pluralidade de recipientes de saída, por exemplo, frasconetes, em uma quantidade para a administração de dosagem, tal como para uma administração de dosagem unitária simples ou administração de dosagem múltipla. Por exemplo, em algumas modalidades, os frasconetes, podem cada um conter o número de células para a administração em uma dose fornecida ou fração das mesmas. Desse modo, cada frasconete, em alguns aspectos, pode conter uma dose unitária simples para administração ou pode conter uma fração de uma dose desejada tal que mais do que uma das pluralidades de frasconetes, tais como dois dos frasconetes, ou 3 dos frasconetes, juntos constituam uma dose para administração.

[0304] Desse modo, os recipientes, por exemplo, bolsas ou frasconetes, geralmente contêm, como células a serem administradas, por exemplo, uma ou mais doses unitárias dos mesmos. A dose unitária pode ser uma quantidade ou número das células a serem administradas ao indivíduo ou duas vezes o número (ou mais) das células a serem administradas. Pode ser a menor dose ou a menor dose possível das células que seriam administradas ao indivíduo.

[0305] Em algumas modalidades, cada um dos recipientes, por exemplo, bolsas ou frasconetes, individualmente compreende uma dose unitária das células. Desse modo, em algumas modalidades, cada um dos recipientes compreende o mesmo ou aproximadamente ou substancialmente o mesmo número de células. Em algumas modalidades, cada dose unitária contém pelo menos ou cerca de pelo menos 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , ou 1×10^8 de células modificadas, células totais, células T, ou PBMCs. Em algumas modalidades, o volume da composição de célula formulada em cada

recipiente, por exemplo, bolsa ou frascote, é 10 mL a 100 mL, tal como pelo menos ou cerca de pelo menos 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL ou 100 mL. Em algumas modalidades, as células no recipiente, por exemplo, bolsa ou frascotes, podem ser crioconservadas. Em algumas modalidades, o recipiente, por exemplo, frascotes, podem ser armazenados em nitrogênio líquido até o próximo uso.

[0306] Em algumas modalidades, tais células produzidas pelo método, ou uma composição compreendendo tais células, são administradas a um indivíduo para tratar uma doença ou condição.

F. Características exemplares da Composição de saída

[0307] Em modalidades particulares, os métodos fornecidos são usados em conexão com um processo que produz ou gera uma ou mais composições de saída de células T enriquecidas de uma ou mais composições de entrada e/ou de uma amostra biológica única. Em certas modalidades, uma ou mais composições de saída contém células que expressam um receptor recombinante, por exemplo, um TCR ou um CAR. Em algumas modalidades, o processo envolve uma incubação, modificação, e/ou cultura de células na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, tais como qualquer uma como descrito, por exemplo, Composto 63. Em modalidades particulares, as células das composições de saída são adequadas para administração a um indivíduo como uma terapia, por exemplo, uma terapia de célula autóloga.

[0308] Em algumas modalidades, as células da composição de saída são modificadas para expressarem um receptor recombinante pelos métodos fornecidos aqui, tal como acima descrito. Em certas modalidades, as células da composição de saída são modificadas para expressarem um receptor de antígeno quimérico (CAR), por exemplo, um CAR anti-CD19.

[0309] Em algumas modalidades, uma ou mais composições de saída é ou são uma composição de CD4+ enriquecida e células T CD8+. Em certas modalidades, uma ou mais composições de saída incluem uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em modalidades particulares, uma ou mais composições de saída incluem uma composição de células T CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades, uma ou mais composições de saída incluem uma composição de saída de células T CD4+ enriquecidas e uma composição de saída de células T CD8+ enriquecidas.

[0310] Em algumas modalidades, uma composição de saída de células T CD4+ enriquecidas inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em certas modalidades, a composição de saída inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou a cerca de 100% de células T CD4+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de saída de células T CD4+ enriquecidas inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD8+, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+.

[0311] Em algumas modalidades, uma composição de saída de células T CD8+ enriquecidas inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%,

pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD8+. Em modalidades particulares, a composição inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em ou a cerca de 100% de células T CD8+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de saída de células T CD8+ enriquecidas inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém nenhuma célula T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+.

[0312] Em certas modalidades, o processo associado com os métodos fornecidos é comparado a um processo exemplar e/ou alternativo. Em algumas modalidades, o processo alternativo e/ou exemplar é similar ou o mesmo como o processo associado com os métodos fornecidos, com a exceção de que as composições de células (por exemplo, células de entrada, células estimuladas, e/ou células modificadas que incluem as células T CD4+ enriquecidas, células T CD8+ enriquecidas, e/ou CD4+ enriquecidas e células T CD8+) não são incubadas, modificadas, e/ou cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, as células de saída do processo alternativo exemplar não são previamente cultivadas, por exemplo, para expandir as células T modificadas, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, as células de saída produzidas pelo processo alternativo, exemplar são modificadas para

expressarem o mesmo receptor recombinante como as células da composição de saída produzidas em associação com os métodos fornecidos.

[0313] Em algumas modalidades, um ou mais genes são diferencialmente expressos pelas células da composição de saída como comparado à expressão em células de saída de um processo alternativo exemplar, por exemplo, um processo através do qual as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, um ou mais genes são sub-regulados em células da composição de saída como comparados às células de saída produzidas por um processo alternativo exemplar. Em algumas modalidades, um ou mais genes associados com a resposta de estresse metabólica, ativação de célula T, trilha de ativação de Th1 e Th2, controle de ciclo celular, biossíntese de glucocorticoide, hematopoiese de células-tronco pluripotentes, ativação de célula T, diferenciação de linfócito, migração de leucócito, atividade inibidora de endopeptidase tipo cisteína, progressão do ciclo celular, resposta aos níveis de nutrientes, e sinalização do receptor do fator de crescimento são sub-regulados em células da composição de saída como comparados às células de saída produzidas pelo processo alternativo exemplar.

[0314] Em certas modalidades, um ou mais genes são super-regulados em células da composição de saída como comparados às células de saída produzidas por um processo alternativo exemplar, tal como um processo não realizado na presença de um agente que inibe mTOR, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, um ou mais genes associados com a sinalização do receptor de fator de crescimento, oxidação de ácido graxo, trilha de sinalização do receptor de citocina gama comum, desglicosilação de proteína, ativação de célula T, diferenciação de linfócito de progressão do ciclo celular, trilha

de ativação de Th1 e Th2, homeostase esterol, hematopoiese de células-tronco pluripotentes, processo apoptótico, ativação de célula T, e ativação de RAR, e sinalização mediada por íon são super-regulados em células da composição de saída como comparados às células de saída produzidas pelo processo alternativo exemplar.

[0315] Em algumas modalidades, a composição de saída contém células, por exemplo, células T CD4+ e/ou CD8+ modificadas para expressar um receptor recombinante, que possui a mesma ou resposta maior à estimulação por um antígeno, por exemplo, um antígeno que é ligado por e/ou reconhecido pelo receptor recombinante, como comparado às células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo, por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63. Em algumas modalidades, as células da composição de saída possuem igual ou maior, e/ou são capazes de produzir igual ou maior aumento no metabolismo glicolítico, atividade de mTOR, produção de citocina, atividade citolítica, expansão e/ou proliferação na resposta ao estímulo pelo antígeno como comparados às células de saída produzidas pelo processo exemplar, alternativo.

[0316] Em algumas modalidades, as células de saída possuem uma resposta similar com relação a um parâmetro, atributo, e/ou atividade como as células de saída produzidas por um processo exemplar/alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são incubadas, modificadas, e/ou cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em algumas modalidades, uma medição da resposta similar das células de saída não é estatisticamente diferente de uma medição da resposta por células de saída produzidas pelo processo exemplar, alternativo. Em algumas modalidades, a medição da resposta similar das células de saída está dentro de 25%, 20%, 10%, 5%, ou 1% da medição da resposta pelas células de saída

produzidas pelo processo exemplar, alternativo.

[0317] Em certas modalidades, as alterações no metabolismo celular, por exemplo, a taxa de metabolismo glicolítico, pode funcionar como um condutor e/ou um regulador da função de célula imune. Em algumas modalidades, as células da composição de saída possuem um aumento similar na taxa de metabolismo glicolítico por estimulação de antígeno como células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em algumas modalidades, as células da composição de saída possuem, possuem cerca de, ou possuem pelo menos a 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, ou 5 vezes o aumento na taxa de metabolismo glicolítico em resposta ao estímulo por um antígeno. Em certas modalidades, o aumento no metabolismo glicolítico na resposta à estimulação de antígeno é de pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, ou 100% maior do que o aumento na taxa de metabolismo glicolítico por estimulação de antígeno em células de saída produzidas pelo processo exemplar, alternativo. Em certas modalidades, o metabolismo glicolítico pode ser medido por quaisquer métodos conhecidos, incluindo por medição extracelular de consumo de oxigênio e produção de ácido (ECAR).

[0318] Em modalidades particulares, as células da composição de saída possuem um aumento similar de atividade de mTOR por estimulação de antígeno como as células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em algumas modalidades, as células da composição de saída possuem, possuem cerca de, ou possuem pelo menos a 25%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes,

4 vezes, ou 5 vezes o aumento na atividade de mTOR em resposta ao estímulo por um antígeno. Em certas modalidades, a atividade aumentada de mTOR em resposta à estimulação de antígeno é de pelo menos 25%, 50%, 75%, ou 100% maior do que o aumento na atividade de mTOR pelo estímulo de antígeno em células de saída produzidas pelo processo exemplar, alternativo.

[0319] Em certas modalidades, as células da composição de saída possuem uma produção de citocina similar em resposta à estimulação de antígeno como as células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em algumas modalidades, as células da composição de saída possuem uma produção similar de uma citocina, por exemplo, TNF-alfa, IFN-gama, e/ou IL-2, em resposta à estimulação de antígeno como as células de saída produzidas pelo processo exemplar, alternativo. Em algumas modalidades, as células da composição de saída possuem, possuem cerca de, ou possuem pelo menos a 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, ou 5 vezes o aumento na produção de uma ou mais citocinas em resposta à estimulação por um antígeno comparado a um processo alternativo não realizado na presença de um agente que inibe mTOR, por exemplo, o Composto 63. Em certas modalidades, a atividade aumentada de mTOR em resposta à estimulação de antígeno é de pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, ou 100% maior do que a produção de uma ou mais citocinas após a estimulação de antígeno em células de saída produzidas pelo processo exemplar, alternativo. Em algumas modalidades, a produção de uma citocina pode ser medida ou avaliada por técnicas conhecidas padrões, incluindo, porém não limitado a, ELISA e/ou métodos de detecção com base em anticorpo.

[0320] Em modalidades particulares, as células da composição de saída possuem uma porção similar, porcentagem, e/ou quantidade de células que produzem uma ou mais citocinas em resposta à estimulação de antígeno como a porção, porcentagem, e/ou quantidade das células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em certas modalidades, 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 uma ou mais citocinas, por exemplo, TNF-alfa, IFN-gama, e/ou IL-2, em resposta à estimulação de antígeno. Em modalidades particulares, a porção, porcentagem, e/ou quantidade da composição de saída que produz uma ou mais citocinas é de 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 do que a porção, porcentagem e/ou quantidade de células de saída produzidas pelo processo exemplar, alternativo que produzem uma ou mais citocinas. Em certas modalidades, a porção, porcentagem e/ou quantidade das células que produzem a citocina pode ser medida ou avaliada por qualquer técnica padrão ou conhecida, incluindo ensaios de manchamento de citocina intracelular (ICS).

[0321] Em modalidades particulares, as células da composição de saída possuem uma atividade citolítica similar em relação às células expressando um antígeno ligadas por e/ou reconhecidas pelo receptor recombinante (por exemplo, células alvo) as células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são incubadas, modificadas, e/ou cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em algumas modalidades, quando as células da composição de saída são expostas às células que expressam o

antígeno, por exemplo, as células alvos, as células da composição de saída matam, matam cerca de, ou matam pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100% de células que expressam o antígeno. Em certas modalidades, as células da composição de saída matam pelo menos 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, ou 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, ou 5 vezes mais quantidade de células que expressam o antígeno, por exemplo, células alvo, do que as células de saída produzidas por um processo alternativo exemplar sob condições similares ou as mesmas condições.

[0322] Em modalidades particulares, as células da composição de saída possuem uma menor, reduzida, e/ou diminuída porção, porcentagem e/ou quantidade de células que expressam um ou mais marcadores de exaustão quando comparadas à porção, porcentagem e/ou quantidade das células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em certas modalidades, menos do que ou cerca de 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, ou 0,1% das células da composição de saída expressam um ou mais marcadores de exaustão. Em certas modalidades, a porção, porcentagem e/ou quantidade de células que expressam um ou mais marcadores de exaustão na composição de saída é, ou é pelo menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90% menos do que a porção, porcentagem, e/ou quantidade de células que expressam os um ou mais marcadores em uma composição de saída produzida pelo processo exemplar, alternativo. Em modalidades particulares, os um ou mais marcadores de exaustão é ou inclui CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA, e/ou CD96.

[0323] Em várias modalidades, as células da composição de saída possuem uma menor, reduzida e/ou diminuída porção, porcentagem,

e/ou quantidade de células que são diferenciadas quando comparadas à porção, porcentagem e/ou quantidade das células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em certas modalidades, as células da composição de saída são menos diferenciadas do que as células produzidas por métodos alternativos. Em modalidades particulares, as células menos diferenciadas da composição de saída possuem ou incluem uma maior capacidade para estimulação, ativação, expansão, resposta de citocina, atividade citolítica, ou atividade antitumor do que a maioria das células diferenciadas produzidas por um processo exemplar, alternativo.

[0324] Em algumas modalidades, os métodos fornecidos produzem uma composição de saída de células que são aumentadas no número ou porcentagem de células T tipo memória, tais como células T de população de longa vida, menos diferenciadas, tais como células T de memória de longa vida. Em algumas modalidades, tais células T de memória são células T de memória central (TC_M) ou células tronco de memória T ($T_S C_M$). Em algumas modalidades, as células T de memória são células $T_S C_M$. Em algumas modalidades, as células da composição de saída possuem uma porcentagem ou número maior ou aumentado de células que possuem um fenótipo tipo memória, tais como células T de memória de vida longa. Em algumas modalidades, o número ou porcentagem de células T tipo memória, tais como células T de memória de vida longa ou células tronco de memória ($T_S C_M$), na composição é aumentado pelo menos 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes comparado ao número ou porcentagem da população correspondente de células de saída produzidas por um processo exemplar, alternativo (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor

de mTOR, por exemplo, Composto 63).

[0325] Em certas modalidades, as células da composição de saída são administradas a um indivíduo. Em algumas modalidades, as células da composição de saída são administradas para tratar uma doença ou condição. Em algumas modalidades, a doença ou condição é câncer. Em algumas modalidades, as células das composições de saída são administradas ao indivíduo, e indivíduo experimenta uma redução nas células de câncer e/ou volume de tumor. Em algumas modalidades, o indivíduo possui, possui cerca de, ou possui pelo menos a 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100% de redução da quantidade de células de câncer e/ou redução de tumor após a administração das células da composição de saída, por exemplo, quando comparado à quantidade de células de câncer e/ou volume de tumor no indivíduo antes da administração. Em algumas modalidades, a administração das células da composição de saída resulta em uma redução aumentada de volume de tumor e/ou quantidade de células de câncer no indivíduo quando comparado à redução de volume de tumor e/ou quantidade de células de câncer no indivíduo após a administração de células de saída produzidas por um processo alternativo exemplar (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em modalidades particulares, a administração de células da composição de saída resulta em um aumento na redução de volume de tumor e/ou quantidade de células de câncer 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, 5 vezes, quando comparado à redução do volume de tumor e/ou quantidade de células de câncer no indivíduo após a administração de células de saída produzidas pelo processo alternativo exemplar.

[0326] Em modalidades particulares, as células das composições

de saída, por exemplo, células modificadas expressando um receptor recombinante, são detectáveis em um indivíduo, por exemplo, detectável em amostras biológicas tais como amostras de soro obtidas de um indivíduo, após a administração. Em certas modalidades, as células da composição de saída, são detectáveis em indivíduos em ou pelo menos em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 semanas após, ou pelo menos 3, 6, 12, 18, 24, 30, ou 36 meses, ou pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, ou mais anos após a administração das células da composição de saída. Em algumas modalidades, a administração de células da composição de saída resulta em uma aumentada ou realçada persistência *in vivo* após a administração quando comparado às células de saída produzidas por um processo alternativo exemplar (por exemplo, um processo onde as células não são cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63). Em modalidades particulares, a administração de células da composição de saída são detectáveis em um indivíduo por cerca de, ou por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 semanas, ou por cerca de, ou por pelo menos 3, 6, 12, 18, 24, 30, ou 36 meses, ou por cerca de, ou por pelo menos 1, 2, 3, ou mais anos a mais do que as células de saída produzidas por um processo alternativo exemplar.

[0327] Em algumas modalidades, administrar as células da composição de saída a um indivíduo, por exemplo, um indivíduo com uma doença ou condição tal como câncer, melhora a probabilidade e/ou possibilidade de sobrevivência. Por exemplo, em algumas modalidades, as células da composição de saída são administradas a um indivíduo com doença ou condição, a probabilidade e/ou possibilidade de sobrevivência durante, durante cerca de, ou durante pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 meses, ou durante 1, , 3, 4, 5, 10, ou mais do que 10 anos é de pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%. Em certas modalidades, a administração com as células da composição de saída fornece pelo menos a 10%, 20%, 25%, 30%, 40%,

50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, ou pelo menos a 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, ou 5 vezes mais probabilidade e/ou possibilidade de sobrevivência do que a administração com células de saída de um processo alternativo exemplar (por exemplo, um processo onde as células não são incubadas, modificadas, e/ou cultivadas na presença de um inibidor de mTOR, por exemplo, Composto 63).

II. AGENTES QUE INIBEM A ATIVIDADE DE MTOR

[0328] Em algumas modalidades, uma ou mais etapas dos métodos fornecidos são realizadas na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR. mTOR é também conhecido como mamífero alvo de rapamicina, alvo mecanístico de rapamicina, proteína-1 associada ao complexo de rapamicina de proteína-12 de ligação de FK506, proteína associada ao complexo FKBP12-rapamicina, Rapamicina e alvo 1 de FKBP12, proteína 1 alvejada por Rapamicina, FRAP, FRAP1, FRAP2, RAFT1, e RAPT1. Em alguns aspectos, a proteína de mTOR humana corresponde a *Uniprot N°*: P42345. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido da proteína mTOR humana é apresentada na SEQ ID NO: 34. Em algumas modalidades, um agente que inibe a atividade de mTOR inibe, reduz, e/ou diminui, e/ou é capaz de inibir, reduzir e/ou diminuir pelo menos uma atividade de mTOR. Em modalidades particulares, um agente que inibe a atividade de mTOR inibe, reduz, e/ou diminui, e/ou é capaz de inibir, reduzir e/ou diminuir uma atividade de mTOR cinase.

[0329] Em alguns aspectos, mTOR é uma treonina conservada e serina proteína cinase e pertence à família das cinases relacionadas a fosfatidilinositol-3-cinase (PIKKs). mTOR é uma proteína cinase que fosforila resíduos de serina e treonina em seus substrates. Em certos aspectos, mTOR serve como as subunidades catalíticas de dois complexos de multi-proteínas denominados como o complexo 1 de mTOR (mTORC1) e complexo 2 (mTORC2). Em aspectos particulares,

mTORC1 e mTORC2 funcionam independentemente um do outro, apesar do fato que, em certos aspectos, ambos mTORC1 e mTORC2 são envolvidos na fosfoinositol-3 cinase (PI3K) e trilha de sinalização de Akt. Em algumas modalidades, um agente que inibe a atividade de mTOR inibe, reduz, e/ou diminui, e/ou é capaz de inibir, reduzir e/ou diminuir uma atividade de mTORC1, por exemplo, uma atividade de mTORC1 cinase, e/ou uma atividade de mTORC2.

[0330] Em alguns aspectos, mTORC1 é um complexo de proteína com cinco componentes: mTOR, o qual é a subunidade catalítica do complexo; proteína associada regulatória de mTOR (Raptor); mamífero letal com proteína 8 de Sec13 (mLST8, também conhecido como GβL); substrato 40 kDa de AKT rico em prolina (PRAS40); e proteína de interação de mTOR contendo o domínio DEP (Deptor). Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR previne a formação de e/ou desestabiliza o complexo mTORC1.

[0331] Em certos aspectos, mTORC2 compreende seis diferentes proteínas, várias das quais são comuns a mTORC1 e mTORC2: mTOR; companheiro insensível a rapamicina de mTOR (Rictor); proteína de interação de proteína cinase ativada por estresse do mamífero (mSIN1); proteína observada com Rictor-1 (Protor-1); mLST8; e Deptor. Em modalidades particulares, o agente que inibe atividade previne a formação de e/ou desestabiliza o complexo mTORC2.

[0332] Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é um composto, uma molécula pequena, por exemplo, molécula orgânica pequena, um polinucleotídeo, um oligonucleotídeo, um siRNA, um polipeptídeo, ou um fragmento, isoforma, variante, análogo, ou derivado do mesmo que inibe, reduz, previne e/ou é capaz de inibir, reduzir ou prevenir, uma ou mais atividades de mTOR. Em algumas modalidades, o agente is a small molecule. Em modalidades particulares, o agente é uma molécula pequena com um peso molecular

de menos do que 10 kD, menos do que 9 kD, menos do que 8 kD, menos do que 7 kD, menos do que 6 kD, menos do que 5 kD, menos do que 4 kD, menos do que 3 kD, menos do que 2 kD, menos do que 1 kD, menos do que 0,5 kD, ou menos do que 0,1 kD. Em algumas modalidades, o agente é uma molécula pequena que é ou contém ácidos nucleicos, peptídeos, polipeptídeos, peptidomiméticos, peptídeos, carboidratos, lipídeos, componentes dos mesmos ou outras moléculas orgânicas ou inorgânicas. Bibliotecas de misturas químicas e/ou biológicas, tais como extratos algais, fúngicos ou bacterianos, são conhecidas na técnica e podem ser analisadas com qualquer um dos ensaios da invenção. Exemplos de métodos para a síntese de bibliotecas moleculares podem ser encontrados em: (Carell e outro(s), 1994a; Carell e outro(s), 1994b; Cho e outro(s), 1993; DeWitt e outro(s), 1993; Gallop e outro(s), 1994; Zuckermann e outro(s), 1994).

[0333] Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR especificamente e/ou seletivamente inibe pelo menos uma atividade de mTOR. Em várias modalidades, que o agente inibe a atividade de mTOR inibe pelo menos uma atividade de uma proteína mTOR, tal como, por exemplo, a atividade da proteína cinase de serina/treonina em pelo menos um de seus substratos, por exemplo, p70S6 cinase 1, 4E-BP1, Akt, e eEF2. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR liga-se diretamente a, e inibe, e/ou é capaz de ligar-se diretamente a e, inibir, mTORC1, mTORC2, ou ambos mTORC1 e mTORC2. Em algumas modalidades, a inibição da atividade de mTOR pelo agente é irreversível. Em certas modalidades, a inibição da atividade de mTOR pelo agente é reversível.

[0334] Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui um IC₅₀ de menos do que 500 µM, menos do que 200 µM, menos do que 100 µM, menos do que 50 µM, menos do que 10 µM, menos do que 5 µM, menos do que 1 µM, menos do que 500 nM, menos

do que 200 nM, menos do que 100 nM, menos do que 50 nM, menos do que 10 nM, menos do que 5 nM, menos do que 1 nM, ou menos do que 500 pM. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui um IC_{50} de entre 1 nM e 500 μ M, entre 1 nM e 500 nM, entre 1 μ M e 500 μ M, entre 10 μ M e 100 μ M, entre 100 nM e 1 μ M, entre 250 nM e 750 nM, entre 50 nM e 200 nM, ou entre 400 nM e entre 600 nM. Em algumas modalidades, as determinações de IC_{50} podem ser obtidas empregando-se quaisquer técnicas convencionais e/ou padrões conhecidas. Por exemplo, em algumas modalidades, um IC_{50} pode ser determinado medindo-se a atividade de mTOR na presença de várias concentrações do inibidor sob estudo. Os valores experimentalmente obtidos de atividade de enzima são, em seguida, plotados contra as concentrações de inibidores empregados. A concentração do inibidor que exibe 50% de atividade de enzima (quando comparado à atividade na ausência de qualquer inibidor) é tomada como o valor " IC_{50} ". Analogamente, outras concentrações inibitórias podem ser definidas através de determinações apropriadas de atividade. Em algumas modalidades, o IC_{50} é medido em um ensaio livre de célula. Em modalidades particulares, o IC_{50} é medido em um ensaio de cultura de célula. Em certas modalidades, a cultura de célula é uma cultura de célula T, por exemplo, uma cultura de célula T primária.

[0335] Em algumas modalidades, a inibição da atividade de mTORC1 e/ou mTORC2 pode ser determinada por uma redução na transdução sinal a jusante de mTORC1 e/ou mTORC2. Uma ampla variedade de leituras pode ser utilizada para estabelecer uma redução da saída de tal trilha de sinalização. Por exemplo, em algumas modalidades, leituras exemplares não limitantes incluem para atividade de mTORC2 (1) uma diminuição na fosforilação de Akt nos resíduos, incluindo, porém não limitado a, S473 e T308 e/ou (2) uma diminuição na ativação de Akt como evidenciado, por exemplo, por uma redução

de fosforilação de substratos de Akt incluindo, porém não limitado a, Fox01 e Fox03a T24/32, GSK3-beta S21/9, e TSC2 T1462. Em certas modalidades, leituras exemplares não limitantes da atividade de mTORC1 incluem uma diminuição na fosforilação das moléculas de sinalização a jusante de mTORC1, incluindo, porém não limitado a, S6 S240/244 ribossômico, S6K1 T389, e 4EBP1 T37/46. Em certas modalidades, uma leitura exemplar da inibição de mTORC1 e/ou mTORC2 é a inibição da proliferação de células cancerosas.

[0336] Medir, detectar e/ou avaliar com fosforilação específica de sítio pode ser realizado por quaisquer métodos, incluindo, porém não limitado a, técnicas de manchamento de anticorpo e imunoenaios, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), imunensaio de enzima (EIA), radioensaio (RIA), ressonância plásmo superficial (SPR), Mancha do Oeste, ou formação de proteína.

[0337] Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR pode também inibir cinases que são estruturalmente similares a mTOR e/ou possuem as mesmas ou substancialmente similares atividades como mTOR (um pan-inibidor). Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR também inibe a atividade de fosfoinositol-3 cinase (PI3K). Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1, atividade de mTORC2, e atividade de PI3K. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade cinase de mTORC1, mTORC2, e PI3K. Em aspectos particulares, uma ampla variedade de leituras pode ser utilizada para estabelecer uma redução da atividade de PI3K. Em algumas modalidades, tais leituras incluem, mas não estão limitados a, (1) uma diminuição na fosforilação de Akt nos resíduos, incluindo, porém não limitado a, S473 e T308 e/ou (2) uma diminuição na ativação de Akt como evidenciado, por exemplo, por uma redução de fosforilação de substratos de Akt incluindo, porém não limitado a,

Fox01 e Fox03a T24/32, GSK3-beta S21/9, e TSC2 T1462, e/ou (3) uma redução da quantidade, nível ou concentração de fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfatos (PIP3).

[0338] Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR, por exemplo, atividade de mTORC1 e/ou mTORC2 cinase também inibe PI3K. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de PI3K, mTORC1, e mTORC2 com um IC₅₀ (concentração que inibe 50% da atividade) de menos do que 500 µM, menos do que 200 µM, menos do que 100 µM, menos do que 50 µM, menos do que 10 µM, menos do que 5 µM, menos do que 1 µM, menos do que 500 nM, menos do que 200 nM, menos do que 100 nM, menos do que 50 nM, menos do que 10 nM, menos do que 5 nM, menos do que 1 nM, ou menos do que 500 pM. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de PI3K, mTORC1, e mTORC2 com um IC₅₀ de entre 1 nM e 500 µM, entre 1 nM e 500 nM, entre 1 µM e 500 µM, entre 1 nM e 1 µM, entre 10 µM e 100 µM, entre 100 nM e 1 µM, entre 250 nM e 750 nM, entre 50 nM e 200 nM, ou entre 400 nM e entre 600 nM. Em algumas modalidades, o IC₅₀ é medido em um ensaio livre de célula. Em modalidades particulares, o IC₅₀ é medido em um ensaio de cultura de célula. Em certas modalidades, a cultura de célula é uma cultura de célula T, por exemplo, uma cultura de célula T primária. Em certas modalidades, tais agentes incluem, mas não estão limitados a, PI-103, SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XL765 (Exelixis), PF-04691502, e NVP-BEZ235 (Novartis). Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é PI-103, SF1126, BGT226, XL765, PF-04691502, e NVP-BEZ235.

[0339] Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR não inibe a atividade de PI3K. Em certas modalidades, o agente não detectavelmente reduz, inibe, ou diminui a atividade de PI3K no IC₅₀

para a atividade de mTOR. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR possui um IC_{50} para atividade de PI3K que é pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 100%, pelo menos 150%, pelo menos 1 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 50 vezes, ou pelo menos 100 vezes maior do que o IC_{50} para uma atividade de mTOR. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe, por exemplo, seletivamente inibe, a atividade de mTORC1 e mTORC2 cinase em relação a atividade de PI3K. Em certas modalidades, o inibidor da atividade de mTOR é uma pirazolopirimidina, Torina I, Torkinib (PP242), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), ou AZD8055.

[0340] Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR seletivamente inibe mTORC1 com um IC_{50} de menos do que 500 μ M, menos do que 200 μ M, menos do que 100 μ M, menos do que 50 μ M, menos do que 10 μ M, menos do que 5 μ M, menos do que 1 μ M, menos do que 500 nM, menos do que 200 nM, menos do que 100 nM, menos do que 50 nM, menos do que 10 nM, menos do que 5 nM, menos do que 1 nM, ou menos do que 500 pM. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 com um IC_{50} de entre 1 nM e 500 μ M, entre 1 nM e 500 nM, entre 1 μ M e 500 μ M, entre 10 μ M e 100 μ M, entre 100 nM e 1 μ M, entre 250 nM e 750 nM, entre 50 nM e 200 nM, ou entre 400 nM e entre 600 nM. Em algumas modalidades, o IC_{50} é medido em um ensaio livre de célula. Em modalidades particulares, o IC_{50} é medido em um ensaio de cultura de célula. Em certas modalidades, a cultura de célula é uma cultura de célula T, por exemplo, uma cultura de célula T primária.

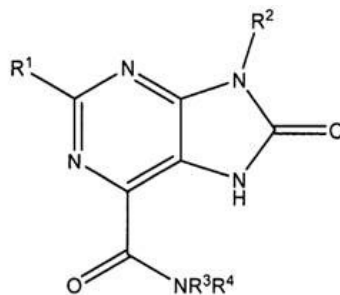
[0341] Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR inibe seletivamente a atividade de mTORC1 em relação à

atividade de mTORC2 e/ou PI3K. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui um IC₅₀ para a atividade de PI3K que é pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 100%, pelo menos 150%, pelo menos 1 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 50 vezes, ou pelo menos 100 vezes maior do que o IC₅₀ para uma atividade de mTORC1. Em algumas modalidades, o agente é rapamicina (sirolimo). Em modalidades particulares, o agente é um *rapálogo*.

[0342] Em certas modalidades, o *rapálogo* está ligado a e/ou é capaz de ligar-se ao domínio mTOR FRB (domínio de ligação de rapamicina FKBP), é estruturalmente relacionado à rapamicina, e/ou retém as propriedades de inibição de mTORC1 de rapamicina. Em algumas modalidades, o *rapálogo* é um éster, éter, oxima, hidrazona, e/ou uma hidroxilamina de rapamicina, e/ou é um composto em que os grupos funcionais sobre a estrutura do núcleo de rapamicina foram modificados, por exemplo, pela redução ou oxidação. Os sais farmacologicamente aceitáveis de tais compostos são também considerados ser derivados de rapamicina. Exemplos ilustrativos de *rapálogos* adequados para o uso nos métodos contemplados aqui incluem, sem limitação, tensirolimo (CC1779), everolimo (RAD001), deforolimo (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca), e OSI-027 (OSI).

[0343] Em algumas modalidades, o agente é uma molécula que é descrita em PCT Pub. N^{os}: WO2008/051493; WO2008/051494; ou WO2010/062571; e/ou Patente dos Estados Unidos n^{os}: 7.981.893; 8.372.976; 7.968.556; 8.383.634; 8.110.578; ou 8.492.381, todos dos quais são incorporados aqui por referência.

[0344] Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (I):



Fórmula (I)

[0345] em que R¹ é C₁₋₈ alquila, substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

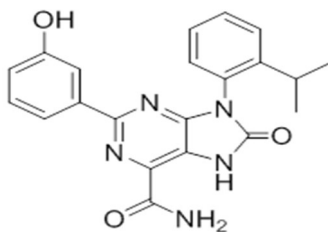
[0346] R² é C₁₋₈ alquila, substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída, e

[0347] R³ e R⁴ são independentemente H ou C₁₋₈ alquila.

[0348] Em algumas modalidades, o agente que inibe mTOR é ou contém um composto de Fórmula (I), ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades, o agente que inibe mTOR é ou contém um composto de Fórmula (I) em que R¹ é arila substituída, heteroarila substituída ou não substituída, tal como fenila substituída. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR é ou contém um composto de Fórmula (I) são aqueles em que R² é arila substituída ou não substituída, tal como fenila substituída ou não substituída. Em modalidades particulares, o agente que inibe mTOR é ou contém um composto de Fórmula (I) em que os grupos que são substituídos são substituídos com um ou mais halogênio; C₁₋₈ alquil; C₂₋₈ alquenila; C₂₋₈ alquinila; hidroxila; C₁₋₈ alcoxila; amino; nitro; tiol; tioéter; imina; ciano; amido; fosfonato; fosfina; carboxila; tiocarbonila; sulfonila; sulfonamida; cetona; aldeído; éster; carbonila; haloalquila; B(OH)₂; cicloalquila carbocíclica, heterocicloalquila, heteroarila ou arila

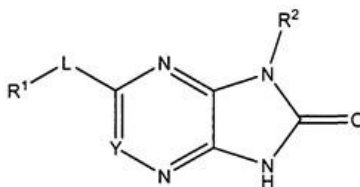
policíclica fundida ou não fundida ou monocíclica; amino; alquila O-inferior; O-arila, arila; alquila aril-inferior; CO₂CH₃; CONH₂; OCH₂CONH₂; NH₂; SO₂NH₂; OCHF₂; CF₃; ou grupos OCF₃, em que cada um destes grupos é opcionalmente substituído.

[0349] Em algumas modalidades, o agente que possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (I) é o Composto 63. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR é o Composto 63. Em alguns aspectos, o Composto 63 é 2-(3-Hidroxifenil)-9-(2-isopropilfenil)-8-oxo-8,9-diidro-7H-purina-6-carboxamida. Em alguns aspectos, o agente que inibe a atividade de mTOR é 2-(3-hidroxifenil)-9-(2-isopropilfenil)-8-oxo-8,9-diidro-7H-purine-6-carboxamida, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo. Em aspectos particulares, o Composto 63 possui a fórmula:



(Composto 63).

[0350] Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (II):



Fórmula (II)

[0351] em que L é uma ligação direta, NH ou O,

[0352] Y é N ou CR³,

[0353] em que R¹ é H, C₁₋₈ alquila, substituída ou não substituída, C₂₋₈ alquenila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila

substituída ou não substituída ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

[0354] R^2 é H, C_{1-8} alquila, substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

[0355] R^3 é H, C_{1-8} alquila, substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquila substituída ou não substituída, $-NHR^4$ ou $-N(R^4)_2$, e

[0356] R^4 é em cada ocorrência independentemente C_{1-8} alquila, substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída.

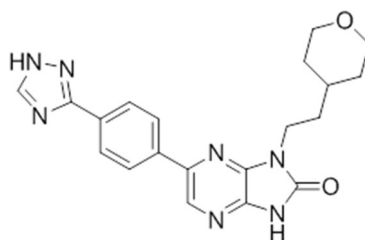
[0357] Em algumas modalidades, o agente que inibe mTOR é ou contém um composto de Fórmula (II), ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo. Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (II) em que R^1 é arila substituída, tal como fenila substituída. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (II) em que Y é CH. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (II) em que L é uma ligação direta. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (II) em que R^1 é arila substituída ou não substituída e R^2 é C_{1-8} alquila substituída por um ou mais substituintes selecionados de alcóxi, amino, hidróxi, cicloalquila, ou heterocicloalquila.

[0358] Em certas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (II) em que

os grupos que são "substituídos ou não substituídos," quando substituídos, eles podem ser substituídos com um ou mais de qualquer substituinte. Exemplos de substituintes são aqueles encontrados nos compostos exemplares e modalidades descritas aqui, bem como halo (por exemplo, cloro, iodo, bromo, ou flúor); C₁₋₈ alquila; C₂₋₈ alquenila; C₂₋₈ alquinila; hidroxila; C₁₋₈ alcoxila; amino; nitro; tiol; tioéter; imina; ciano; amido; fosfonato; fosfina; carboxila; carbamoila; carbamato; acetal; ureia; tiocarbonila; sulfonila; sulfonamida; sulfinila; cetona; aldeído; éster; acetila; acetóxi; oxigênio (=O); haloalquila (por exemplo, trifluorometila); aminoalquila e aminoacila substituída; cicloalquila carbocíclica, a qual pode ser monocíclica ou policíclica fundida ou não fundida (por exemplo, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ou cicloexila), ou uma heterocicloalquila, a qual pode ser monocíclica ou policíclica fundida ou não fundida (por exemplo, pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, morfolinila, furanila, ou tiazinila); carbocíclica ou heterocíclica, arila monocíclica ou policíclica fundida ou não fundida (por exemplo, fenila, naftila, pirrolila, indolila, furanila, tienila, imidazolila, oxazolila, isoxazolila, tiazolila, triazolila, tetrazolila, pirazolila, piridinila, quinolinila, isoquinolinila, acridinila, pirazinila, piridazinila, pirimidinila, benzimidazolila, benzotienila, ou benzofuranila); amino (primário, secundário ou terciário); alquila -O-inferior; -O-arila; arila; alquila aril-inferior; CO₂CH₃; CONH₂; OCH₂CONH₂; NH₂; N(C₁₋₄alquil)₂; NHC(O)C₁₋₄alquila; SO₂NH₂; SO₂C₁₋₄alquila; OCHF₂; CF₃; OCF₃; e tais porções podem ser também opcionalmente substituídas por uma ponte ou estrutura de anel fundido, por exemplo, -OCH₂O- ou alquilenio-O- -O-inferior. Estes substituintes podem opcionalmente ser também substituídos com um substituinte selecionado de tais grupos.

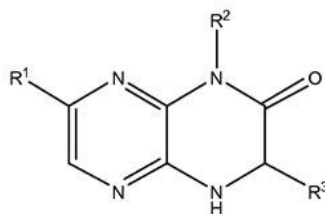
[0359] Em modalidades particulares, o agente que possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (II) é o Composto 155. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR é o

Composto 155. Em alguns aspectos, o Composto 155 é 6-(4-(2H-1,2,4-Triazol-3-il)fenil)-1-(2-(tetra-hidro-2H-piran-4-il)etil)-1H-imidazo [4,5-b]pirazina-2(3H)-ona. Em alguns aspectos, o agente que inibe a atividade de mTOR é 6-(4-(2H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)-1-(2-(tetra-hidro-2H-piran-4-il)etil)-1H-imidazo[4,5-b]pirazina-2(3H)-ona, ou um sal farmacologicamente aceitável ou solvato do mesmo. Em aspectos particulares, o Composto 155 possui a fórmula:



(Composto 155).

[0360] Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (III):



Fórmula (III)

[0361] em que R1 é C1-8 alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, ou heterociclilalquila substituída ou não substituída,

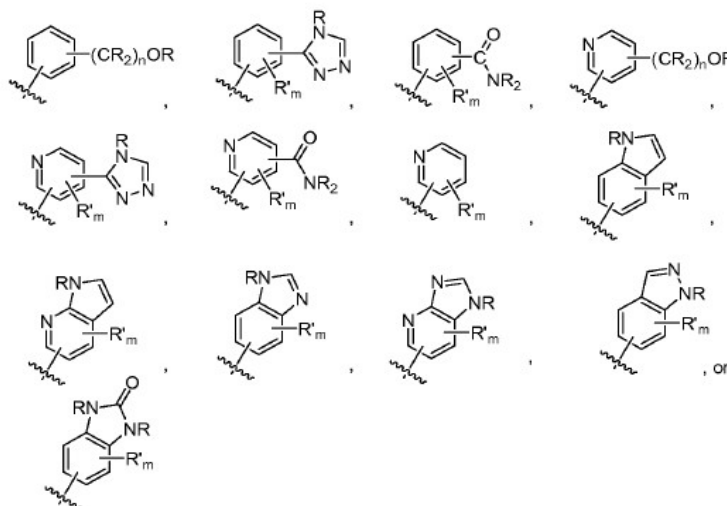
[0362] R2 é H, C1-8 alquila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, heterociclilalquila substituída ou não substituída, substituída ou não substituída aralquila, ou cicloalquilalquila substituída ou não substituída, e

[0363] R3 é H, ou C1-8 alquila substituída ou não substituída.

[0364] Em algumas modalidades, o agente que inibe mTOR é ou

contém um composto de Fórmula (III), ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo. Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (III) em que R¹ é arila substituída ou não substituída ou heteroarila substituída ou não substituída, tal como, por exemplo, R¹ é fenila, piridila, pirimidila, benzimidazolila, 1H-pirrolo[2,3-b]piridila, indazolila, indolila, 1H-imidazo[4,5-b]piridila, 1H-imidazo[4,5-b]piridin-2(3H)-onila, 3H-imidazo[4,5-b]piridila, ou pirazolila, cada qual opcionalmente substituído. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (III) em que R¹ é fenila substituída com um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída (por exemplo, metila), heterociclila substituída ou não substituída (por exemplo, triazolila ou pirazolila substituída ou não substituída), aminocarbonila, halogênio (por exemplo, flúor), ciano, hidroxialquila e hidróxi. Em outras modalidades, R¹ é piridila substituída com um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída (por exemplo, metila), heterociclila substituída ou não substituída (por exemplo, triazolila substituída ou não substituída), halogênio, aminocarbonila, ciano, hidroxialquila (por exemplo, hidroxipropila), -OR, e -NR₂, em que cada R é independentemente H ou C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída. Em algumas modalidades, R¹ é 1H-pirrolo[2,3-b]piridila ou benzimidazolila, opcionalmente substituída por um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, e -NR₂, em que R é independentemente H, ou C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída.

[0365] Em algumas modalidades, o agente que inibe a atividade de mTOR possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (III) em que

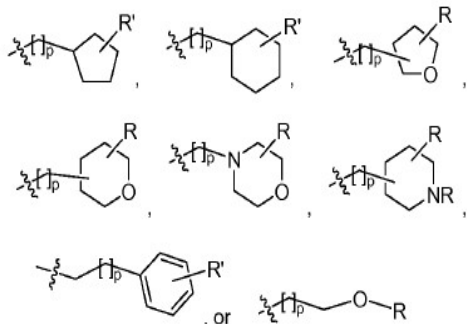
R¹ é

[0366] em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída (por exemplo, metila); R¹ é em cada ocorrência independentemente uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída (por exemplo, metila), halogênio (por exemplo, flúor), ciano, -OR, ou -NR₂; m é 0-3; e n é 0-3. Será entendido que quaisquer dos substituintes R' pode ser ligado a qualquer átomo adequado de qualquer um dos anéis nos sistemas de anel fundido.

[0367] Em algumas modalidades dos compostos da fórmula (III), R² é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, C₁₋₄ alquil-heterociclila substituída ou não substituída, C₁₋₄ alquil-arila substituída ou não substituída, ou C₁₋₄ alquil-cicloalquila substituída ou não substituída. Por exemplo, R² é H, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, sec-butila, isobutila, *terc*-butila, n-pentila, isopentila, ciclopentila, *ciclo-hexila*, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila, (C₁₋₄ alquil)-fenila, (C₁₋₄ alquil)-ciclopropila, (C₁₋₄ alquil)-ciclobutila, (C₁₋₄ alquil)-ciclopentila, (C₁₋₄ alquil)-*ciclo-hexila*, (C₁₋₄ alquil)-pirrolidila, (C₁₋₄ alquil)-piperidila, (C₁₋₄ alquil)-piperazinila, (C₁₋₄ alquil)-morfolinila, (C₁₋₄ alquil)-tetra-hidrofuranila, ou (C₁₋₄ alquil)-tetra-hidropiranila, cada qual

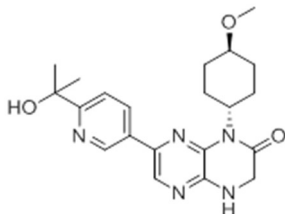
opcionalmente substituído.

[0368] Em certas modalidades, R² é H, C₁₋₄ alquila, (C₁₋₄ alquil)(OR),



[0369] em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, R' é em cada ocorrência independentemente H, -OR, ciano, ou a C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, e p é 0-3.

[0354] Em modalidades particulares, o agente que possui ou inclui a fórmula apresentada na Fórmula (III) é o Composto 246. Em modalidades particulares, o agente que inibe a atividade de mTOR é o Composto 246. Em alguns aspectos, o Composto 246 é 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-((1r,4r)-4-metoxicicloexil)-3,4-diidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona. Em alguns aspectos, o agente que inibe a atividade de mTOR é 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-((1r,4r)-4-metoxicicloexil)-3,4-diidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo. Em aspectos particulares, o Composto 246 possui a fórmula:



Composto 246.

III. MÉTODOS PARA ESTIMULAÇÃO EM LONGO PRAZO

[0355] É fornecido aqui um método de estimulação em longo prazo (também referido aqui como um método para estimulação em longo

prazo) que é útil, entre outras coisas, para avaliar fenótipos, características, ou atividades de uma composição celular, por exemplo, uma composição celular. Em algumas modalidades, método de estimulação em longo prazo é ou inclui incubação de uma composição celular, por exemplo, uma composição de entrada contendo células expressando um receptor recombinante tal como um CAR, sob condições para estimular uma atividade dependente do receptor recombinante (por exemplo, atividade dependente de CAR) nas células. Em tais modalidades, uma atividade dependente do receptor recombinante é uma atividade que é específica para estimulação do receptor recombinante, por exemplo, CAR, tal como por meio da presença de um antígeno ou outro agente reconhecido pelo domínio de ligação ao antígeno do receptor recombinante, por exemplo, CAR, ou que especificamente estimula o receptor recombinante. Em alguns aspectos, a composição celular, por exemplo, a composição de entrada, contém células T expressando um receptor recombinante (por exemplo, um CAR) compreendendo um domínio de ligação ao antígeno extracelular que especificamente se liga a, ou reconhece um antígeno. Em alguns aspectos, a incubação resulta em uma composição de célula T, por exemplo, uma composição de saída, contendo células que exibem aspectos de células cronicamente estimuladas ou de células tendo exposição prolongada ao antígeno.

[0356] Em certas modalidades, as condições para estimular a atividade de um receptor recombinante, por exemplo, uma atividade dependente de CAR, inclui a incubação de uma composição celular, por exemplo, a composição de entrada, com uma molécula de ligação, tal como uma molécula de ligação que se liga, por exemplo, especificamente se liga ao domínio de ligação ao antígeno do receptor recombinante, por exemplo, o CAR. Em certas modalidades, a molécula de ligação é ligada a um suporte. Em modalidades particulares, o

suporte é um suporte sólido, tal como a superfície de uma placa ou prato de cultura celular, uma cavidade em uma microplaca, ou a superfície de uma partícula ou conta. Em alguns aspectos, a incubação ocorre ou é realizada na microplaca, uma placa ou prato de cultura celular, ou cavidade em uma microplaca com moléculas de ligação ligadas à superfície. Em alguns aspectos, a incubação ocorre ou é realizada na presença de várias partículas ou contas que contêm moléculas de ligação. Em certos aspectos, as moléculas de ligação são de superfície ligada às contas ou partículas. Em algumas modalidades, a incubação é realizada ou conduzida *in vitro* ou *ex vivo*.

[0357] Em várias modalidades, as células, por exemplo, células de uma composição de entrada, são incubadas com as moléculas de ligação na presença de um meio sem agentes adicionais que promovem a divisão, crescimento, expansão, ou ativação celular. Em algumas modalidades, as células são incubadas com as partículas durante um período de tempo prolongado. Por exemplo, 14 dias, sem quaisquer manipulações adicionais, por exemplo, mudanças de meio, substituição de conta, ou dividindo ou ressemeando as células. Em certos aspectos, a

[0358] Em alguns aspectos, os métodos de estimulação em longo prazo incluem a incubação de uma composição de entrada, por exemplo, uma composição celular contendo uma composição celular expressando receptor recombinante na presença de uma molécula de ligação que se liga a, ou reconhece o receptor recombinante. Em alguns aspectos, o período de tempo escolhido para a incubação é um tempo no qual uma ou mais funções ou atividades de células da composição exibe aspectos de células cronicamente estimuladas ou células tendo exposição prolongada ao antígeno no término ou final da incubação. Em algumas modalidades, a molécula de ligação é um antígeno (tal como um antígeno recombinante ou fragmento do mesmo) que é ligado por,

ou é reconhecido pelo receptor recombinante. Em certas modalidades, a molécula de ligação é uma anti-ID que se liga a, ou reconhece o receptor recombinante. Em algumas modalidades, tais aspectos podem incluir evidência de reduzida viabilidade, atividade, ou persistência, ou aumentada exaustão ou diferenciação.

[0359] Em certas modalidades, os métodos de estimulação em longo prazo fornecidos aqui são úteis, entre outras coisas, para identificar composições celulares que podem ter aspectos desejáveis quando administrados *in vivo*, tal como uma mantida ou prolongada persistência, viabilidade, ou atividade. Em algumas modalidades, o ensaio é realizado em duas ou mais diferentes composições celulares para identificar diferenças que podem realçar ou prolongar a persistência, atividade, ou viabilidade, ou reduzir a exaustão ou diferenciação. Em algumas modalidades, tais diferenças podem incluir, mas não estão limitadas a, aspectos do processo de fabricação, tal como a presença de agentes durante uma ou mais etapas ou procedimentos de um processo de modificação, por exemplo, agentes que inibem a atividade de mTOR cinase.

[0360] Em modalidades particulares, o método de estimulação em longo prazo é realizado em duas ou mais composições celulares para identificar agentes que aumentam ou mantêm a viabilidade, atividade, ou persistência, ou aumentam ou mantêm a expressão de marcadores, por exemplo, biomarcadores, indicativa de aumentada viabilidade, atividade, ou persistência. Em certas modalidades, o método de estimulação em longo prazo é realizado em duas ou mais composições celulares para identificar diferenças em composições celulares que reduzem ou previnem a exaustão ou diferenciação (por exemplo, tais como diferenciação a um estado senescente), ou reduzem a expressão de marcadores indicativos de aumentada exaustão ou diferenciação. Em algumas modalidades, a molécula de ligação é conjugada ou

anexada a uma superfície sólida, tal como uma superfície de uma placa ou prato de cultura celular. Em modalidades particulares, as moléculas de ligação são conjugadas ou anexadas às partículas, por exemplo, contas.

[0361] Em certas modalidades, os métodos para estimulação em longo prazo são ou incluem etapas para incubação das células na presença de partículas, por exemplo, contas, contendo uma molécula de ligação, por exemplo, uma molécula de ligação que se liga a, ou reconhece o receptor recombinante.

[0362] Em algumas modalidades, a molécula de ligação é um antígeno, por exemplo, um antígeno recombinante ou fragmento do mesmo, que é reconhecido ou ligado pelo receptor recombinante. Em certas modalidades, o antígeno é um polipeptídeo, ou uma porção de um polipeptídeo, que é associado com uma doença, por exemplo, um câncer. Em algumas modalidades, o antígeno é um polipeptídeo, ou uma variante ou fragmento de um polipeptídeo que é expresso sobre a superfície de uma célula que está associada com uma doença, por exemplo, uma célula de câncer e/ou uma célula de tumor.

[0363] Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui $\alpha\beta 6$ integrina (avb6 integrina), antígeno de maturação de célula B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase 9 carbônica (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de testículo de câncer, câncer / antígeno de testículos 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembriônico (CEA), uma ciclina, ciclina A2, Ligante 1 de Quimiocina de Motif C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína de fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação de receptor de fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR VIII), glicoproteína 2 epitelial (EPG-2), glicoproteína 40 epitelial (EPG-40),

efrinaB2, receptor A2 de efrina (EPHa2), receptor de estrogênio, Receptor Fc como 5 (FCRL5; também conhecido como Homólogo 5 de receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), uma proteína de ligação de folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glicoproteína-3 (GPC3), Receptor 5D Acoplado à Proteína G (GPRC5D), Her2/neu (erb-B2 de tirosina cinase receptora), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, Antígeno associado com melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície de hepatite B, Antígeno A1 de leucócito humano (HLA-A1), Antígeno A2 de leucócito humano (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 kappa, Molécula de adesão de célula L1 (L1-CAM), Epítipo CE7 de L1-CAM, Membro A da Família 8 Contendo Repetição Rica em Leucina (LRRC8A), Lewis Y, Antígeno associado com 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 de grupo 2 exterminador natural (NKG2D), melano A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico da próstata, antígeno de célula tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), Receptor 1 Órfão Tipo Tirosina Cinase Receptora (ROR1), survivina, Glicoproteína de trofoblasto (TPBG também conhecido como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), Proteína 1 relacionada com tirosinase (TRP1, também conhecido como TYRP1 ou gp75), Proteína 2 relacionada com tirosinase (TRP2, também conhecido como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor de fator de

crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico do patógeno ou expresso pelo patógeno, ou um antígeno associado com um marcador universal, e/ou moléculas biotiniladas, e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados com uma malignidade de célula B, tais como qualquer de diversos marcadores de célula B conhecidos. Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30. Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui recombinant BCMA, CD19, CD22, ou ROR1.

[0364] Em algumas modalidades, o anti-ID é um anticorpo anti-idiotipo ou fragmento de ligação ao antígeno que especificamente reconhece um anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, scFv) que é parte do domínio de ligação ao antígeno extracelular do receptor recombinante. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno do receptor recombinante contém um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, scFv) que se liga a um antígeno alvo, tal como um antígeno alvo associado com ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença ou condição, por exemplo, câncer. Em algumas modalidades, o anti-ID é um anticorpo anti-idiotipo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente reconhece um anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga à $\alpha\beta 6$ integrina (avb6 integrina), antígeno de maturação de célula B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase 9 carbônica (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de testículos de câncer, câncer / antígeno de testículos 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembrionário (CEA), uma ciclina, ciclina A2, Ligante 1 de Quimiocina de Motif C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44,

CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína de fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação de receptor de fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína 2 epitelial (EPG-2), glicoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrinaB2, receptor A2 de efrina (EPHa2), receptor de estrogênio, Fc receptor like 5 (FCRL5; também conhecido como Homólogo 5 de receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), uma proteína de ligação de folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glipican-3 (GPC3), Receptor 5D Acoplado à Proteína G (GPRC5D), Her2/neu (erb-B2 de tirosina cinase receptora), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, Antígeno associado com melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície de hepatite B, Antígeno A1 de leucócito humano (HLA-A1), Antígeno A2 de leucócito humano (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 kappa, Molécula de adesão de célula L1 (L1-CAM), Epítipo CE7 de L1-CAM, Membro A da Família 8 Contendo Repetição Rica em Leucina (LRRC8A), Lewis Y, Antígeno associado com 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 de grupo 2 exterminador natural (NKG2D), melano A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico da próstata, antígeno de célula tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), Receptor 1 Órfão Tipo Tirosina Cinase Receptora (ROR1), survivina, Glicoproteína de trofoblasto (TPBG também conhecido como 5T4), glicoproteína 72

associada a tumor (TAG72), Proteína 1 relacionada com tirosinase (TRP1, também conhecido como TYRP1 ou gp75), Proteína 2 relacionada com tirosinase (TRP2, também conhecido como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico do patógeno ou expresso pelo patógeno, ou um antígeno associado com um marcador universal, e/ou moléculas biotinizadas, e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados com uma malignidade de célula B, tais como qualquer de diversos marcadores de célula B conhecidos. Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30. Em algumas modalidades, o anti-ID liga-se ao domínio de ligação ao antígeno de um CAR anti-CD19.

[0365] Em algumas modalidades, a partícula (por exemplo, conta) reage em um campo magnético. Em algumas modalidades, a partícula é uma partícula magnética (por exemplo, uma conta magnética). Em algumas modalidades, a partícula magnética é paramagnética. Em modalidades particulares, a partícula magnética é superparamagnética. Em certas modalidades, as partículas, por exemplo, contas, não exibem quaisquer propriedades magnéticas a menos que elas sejam expostas a um campo magnético. Em algumas modalidades, as partículas ou contas têm um diâmetro de entre ou entre cerca de 1 μM e 10 μm , inclusive. Em modalidades particulares, as partículas, por exemplo, contas, têm um diâmetro médio de, ou de cerca de 2,8 μm . Em algumas modalidades, as partículas, por exemplo, contas, têm um diâmetro de, ou de cerca de 4,8 μm .

[0366] Em modalidades particulares, as células da composição de

entrada de células são incubadas com a molécula de ligação, por exemplo, partículas ou contas que contêm a molécula de ligação, durante, durante cerca de, ou durante pelo menos 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias, 18 dias, 19 dias, 20 dias, ou 21 dias. Em várias modalidades, as células ou composições de células são incubadas com a molécula de ligação, por exemplo, partículas ou contas que contêm a molécula de ligação, durante entre ou entre cerca de 10 dias e 21 dias, 12 dias e 18 dias, ou 14 dias e 16 dias, inclusive. Em certas modalidades, as células são incubadas com a molécula de ligação, por exemplo, partículas ou contas que contêm a molécula de ligação, durante, durante cerca de, ou durante pelo menos 14 dias. Em modalidades particulares, as células da composição celular são incubadas com a molécula de ligação, por exemplo, partículas ou contas que contêm a molécula de ligação, em temperaturas maiores do que a temperatura ambiente. Em algumas modalidades, a incubação é realizada em uma temperatura maior do que cerca de 25°C, tal como geralmente maior do que ou maior do que cerca de 32 °C, 35 °C ou 37 °C. Em algumas modalidades, o tratamento, contato, ou incubação é realizado em uma temperatura de, ou cerca de 37 °C ± 2 °C, tal como em uma temperatura de, ou cerca de 37°C.

[0367] Em algumas modalidades, as células são incubadas com a molécula de ligação, por exemplo, com partículas ou contas contendo as moléculas de ligação na presença de um meio sem agentes adicionais que promovam a divisão, crescimento, expansão, ou ativação celular, por exemplo, de célula T. Em algumas modalidades, as células são incubadas com as moléculas de ligação na ausência de quaisquer citocinas recombinantes. Em certas modalidades, a incubação é realizada continuamente sem interrupção. Em certas modalidades, a incubação ocorre sob condições estáticas. Em modalidades particulares, a incubação ocorre sem qualquer perfusão, mistura,

balanço, ou agitação. Em alguns aspectos, as moléculas de ligação estão presentes durante toda a duração da incubação. Em certas modalidades, as moléculas de ligação não são mudadas ou substituídas durante a incubação. Modalidades particulares contemplam que uma vez que, em alguns aspectos, o meio não contém quaisquer citocinas recombinantes, e as citocinas presentes no meio durante a incubação teriam sido produzidas pelas células, por exemplo, em resposta a uma interação entre o receptor recombinante da célula e a molécula de ligação de uma partícula.

[0368] Em algumas modalidades, a quantidade de moléculas de ligação, por exemplo, a quantidade de partículas ou contas contendo moléculas de ligação, é suficiente para fornecer entre ou entre cerca de 1 molécula de ligação e 10^{12} moléculas de ligação por célula, tal como entre ou entre cerca de 10^2 moléculas de ligação e 10^{10} moléculas de ligação, 10^3 moléculas de ligação e 10^8 moléculas de ligação, 10^4 moléculas de ligação e 10^6 moléculas de ligação, 1 molécula de ligação a 10^2 moléculas de ligação, entre 10^2 moléculas de ligação e 10^3 moléculas de ligação, 10^3 moléculas de ligação e 10^4 moléculas de ligação, 10^4 moléculas de ligação e 10^5 moléculas de ligação, 10^5 moléculas de ligação e 10^6 moléculas de ligação, 10^5 moléculas de ligação e 10^6 moléculas de ligação, 10^6 moléculas de ligação e 10^7 moléculas de ligação, 10^7 moléculas de ligação e 10^8 moléculas de ligação, ou 10^9 moléculas de ligação e 10^{10} moléculas de ligação, inclusive. Em algumas modalidades, a quantidade de moléculas de ligação, por exemplo, a quantidade de partículas ou contas contendo moléculas de ligação, é uma quantidade suficiente para fornecer entre 10^4 moléculas de ligação e cerca de 10^6 moléculas de ligação, inclusive, para cada célula. Em algumas modalidades, a quantidade de partículas, por exemplo, contas, contém cerca de 10^5 moléculas de ligação para cada célula.

[0369] Em algumas modalidades, a composição de entrada é incubada com as partículas, por exemplo, contas, contendo uma molécula de ligação em uma relação de células totais para partículas, por exemplo, contas, entre ou entre cerca de 10:1 e 1:10, 5:1 e 1:5, 3:1 e 1:3, ou 2:1 e 1:2, cada inclusive. Em modalidades particulares, a relação é, ou é entre ou entre cerca de 1:0,2 e 1:5, inclusive. Em algumas modalidades, a relação de células totais da composição de entrada para partículas, por exemplo, contas, é de cerca de 1:1.

[0370] Em algumas modalidades, os ensaios fornecidos podem ser usados para comparar diferentes células ou composições celulares. Por exemplo, em algumas modalidades, duas ou mais composições celulares que contêm cada qual células expressando o mesmo receptor recombinante, por exemplo, um mesmo CAR, podem ser comparados incubando as células com as mesmas moléculas de ligação, por exemplo, partículas ou contas contendo as mesmas moléculas de ligação, que se ligam a, ou reconhecem o receptor recombinante. Em certas modalidades, as duas ou mais composições celulares são geradas na presença de diferentes agentes, por exemplo, agentes que inibem a atividade de mTOR cinase. Em modalidades particulares, as composições celulares podem ser comparadas a uma composição celular de controle ou referência. Em alguns aspectos, as composições celulares de controle ou referência podem incluir, mas não estão limitadas a, composições celulares que não passam por qualquer incubação, composições celulares que não são incubadas na presença de partículas, por exemplo, contas, contendo uma molécula de ligação, composições celulares que não contêm células expressando o receptor recombinante, composições celulares que são geradas por um diferente processo de modificação, e/ou composições celulares que são modificadas na presença de um veículo ou composto de controle.

[0371] Em modalidades particulares, duas ou mais composições

celulas que contêm cada qual células expressando os diferentes receptores recombinantes, por exemplo, diferentes CARs, podem ser comparadas incubando as células com moléculas de ligação, tais como com partículas, por exemplo, contas, contendo diferentes moléculas de ligação que se ligam a, ou reconhecem os diferentes receptores recombinantes.

[0372] Em algumas modalidades, as células são avaliadas em diferentes momentos durante a incubação. Por exemplo, em alguns aspectos, um fenótipo, característica, ou atividade de células de uma ou mais composições celulares são avaliadas em um momento intermediário, tal como um momento que ocorra em, ou cerca de, ou pelo menos a 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, de conclusão da incubação. Em certas modalidades, as células são avaliadas uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, sete vezes, oito vezes, nove vezes, dez vezes ou mais de dez vezes durante a incubação. Em certas modalidades, as células são avaliadas após diferentes intervalos durante a incubação, tais como intervalo de, de cerca de, ou de pelo menos 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, ou 8 dias. Em algumas modalidades, as células são avaliadas todos os dias. Em algumas modalidades, as células são avaliadas a cada três dias. Em certas modalidades, as células são avaliadas a cada 7 dias.

[0373] Em certas modalidades, as células, por exemplo, células da composição de saída, são avaliadas quanto a uma atividade, por exemplo, uma atividade estimulada por antígeno, um fenótipo, ou uma característica. Em algumas modalidades, a atividade estimulada por antígeno é avaliada em células de composições celulares durante ou após o método para longa estimulação, por exemplo, durante ou após a incubação com partículas, por exemplo, contas, contendo moléculas de

ligação. Em modalidades particulares, os resultados da avaliação são comparados a uma avaliação da mesma ou uma similar atividade medida em células de uma diferente composição celular, por exemplo, uma composição celular de controle ou de referência.

[0374] Em algumas modalidades, a atividade é uma atividade estimulada por antígeno. Modalidades particulares contemplam que a atividade estimulada por antígeno de células, tais como células T expressando um receptor recombinante, podem ser avaliadas por qualquer uma dentre várias técnicas adequadas conhecidas. Em algumas modalidades, a produção de uma ou mais citocinas é medida, detectada, e/ou quantificada por manchamento de citocina intracelular. Em alguns aspectos, manchamento de citocina intracelular (ICS) por citometria de fluxo é uma técnica bem adequada para estudar a produção de citocina no nível de única célula. Em certos aspectos, ICS é útil para detectar a produção e acúmulo de citocinas dentro do retículo endoplásmico após estimulação celular, tal como com uma célula expressando o antígeno ou uma partícula, por exemplo, uma partícula da conta, com um antígeno conjugado, permitindo a identificação de populações celulares que são positivas ou negativas para a produção de uma citocina particular ou para a separação de células de alta produção e baixa produção com base em um limiar. ICS pode também ser usado em combinação com outros protocolos de citometria de fluxo para imunofenotipagem usando marcadores de superfície celular, por exemplo, CD4 ou CD8, para avaliar a produção de citocina em um subgrupo particular de células. Outras técnicas de única célula para medir ou detectar a produção de citocina incluem, mas não estão limitadas a ELISPOT, limitação da diluição, e clonagem de célula T.

[0375] Em algumas modalidades, a atividade estimulada por antígeno é a produção de uma ou mais citocinas. Citocinas que podem ser produzidas em resposta à estimulação do antígeno podem incluir,

mas não estão limitadas a, IL-1, IL-1 β , IL-2, sIL-2Ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL 27, IL-33, IL-35, TNF, TNF alfa, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5, CCL17, CCL24, PGD2, LTB4, interferon gama (IFN- γ), fator de estimulação de colônias de macrófago de granulócito (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1a, MIP-1b, Flt-3L, fraquitilquina, e/ou IL-5. Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais citocinas são ou incluem uma ou mais de IL-2, IFN-gama, ou TNF-alfa. Em algumas modalidades, secreção de citocina é avaliada medindo, detectando, ou quantificando a quantidade ou concentração de citocinas extracelulares após uma cocultura com células expressando antígeno ou após uma incubação de partículas, por exemplo, contendo antígeno ou fragmentos de antígeno ligados.

[0376] Em modalidades particulares, a atividade estimulada por antígeno é atividade citolítica (citotóxica). Em algumas modalidades, atividade citolítica é avaliada expondo, incubando, e/ou contactando as células da composição, por exemplo, células expressando o receptor recombinante, com uma célula alvo que expressa o antígeno ou um epítipo que é reconhecido pelo receptor recombinante. A atividade citolítica pode ser avaliada direta ou indiretamente medindo o número de células alvo ao longo do tempo. Por exemplo, uma célula alvo pode ser incubada com um marcador detectável antes de ser incubada com células expressando receptor recombinante, tal como um marcador que é detectável quando uma célula alvo é lisada, ou um marcador detectável que é apenas detectável em células alvo viáveis. Estes fornecem leituras direta ou indireta de número de células alvo e/ou morte de célula alvo, e podem ser medidos em diferentes momentos durante o ensaio. Uma redução do número de células alvo e/ou um aumento de morte de célula alvo indicam a atividade citolítica das células. Métodos adequados para realizar ensaios citolíticos são conhecidos na técnica, e incluem, mas não estão limitados a saios de

liberação de cromo-51, ensaios de cromo não radioativo, ensaios citométricos de fluxo que usam corantes fluorescentes tais como carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE), PKH-2, e PKH-26.

[0377] Em certas modalidades, as células, por exemplo, células expressando o receptor recombinante, da composição celular são avaliadas quanto a uma ou mais características ou fenótipos durante ou após o ensaio, por exemplo, durante ou após uma incubação com partículas, por exemplo, contendo um receptor de ligação. Em algumas modalidades, as referidas uma ou mais características ou fenótipos são ou se referem a uma ou mais dentre ativação, exaustão, ou diferenciação. Em certas modalidades, os referidos um ou mais fenótipos ou características são avaliados medindo, detectando, ou quantificando a presença, ausência, quantidade, ou nível de um ou mais marcadores, por exemplo, biomarcadores.

[0378] Em algumas modalidades, a expressão de um marcador, por exemplo, um marcador que é positivamente ou negativamente associado com ativação, exaustão, ou diferenciação, é ou inclui avaliar, medir, determinar, e/ou quantificar um nível, quantidade, ou concentração de um marcador na amostra. Em certas modalidades, o marcador é um produto de gene, por exemplo, qualquer biomolécula que é montada, gerada, e/ou sintetizada com informação codificada por um gene, e pode incluir polinucleotídeos e/ou polipeptídeos. Em certas modalidades, o nível, quantidade, ou concentração do marcador pode ser transformado (por exemplo, normalizado) ou diretamente analisado (por exemplo, em estado natural). Em algumas modalidades, o marcador é uma proteína. Em certas modalidades, o marcador é um polinucleotídeo, por exemplo, um mRNA ou uma proteína, que é codificada pelo gene.

[0379] Em modalidades particulares, a quantidade ou nível de um marcador que é um polinucleotídeo pode ser avaliado, medido,

determinado, e/ou quantificado por qualquer método conhecido adequado. Por exemplo, em algumas modalidades, a quantidade ou nível de um marcador de polinucleotídeo pode ser avaliado, medido, determinado, e/ou quantificado por reação de cadeia de polimerase (PCR), incluindo PCR de transcriptase reversa (rt), PCR digital de gotículas, métodos de PCR em tempo real e quantitativa (incluindo, por exemplo, TAQMAN®, farol molecular, LIGHTUP™, SCORPION™, SIMPLEPROBES®; Veja, por exemplo, Patentes Norteamericanas Nos.5.538.848; 5.925.517; 6.174.670; 6.329.144; 6.326.145 e 6.635.427); *Northern Blotting*; *Southern Blotting*, por exemplo, de produtos de transcrição reversa e derivados; métodos com base na disposição, incluindo disposições plotadas, microdisposições, ou disposições sintetizadas *in situ*; e sequenciamento, por exemplo, sequenciamento por síntese, pirosequenciamento, sequenciamento de dideoxi, ou sequenciamento por ligação, ou quaisquer outros métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Shendure *et al.*, Nat. Rev. Genet. 5:335-44 (2004) or Nowrousian, Euk. Cell 9(9): 1300-1310 (2010), incluindo tais plataformas específicas como HELICOS®, ROCHE® 454, ILLUMINA®/SOLEXA®, ABI SOLiD®, e POLONATOR® sequenciamento. Em modalidades particulares, os níveis de produtos de gene de ácido nucleico são medidos por qRT-PCR. Em algumas modalidades, a qRT-PCR usa três conjuntos de ácido nucleico para cada gene, onde os três ácidos nucleicos compreendem um par iniciador juntamente com uma sonda que se liga entre as regiões de um ácido nucleico alvo onde os iniciadores se ligam — conhecidos comercialmente como um ensaio TAQMAN®.

[0380] Em modalidades particulares, a expressão de dois ou mais marcadores de polinucleotídeo é medida ou avaliada simultaneamente. Em certas modalidades, um PCR multiplex, por exemplo, um rt-PCR multiplex avalia, mede, determina, e/ou quantifica o nível, quantidade,

ou concentração de dois ou mais produtos de gene. Em algumas modalidades, microdisposições (por exemplo, AFFYMETRIX®, AGILENT® e ILLUMINA®-style arrays) são usados para avaliar, medir, determinar, e/ou quantificar o nível, quantidade, ou concentração de dois ou mais produtos de gene. Em algumas modalidades, microdisposições são usadas para avaliar, medir, determinar, e/ou quantificar o nível, quantidade, ou concentração de um polinucleotídeo de cDNA que é derivado de um produto de gene de RNA.

[0381] Em algumas modalidades, a expressão de um ou mais marcadores de polinucleotídeo é determinada por sequenciamento um mRNA marcador ou um polinucleotídeo de cDNA que é derivado do mRNA marcador. Em algumas modalidades, o sequenciamento é realizado por um método de sequenciamento não-Sanger e/ou uma técnica de sequenciamento de próxima geração. Exemplos de técnicas de Sequenciamento de Próxima Geração incluem, mas não estão limitados a Sequenciamento de Assinatura Massivamente Paralela (MPSS), Sequenciamento Polony, Pirosequenciamento, Sequenciamento de terminador de corante reversível, Sequenciamento SOLiD, Sequenciamento semicondutor de íon, Sequenciamento de nanobolas de DNA, Sequenciamento de molécula de único helioscópico, Sequenciamento em tempo real de única molécula (SMRT), Sequenciamento em tempo real de única molécula (RNAP), e Sequenciamento de DNA Nanopore.

[0382] Em modalidades particulares, o marcador é uma proteína ou fragmento da mesma. Em certas modalidades, um ou mais marcadores de proteína são medidos por quaisquer métodos adequados conhecidos na técnica. Métodos adequados para avaliar, medir, determinar, e/ou quantificar o nível, quantidade, ou concentração de um ou mais marcadores de proteína incluem, mas não estão limitados a, detecção com imunoenaios, técnicas de aptâmero com base em ácido nucleico

ou com base em proteína, HPLC (cromatografia líquida de alta precisão), sequenciamento de peptídeo (tal como sequenciamento de degradação Edman ou espectrometria de massa (tal como MS/MS), opcionalmente acoplado a HPLC), e adaptações de microdisposição de qualquer um dos anteriores (incluindo disposições de ácido nucleico, anticorpo ou proteína-proteína (isto é, não anticorpo)). Em algumas modalidades, o imunoenensaio é ou inclui métodos ou ensaios que detectam proteínas com base em uma reação imunológica, por exemplo, por detecção da ligação de um anticorpo ou fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno a um produto de gene. Imunoensaios incluem, mas não estão limitados a, imuno-histoquímica ou imunocitoquímica quantitativa, ELISA (incluindo ELISAs diretos, indiretos, sanduíche, competitivos, múltiplos e portáteis (veja, por exemplo, Patente Norteamericana No. 7.510.687), *Western Blotting* (incluindo um, dois ou mais manchamentos dimensionais ou outros métodos cromatográficos, opcionalmente incluindo sequenciamento de peptídeo), imunoenensaio de enzima (EIA), RIA (radioimunoensaio), e SPR (ressonância de plasmônio de superfície).

[0383] Em algumas modalidades, o marcador de proteína é medido, detectado, ou quantificado por citometria de fluxo. Em alguns aspectos, a citometria de fluxo é uma tecnologia com base em laser ou impedância, biofísica empregada em detecção de marcador suspendendo as células em uma corrente de fluido e passando-as através de um aparato de detecção eletrônico. Marcadores presentes nas células podem ser marcados, tais como com um anticorpo marcado com fluorescência para detecção por citometria de fluxo. Em alguns aspectos, a citometria de fluxo é empregada para medir, detectar, ou quantificar a presença, ausência, quantidade, ou nível de um marcador presente em uma população celular. Em alguns aspectos a população celular pode ser o tal ou total viável de células da composição celular ou

de um subconjunto de células da composição celular, por exemplo, células positivas para o receptor recombinante, células T CD4+, ou células T CD8+.

[0384] Em modalidades particulares, o marcador é positivamente associado ou correlacionado com ativação ou um estado semelhante à ativação. Em algumas modalidades, o marcador é ou inclui CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD71, CD154, CD40L, CD127, LAG3, ou Ki67. Em algumas modalidades, o marcador é positivamente associado ou correlacionado com exaustão ou uma condição relacionada com a exaustão. Em modalidades particulares, o marcador é ou inclui um ou mais de CTLA-4, FOXP3, PD-1, TIGIT, LAB-3, 2B4, BTLA, TIM3, VISTA, ou CD96. Em algumas modalidades, o biomarcador é associado com diferenciação de uma célula T. Em modalidades particulares, o marcador é ou inclui um ou mais de CD25, CD45RO, CD56, KLRG1, CD95 e/ou um ou mais de CD45RA, CD27, CD28, CD62L, e CCR7. Em algumas modalidades, células, por exemplo, células da composição de saída, são avaliadas para células com superfície positiva para um marcador de ativação de célula T selecionado do grupo que consiste em CD45RA, CD27, CD28, CD62L, e CCR7; e/ou que são de superfície negativa para um marcador selecionado do grupo que consiste em CD25, CD45RO, CD56, KLRG1; e/ou tem baixa expressão de CD95; e/ou são negativas para expressão intracelular de uma citocina selecionada do grupo que consiste em IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10. Em algumas a composição de saída é avaliada quanto às células que são CD45RA+, CD27+, CCR7+, e/ou CD45RO-.

[0385] Em algumas modalidades, as células de uma composição celular de saída exibem aspectos de células que foram submetidas à estimulação prolongada ou crônica após o método de estimulação em longo prazo, por exemplo, após uma incubação com as partículas, por exemplo, contas, contendo uma molécula de ligação. Em algumas

modalidades, as células expressando o receptor recombinante de uma composição celular, por exemplo, uma composição celular de referência ou de controle, exibe aspectos de células que foram submetidas à estimulação prolongada ou crônica após o ensaio, por exemplo, após uma incubação com as partículas, por exemplo, contendo uma molécula de ligação.

IV. RECEPTORES RECOMBINANTES

[0386] Em algumas modalidades, as células que são tratadas, processadas, modificadas, e/ou produzidas pelos métodos fornecidos aqui contêm ou expressam, ou são modificadas para conter ou expressar, uma proteína recombinante, tal como um receptor recombinante, por exemplo, um receptor de antígeno quimérico (CAR), ou um receptor de célula T (TCR). Em certas modalidades, os métodos fornecidos aqui 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 modalidades, células T CD4+, ou populações ou composições de células T CD4+, são tratadas, processadas, modificadas, e/ou produzidas.

[0387] Em algumas modalidades, as células incluem uma ou mais ácidos nucleicos introduzidos por meio de modificação genética, e desse modo expressam produtos recombinantes ou geneticamente modificados de tais ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, transferência de gene é realizada primeiro estimulando as células, tal como combinando as mesmas 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 cultura para números suficientes para aplicações clínicas.

[0388] As células geralmente expressam receptores

recombinantes, tais como receptores de antígeno incluindo receptores de antígeno não TCR funcionais, por exemplo, receptores de antígeno quiméricos (CARs), e outros receptores de ligação ao antígeno tais como receptores de célula T transgênicos (TCRs). Também entre os receptores estão outros receptores quiméricos

A. Receptores de antígeno quiméricos

[0389] Em algumas modalidades dos métodos e usos fornecidos, receptores quiméricos, tal como um receptor de antígeno quimérico, contém um ou mais domínios que combinam um domínio de ligação ao ligante (por exemplo, anticorpo ou fragmento de anticorpo) que fornece especificidade para um antígeno desejado (por exemplo, antígeno de tumor) com domínios de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular é uma porção de domínio intracelular de ativação, tal como um domínio de ativação de célula T, fornecendo um sinal de ativação primária. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular contém ou adicionalmente contém um domínio de sinalização coestimulatória para facilitar funções efetoras. Em algumas modalidades, receptores quiméricos quando geneticamente modificados em células imunes podem modular atividade de célula T, e, em alguns casos, podem modular diferenciação de célula T ou homeostase, desse modo resultando em células geneticamente modificadas com longevidade melhorada, sobrevivência e/ou persistência *in vivo*, tal como para uso em métodos de terapia celular adotiva.

[0390] Receptores de antígeno exemplares, incluindo CARs, e métodos para modificar e introduzir tais receptores em células, incluem aqueles descritos, por exemplo, em Publicações de Pedido de Patente Internacional Números WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, Publicações de Pedido de Patente

Norteamericana Números US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patentes Norteamericanas 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 Abril; 3(4): 388–398; Davila *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 Outubro; 24(5): 633-39; Wu *et al.*, *Cancer*, 2012 Março 18(2): 160-75. Em alguns aspectos, os receptores de antígeno incluem um CAR como descrito na Patente Norteamericana No. 7.446.190, e aqueles descritos no Pedido de Patente Internacional Publicação No. WO/2014055668 A1. Exemplos dos CARs incluem CARs como divulgado em qualquer uma das publicações acima mencionadas, tais como WO2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente Norteamericana No. 7.446.190, Patente Norteamericana 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 WO 2014031687, US 8.339.645, US 7.446.179, US 2013/0149337, Patente Norteamericana No. 7.446.190, e Patente Norteamericana No. 8.389.282.

[0391] Os receptores quiméricos, tais como CARs, geralmente incluem um domínio de ligação ao antígeno extracelular, tal como uma porção de uma molécula de anticorpo, geralmente uma região de cadeia pesada variável (VH) e/ou região de cadeia leve variável (VL) do anticorpo, por exemplo, um fragmento scFv de anticorpo.

[0392] Em algumas modalidades, o antígeno direcionado pelo receptor é um polipeptídeo. Em algumas modalidades, ele é um carboidrato ou outra molécula. Em algumas modalidades, o antígeno é seletivamente expresso ou superexpresso em células da doença ou

condição, por exemplo, o tumor ou células patogênicas, quando comparado a células ou tecidos normais ou não direcionadas. Em outras modalidades, o antígeno é expresso em células normais e/ou é expresso nas células modificadas.

[0393] Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui $\alpha\beta 6$ integrina ($\alpha\beta 6$ integrina), antígeno de maturação de célula B (BCMA), B7-H3, B7-H6, anidrase 9 carbônica (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de testículos de câncer, câncer / antígeno de testículos 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembriônico (CEA), uma ciclina, ciclina A2, Ligante 1 de Quimiocina de *Motif C-C* (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), proteína de fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutação de receptor de fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR VIII), glicoproteína 2 epitelial (EPG-2), glicoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrinaB2, receptor A2 de efrina (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como Homólogo 5 de receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), uma proteína de ligação de folato (FBP), receptor alfa de folato, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), glicoproteína-3 (GPC3), Receptor 5D Acoplado à Proteína G (GPRC5D), Her2/neu (erb-B2 de tirosina cinase receptora), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, Antígeno associado com melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície de hepatite B, Antígeno A1 de leucócito humano (HLA-A1), Antígeno A2 de leucócito humano (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 kappa, Molécula de adesão de célula L1 (L1-CAM), Epítopo CE7 de L1-CAM, Membro A da Família 8 contendo Repetição

Rica em Leucina (LRRC8A), Lewis Y, Antígeno associado com 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 de grupo 2 exterminador natural (NKG2D), melano A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico da próstata, antígeno de célula tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), Receptor 1 Órfão Tipo Tirosina Cinase Receptora (ROR1), survivina, Glicoproteína de trofoblasto (TPBG também conhecido como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), Proteína 1 relacionada com tirosinase (TRP1, também conhecido como TYRP1 ou gp75), Proteína 2 relacionada com tirosinase (TRP2, também conhecido como dopacromo tautomerase, dopacromo delta-isomerase ou DCT), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico do patógeno ou expresso pelo patógeno, ou um antígeno associado com um marcador universal, e/ou moléculas biotinizadas, e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados com uma malignidade de célula B, tal como qualquer de diversos marcadores de célula B conhecidos. Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30.

[0394] Em algumas modalidades, o antígeno é ou inclui a antígeno específico de patógeno ou expresso por patógeno. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno viral (tal como um antígeno viral de HIV, HCV, HBV, etc.), antígenos bacterianos, e/ou antígenos

parasitários. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados com uma malignidade de célula B, tais como qualquer de diversos marcadores de célula B conhecidos. Em algumas modalidades, o antígeno direcionado pelo receptor é CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Iggkappa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30.

[0395] Em algumas modalidades, o antígeno ou domínio de ligação ao antígeno é CD19. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e um VL derivada de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD19. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a CD19 é um anticorpo derivado de camundongo tal como FMC63 e SJ25C1. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo humano, por exemplo, como descrito em Publicação de Patente Norteamericana no. US 2016/0152723.

[0396] O termo “anticorpo” aqui é usado no sentido mais amplo e inclui anticorpos policlonais e monoclonais, incluindo anticorpos intactos e fragmentos de anticorpo funcional (ligação ao antígeno), incluindo fragmentos de ligação ao antígeno (Fab), fragmentos de F(ab')₂, fragmentos de Fab', fragmentos de Fv, fragmentos de IgG recombinante IgG (rIgG), regiões variáveis de cadeia pesada (V_H) capazes de se ligar especificamente ao antígeno, fragmentos de anticorpo de cadeia simples, incluindo fragmentos variáveis de cadeia simples (scFv), e fragmentos de anticorpos de domínio simples (por exemplo, sdAb, sdFv, nanocorpo). O termo engloba formas geneticamente modificadas e/ou de outro modo modificadas de imunoglobulinas, tais como intracorpos, pepticorpos, anticorpos quiméricos, anticorpos totalmente humanos, anticorpos humanizados, e anticorpos heteroconjugados, multispecíficos, por exemplo, biespecíficos ou triespecíficos, anticorpos, diacorpos, triacorpos, e tetracorpos, di-scFv tandem, tri-scFv tandem. A

menos de que de outro modo indicado, O termo “anticorpo” deve ser entendido como englobando fragmentos de anticorpos funcionais dos mesmos também referidos aqui como “fragmentos de ligação ao antígeno.” O termo também engloba anticorpos intactos ou de tamanho natural, incluindo anticorpos de qualquer classe ou subclasse, incluindo IgG e sub-classes dos mesmos, IgM, IgE, IgA, e IgD.

[0397] Os termos “região de determinação de complementariedade,” e “CDR,” sinônimo de “região hipervariável” ou “HVR,” são conhecidos por se referirem às sequências não contíguas de aminoácidos dentro das regiões variáveis de anticorpo, que conferem especificidade de antígeno e/ou afinidade de ligação. Em geral, existem três CDRs em cada região variável de cadeia pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) e três CDRs em cada região variável de cadeia leve (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). “Regiões de estrutura” e “FR” são conhecidos 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).

[0398] Os limites precisos da sequência de aminoácidos de uma determinada CDR ou FR podem prontamente ser determinados usando qualquer um de vários esquemas bem conhecidos, incluindo aqueles 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 e binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745.” (Esquema de numeração “Contact”); Lefranc MP *et al.*, “IMGT unique numbering for immunoglobulin e T cell receptor variavel

domains e Ig superfamily V-like domains,” *Dev Comp Immunol*, 2003 Jan; 27(1): 55-77 (esquema de numeração “IMGT”); Honegger A e Plückthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin domínio variáveis: 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”).

[0399] 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 informação estrutural. Numeração para ambos os esquemas Kabat e Chothia é baseada nos mais comuns tamanhos de sequência de região de anticorpo, com inserções acomodadas por letras de inserção, por exemplo, “30a,” e deleções aparecendo em alguns anticorpos. Os dois esquemas colocam certas inserções e deleções (“indels”) em posições diferentes, resultando em numeração diferencial. O esquema de contato é baseado em análise de estruturas de cristal complexas e é similar em muitos aspectos ao esquema de numeração Chothia. O esquema AbM é um compromisso entre definições de Kabat e Chothia baseadas naquelas usadas por software de modelagem de anticorpo AbM de Oxford Molecular.

[0400] **Tabela 1**, abaixo, lista limites de posição exemplares de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 e CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 como identificado por esquemas Kabat, Chothia, AbM, e Contact, respectivamente. Para CDR-H1, numeração de resíduo é listada usando ambos os esquemas de numeração Kabat e Chothia. FRs são localizadas entre CDRs, por exemplo, com FR-L1 localizada antes CDR-L1, FR-L2 localizada entre CDR-L1 e CDR-L2, FR-L3 localizada entre CDR-L2 e CDR-L3 e assim por diante. Nota-se que, como o esquema de numeração Kabat mostrado coloca inserções em H35A e H35B, a

extremidade da alça de Chothia CDR-H1 quando numerada usando a convenção de numeração Kabat mostrada varia entre H32 e H34, dependendo do tamanho da alça.

Tabela 1. Limites de CDRs de acordo com vários esquemas de numeração.

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contato
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Numeração Kabat ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Numeração Chothia ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

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

[0401] Desse modo, a menos que de outro modo especificado, uma "CDR" ou "região de determinação de complementariedade," 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 de complementariedade como definido por qualquer um dos esquemas mencionados, ou outros esquemas conhecidos. Por exemplo, onde é mencionado que uma CDR particular (por exemplo, uma CDR-H3) contém a sequência de aminoácido de uma CDR correspondente em uma determinada sequência de aminoácido de região V_H ou V_L, deve ser entendido que tal CDR tem uma sequência da CDR correspondente (por exemplo, CDR-H3) dentro da região variável, como definido por qualquer um dos esquemas acima mencionados, ou outros esquemas conhecidos. Em

algumas modalidades, sequências de CDR específicas são especificadas. Sequências de CDR exemplares de anticorpos fornecidos são descritas usando vários esquemas de numeração, embora seja entendido que um anticorpo fornecido pode incluir CDRs como descrito de acordo com qualquer um dos outros esquemas de numeração acima mencionados ou outros esquemas de numeração conhecidos por um técnico versado.

[0402] Da mesma forma, a menos que de outro modo especificado, uma FR ou FR(s) especificadas individuais (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 como abrangendo uma região de estrutura (ou a específica) como definido por qualquer um dos esquemas conhecidos. Em alguns casos, o esquema para identificação de uma CDR particular, FR, ou FRs ou CDRs é especificado, tal como a CDR como definido pelo método Kabat, Chothia, AbM ou Contact, ou outros esquemas conhecidos. Em outros casos, a sequência de aminoácido particular de uma CDR ou FR é determinada.

[0403] O termo “região variável” ou “domínio variável” refere-se ao domínio de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo que é envolvida em ligação do anticorpo ao antígeno. As regiões variáveis da cadeia pesada e leve (V_H e V_L , respectivamente) de um anticorpo nativo geralmente têm estruturas similares, com cada domínio compreendendo quanto regiões de estrutura conservadas (FRs) e três CDRs. (veja, por exemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6^a ed., W.H. Freeman e Co., página 91 (2007). Um único domínio V_H ou V_L pode ser suficiente para conferir especificidade de ligação ao antígeno. Além disso, anticorpos que se ligam a um antígeno particular podem ser isolados usando um domínio V_H ou V_L de um anticorpo que se liga ao antígeno para exibir 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).

[0404] Entre os anticorpos incluídos nas CARs fornecidas, estão fragmentos de anticorpo. Um “fragmento de anticorpo” ou “fragmento de ligação ao antígeno” refere-se a uma molécula que não seja um anticorpo intacto que compreende uma porção de um anticorpo intacto que se liga ao antígeno ao qual o anticorpo intacto se liga. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacorpos; anticorpos lineares; regiões variáveis de cadeia pesada (V_H), moléculas de anticorpo de cadeia simples, tais como scFvs e anticorpos de domínio único compreendendo apenas a região V_H; e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo. Em algumas modalidades, o domínio de ligação ao antígeno nas CARs fornecidas é ou compreende um fragmento de anticorpo compreendendo uma região de cadeia pesada variável (V_H) e uma de cadeia leve variável (V_L). Em modalidades particulares, os anticorpos são fragmentos de anticorpos de cadeia simples compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e/ou uma região variável de cadeia leve (V_L), tais como scFvs.

[0405] Em algumas modalidades, o scFv é derivado de FMC63. FMC63 geralmente refere-se a um anticorpo IgG1 monoclonal de camundongo criado contra células Nalm-1 e -16 expressando CD19 de origem humana (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Em algumas modalidades, o anticorpo FMC63 compreende CDRH1 e H2 fornecidas na SEQ ID NOS: 39 e 40, respectivamente, e CDRH3 fornecida na SEQ ID NO: 41 ou 55 e CDRL1 fornecida na SEQ ID NO: 36 e CDR L2 fornecida na SEQ ID NO: 37 ou 56 e CDR L3 fornecida na SEQ ID NO: 38 ou 35. Em algumas modalidades, o anticorpo FMC63 compreende a região variável de cadeia pesada (V_H) compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 42 e a região variável de

cadeia leve (V_L) compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 43.

[0406] Em algumas modalidades, o scFv compreende uma cadeia leve variável contendo a sequência de CDRL1 de SEQ ID NO: 36, uma sequência de CDRL2 de SEQ ID NO: 37, e uma sequência de CDRL3 de SEQ ID NO: 38 e/ou uma cadeia pesada variável contendo uma sequência de CDRH1 de SEQ ID NO:39, uma sequência de CDRH2 de SEQ ID NO:40, e uma sequência de CDRH3 de SEQ ID NO:41. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma região de cadeia pesada variável fornecida na SEQ ID NO:42 e uma região de cadeia leve variável fornecida na SEQ ID NO:43. Em algumas modalidades, as cadeias pesada variável e leve variável são conectadas por um ligante. Em algumas modalidades, o ligante é fornecido na SEQ ID NO:57. Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma V_H , um ligante, e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma V_L , um ligante, e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv é codificado por uma sequência de nucleotídeos fornecida na SEQ ID NO:58 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:58. Em algumas modalidades, o scFv compreende a sequência de aminoácidos fornecidos na SEQ ID NO:44 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:44.

[0407] Em algumas modalidades, o scFv é derivado de SJ25C1. SJ25C1 é um anticorpo IgG1 monoclonal de camundongo criado contra células Nalm-1 e -16 expressando CD19 de origem humana (Ling, N. R., *et al.*(1987). *Leucocyte typing III*. 302). Em algumas modalidades, o anticorpo SJ25C1 compreende CDRH1, H2 e H3 fornecidas na SEQ ID NOS: 48-50, respectivamente, e sequências de CDRL1, L2 e L3

fornecidas na SEQ ID NOS: 45-47, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo SJ25C1 compreende a região variável de cadeia pesada (V_H) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51 e a região variável de cadeia leve (V_L) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52.

[0408] Em algumas modalidades, o scFv compreende uma cadeia leve variável contendo a sequência de CDRL1 de SEQ ID NO:45, uma sequência de CDRL2 de SEQ ID NO: 46, e uma sequência de CDRL3 de SEQ ID NO:47 e/ou uma cadeia pesada variável contendo uma sequência de CDRH1 de SEQ ID NO:48, uma sequências de CDRH2 de SEQ ID NO:49, e uma sequência de CDRH3 de SEQ ID NO:50. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma região de cadeia pesada variável fornecida na SEQ ID NO:51 e uma região de cadeia leve variável fornecida na SEQ ID NO:52. Em algumas modalidades, as cadeias pesada variável e leve variável são conectadas por um ligante. Em algumas modalidades, o ligante é fornecido na SEQ ID NO:53. Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma V_H , um ligante, e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv compreende, em ordem, uma V_L , um ligante, e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv compreende a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO:54 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:54.

[0409] Em algumas modalidades, o antígeno ou domínio de ligação ao antígeno é BCMA. Em algumas modalidades, o scFv contém uma V_H e uma V_L derivada de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para BCMA. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a BCMA é ou contém uma V_H e uma V_L de um anticorpo ou fragmento de anticorpo fornecido nos Pedidos de Patente Internacional, Publicações Números WO 2016/090327 e WO

2016/090320.

[0410] Em algumas modalidades, o antígeno ou domínio de ligação ao antígeno é GPRC5D. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivada de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para GPRC5D. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a GPRC5D é ou contém uma VH e uma VL de um anticorpo ou fragmento de anticorpo fornecido nos Pedidos de Patente Internacional, Publicação Número WO 2016/090329 e WO 2016/090312.

[0411] Em algumas modalidades, o antígeno é CD20. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivada de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD20. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a CD20 é um anticorpo que é ou é derivado de Rituximabe, tal como é scFv de Rituximabe.

[0412] Em algumas modalidades, o antígeno é CD22. Em algumas modalidades, o scFv contém uma VH e uma VL derivada de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo específico para CD22. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga a CD22 é um anticorpo que é ou é derivado de m971, tal como é scFv de m971.

[0413] Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo. Em alguns aspectos, o receptor de antígeno quimérico inclui uma porção extracelular contendo o anticorpo ou fragmento e um domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento inclui um scFv.

[0414] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo do receptor recombinante, por exemplo, CAR, também inclui pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina, tal como uma

região de articulação, por exemplo, uma região de articulação de IgG4, e/ou uma CH1/CL e/ou região de Fc. Em algumas modalidades, a região ou porção constante é de uma IgG, tal como IgG4 ou IgG1. Em alguns aspectos, a porção da região constante serve como uma região espaçadora entre o componente de reconhecimento de antígeno, por exemplo, scFv, e domínio de transmembrana. O espaçador pode ser de um tamanho que fornece para capacidade de resposta aumentada da célula após ligação ao antígeno, quando comparada a na ausência do espaçador. Espaçadores exemplares incluem, mas não estão limitados a, aqueles descritos em Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Número de publicação de pedido de patente internacional WO2014031687, Patente Norteamericana No. 8,822,647 ou pedido publicado No. US2014/0271635.

[0415] Em algumas modalidades, a região ou porção constante é de uma IgG humana, tal como IgG4 ou IgG1. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência ESKYGPPCPPCP (fornecida na SEQ ID NO: 1), e é codificado pela sequência fornecida na SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência fornecida na SEQ ID NO: 3. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência fornecida na SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, a região ou porção constante é de IgD. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência fornecida na SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, o espaçador tem a 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 qualquer um de SEQ ID NOS: 1, 3, 4 ou 5. Em algumas modalidades, o espaçador tem a sequência fornecida na SEQ ID NOS: 25-33. Em algumas modalidades, o espaçador tem a 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 qualquer um de

SEQ ID NOS: 25-33.

[0416] Em algumas modalidades, o receptor de antígeno compreende um domínio intracelular ligado diretamente ou indiretamente ao domínio extracelular. Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico inclui um domínio de transmembrana ligando o domínio extracelular e o domínio de sinalização intracelular. Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um ITAM. Por exemplo, em alguns aspectos, o domínio de reconhecimento de antígeno (por exemplo, domínio extracelular) geralmente é ligado a um ou mais componentes de sinalização intracelular, tais como componentes de sinalização que imitam a ativação através de um complexo de receptor de antígeno, tal como um complexo de TCR, no caso de um CAR, e/ou sinal por meio de outro receptor de superfície celular. Em algumas modalidades, o receptor quimérico compreende um domínio de transmembrana ligado ou fundido entre o domínio extracelular (por exemplo, scFv) e domínio de sinalização intracelular. Desse modo, em algumas modalidades, o componente de ligação ao antígeno (por exemplo, anticorpo) é ligado a uma ou mais transmembranas e domínios de sinalização intracelular.

[0417] Em uma modalidade, um domínio de transmembrana que naturalmente é associado com um dos domínios no receptor, por exemplo, CAR, é usado. Em alguns casos, o domínio de transmembrana é selecionado ou modificado por substituição de aminoácido para evitar ligação de tais domínios ao domínio de transmembranas das mesmas ou diferentes proteínas de membrana de superfície para minimizar interações com outros membros do complexo de receptor.

[0418] O domínio de transmembrana em algumas modalidades é derivado de uma fonte natural ou de uma sintética. Onde a fonte é natural, o domínio em alguns aspectos é derivado de qualquer proteína

ligada à membrana ou transmembrana. Regiões de transmembrana incluem aquelas derivadas da (isto é, compreendem pelo menos a região de transmembrana de) cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de célula T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente o domínio de transmembrana em algumas modalidades é sintético. Em alguns aspectos, o domínio de transmembrana sintético compreende predominantemente resíduos hidrofóbicos, tais 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 modalidades, a ligação é por ligantes, espaçadores, e/ou domínio(s) de transmembrana. Em alguns aspectos, o domínio de transmembrana contém uma porção de transmembrana de CD28.

[0419] Em algumas modalidades, o domínio extracelular e domínio de transmembrana podem ser ligados diretamente ou indiretamente. Em algumas modalidades, o domínio extracelular e transmembrana são ligados por um espaçador, tal como qualquer um aqui descrito. Em algumas modalidades, o receptor contém uma porção extracelular da molécula da qual o domínio de transmembrana é derivado, tal como uma porção extracelular de CD28.

[0420] Entre os domínios de sinalização intracelular estão aqueles que imitam ou aproximam um sinal através de um receptor de antígeno natural, um sinal através de tal receptor em combinação com um receptor coestimulatório, e/ou um sinal através de um receptor coestimulatório sozinho. Em algumas modalidades, um ligante de oligo- ou polipeptídeo curto, por exemplo, um ligante entre 2 e 10 aminoácidos de tamanho, tal como um contendo glicinas e serinas, por exemplo, duplete de glicina-serina, está presente e forma uma ligação entre o domínio de transmembrana e o domínio de sinalização citoplasmática

do CAR.

[0421] Ativação de célula T é em alguns aspectos descrita como mediada por duas classes de sequências de sinalização citoplasmática: aquela que inicia ativação primária dependente de antígeno através do TCR (sequências de sinalização citoplasmática primária), e aquela que age em de uma maneira independente de antígeno para fornecer um sinal secundário ou coestimulatório (sequências de sinalização citoplasmática secundária). Em alguns aspectos, o CAR inclui um ou ambos de tais componentes de sinalização.

[0422] O receptor, por exemplo, o CAR, geralmente inclui pelo menos um componente, ou componentes de sinalização intracelular. Em alguns aspectos, o CAR inclui uma sequência de sinalização citoplasmática primária que regula ativação primária do complexo de TCR. Sequências de sinalização citoplasmática primária que agem de uma maneira estimulatória pode conter *motifs* de sinalização que são conhecidos como *motifs* de ativação do imunoreceptor baseado em tirosina ou ITAMs. Exemplos de ITAM contendo sequências de sinalização citoplasmática primária incluem aquelas derivadas de cadeia CD3 zeta, FcRgama, CD3 gama, CD3 delta e CD3 epsilon. Em algumas modalidades, moléculas de sinalização citoplasmática no CAR contêm um domínio de sinalização citoplasmática, porção dos mesmos, ou sequência derivada de CD3 zeta.

[0423] Em algumas modalidades, o receptor inclui um componente intracelular de um complexo de TCR, tal como uma cadeia CD3 de TCR que media a ativação e citotoxicidade de célula T, por exemplo, cadeia CD3 zeta. Desse modo, em alguns aspectos, a porção de ligação ao antígeno é ligada a um ou mais módulos de sinalização celular. Em algumas modalidades, módulos de sinalização celular incluem domínio de transmembrana de CD3, domínios de sinalização intracelular de CD3, e/ou outro domínio de transmembranas de CD3. Em algumas

modalidades, o receptor, por exemplo, CAR, também inclui uma porção de uma ou mais moléculas adicionais, tais como Fc receptor γ , CD8, CD4, CD25, ou CD16. Por exemplo, em alguns aspectos, o CAR ou outro receptor quimérico inclui uma molécula quimérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) ou Fc receptor γ e CD8, CD4, CD25 ou CD16.

[0424] Em algumas modalidades, sobre ligação do CAR ou outro receptor quimérico, o domínio citoplasmático ou domínio de sinalização intracelular do receptor ativa 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 uma função de uma célula T tal como atividade citolítica ou atividade T-auxiliar, tal como secreção de citocinas ou outros fatores. Em algumas modalidades, uma porção truncada de um domínio de sinalização intracelular de um componente de receptor de antígeno ou molécula coestimulatória é usada no lugar de uma cadeia imunoestimulatória intacta, por exemplo, se ela transduz o sinal de função efetora. Em algumas modalidades, o domínio ou domínios de sinalização intracelular incluem as sequências citoplasmáticas do receptor de célula T (TCR), e em alguns aspectos também aquelas de correceptores que no contexto natural age em conjunto com tais receptores para iniciar transdução de sinal após envolvimento de receptor de antígeno.

[0425] No contexto de um TCR natural, ativação completa geralmente requer não apenas sinalização através do TCR, mas também um sinal coestimulatório. Desse modo, em algumas modalidades, para promover ativação completa, um componente para gerar sinal secundário ou coestimulatório é também incluído no CAR. Em outras modalidades, o CAR não inclui um componente para gerar um sinal coestimulatório. Em alguns aspectos, um CAR adicional é expresso na mesma célula e fornece o componente para gerar o sinal secundário ou coestimulatório.

[0426] Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico contém um domínio intracelular de uma molécula coestimulatória de célula T. Em algumas modalidades, o CAR inclui um domínio de sinalização e/ou porção de transmembrana de um receptor coestimulatório, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10, e ICOS. Em alguns aspectos, o mesmo CAR inclui ambos os componentes de ativação e coestimulatório. Em algumas modalidades, o receptor de antígeno quimérico contém um domínio intracelular derivado de uma molécula coestimulatória de célula T ou uma variante funcional do mesmo, tal como entre o domínio de transmembrana e domínio de sinalização intracelular. Em alguns aspectos, a molécula coestimulatória de célula T é CD28 ou 41BB.

[0427] Em algumas modalidades, o domínio de ativação é incluído dentro de um CAR, considerando que o componente coestimulatório é fornecido por outro CAR reconhecendo outro antígeno. Em algumas modalidades, os CARs incluem CARs de ativação ou estimulatórios, CARs coestimulatórios, ambos expressos na mesma célula (veja, WO2014/055668). Em alguns aspectos, as células incluem um ou mais CAR estimulatório ou de ativação e/ou um CAR coestimulatório. Em algumas modalidades, as células também incluem CARs inibitórios (iCARs, veja Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (Dezembro, 2013), tal como um CAR reconhecendo um antígeno diferente daquele associado com e/ou específico para a doença ou condição em que um sinal de ativação liberado através do CAR de direcionamento de doença é diminuído ou inibido por ligação do CAR inibitório a seu ligante, por exemplo, para reduzir efeitos fora de alvo.

[0428] Em algumas modalidades, os dois receptores induzem, respectivamente, um sinal de ativação e um inibitório para a célula, de modo que a ligação de um do receptor a seu antígeno ativa a célula ou induz uma resposta, mas a ligação do segundo receptor inibitório a seu

antígeno induz um sinal que suprime ou atenua aquela resposta. Exemplos são combinações de CARs de ativação e CARs inibitórios (iCARs). Tal estratégia pode ser usada, por exemplo, para reduzir a probabilidade de efeitos descontrolados no contexto em que o CAR de ativação liga-se a um antígeno expresso em uma doença ou condição, que também é expresso em células normais, e o receptor inibitório liga-se a um antígeno separado que é expresso nas células normais, mas não células da doença ou condição.

[0429] Em alguns aspectos, o receptor quimérico é ou inclui um CAR inibitório (por exemplo, iCAR) e inclui componentes intracelulares que atenuam ou suprimem uma resposta imune, tal como uma resposta promovida por ITAM e/ou coestimulatória na célula. Exemplos de tais componentes de sinalização intracelular são aqueles encontrados em moléculas de ponto de verificação imunes, incluindo PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, receptores de PGE2, receptores de adenosina EP2/4 incluindo A2AR. Em alguns aspectos, a célula modificada inclui um CAR inibitório incluindo um domínio de sinalização de ou derivado de tal molécula inibitória, de modo que ela serve para atenuar a resposta da célula, por exemplo, aquela induzida por um CAR de ativação e/ou coestimulatório.

[0430] Em certas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende um domínio de transmembrana e sinalização de CD28 ligado a um domínio intracelular de CD3 (por exemplo, CD3-zeta). Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende domínios coestimulatórios de CD28 e CD137 quimérico (4-1BB, TNFRSF9), ligados a um domínio intracelular de CD3 zeta.

[0431] Em algumas modalidades, o CAR abrange um ou mais, por exemplo, dois ou mais, domínios coestimulatórios e um domínio de ativação, por exemplo, domínio de ativação primária, na porção citoplasmática. CARs exemplares incluem componentes intracelulares

de CD3-zeta, CD28, e 4-1BB.

[0432] Em algumas modalidades, o receptor de antígeno também inclui um marcador e/ou células expressando o CAR ou outro receptor de antígeno também inclui um marcador substituto, tal como um marcador de superfície celular, que pode ser usado para confirmar transdução ou modificação da célula para expressar o receptor. Em alguns aspectos, o marcador inclui todo ou parte (por exemplo, forma truncada) de CD34, um NGFR, ou receptor do fator de crescimento epidérmico, tal como a versão truncada de tal receptor de superfície celular (por exemplo, tEGFR). Em algumas modalidades, o ácido nucleico codificando o marcador é operacionalmente ligado a um polinucleotídeo codificando para uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante clivável, por exemplo, T2A. Por exemplo, um marcador, e opcionalmente uma sequência de ligante, pode ser qualquer um como divulgado em Pedido de Patente Publicado No. WO2014031687. Por exemplo, o marcador pode ser um EGFR truncado (tEGFR) isto é, opcionalmente, ligado a uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante clivável de T2A.

[0433] Um polipeptídeo exemplar para um EGFR truncado (por exemplo, tEGFR) compreende a sequência de aminoácidos fornecida 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 de identidade de sequência para SEQ ID NO: 7 ou 16. Uma sequência de ligante de T2A exemplar compreende a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 6 ou 17 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 6 ou 17.

[0434] Em algumas modalidades, o marcador é uma molécula, por

exemplo, proteína de superfície celular, não encontrada naturalmente em células T ou não encontrada naturalmente sobre a superfície de T células, ou uma porção dos mesmos. Em algumas modalidades, a molécula é uma molécula não-auto, por exemplo, proteína não-auto, isto é, uma que não é reconhecida como "auto" pelo sistema imune do hospedeiro para o qual as células serão adotivamente transferidas.

[0435] Em algumas modalidades, o marcador não serve para nenhuma função terapêutica e/ou não produz nenhum efeito diferente de ser usado como um marcador para modificação genética, por exemplo, para selecionar células modificadas com sucesso. Em outras modalidades, o marcador pode ser uma molécula terapêutica ou molécula de outro modo exercendo algum efeito desejado, tal como um ligante para uma célula a ser encontrada *in vivo*, tal como uma molécula coestimulatória ou de ponto de verificação imune para melhorar e/ou diminuir as respostas das células após transferência adotiva e encontro com ligante.

[0436] Em alguns casos, CARs são referidos como CARs de primeiro, segundo, e/ou terceira geração. Em alguns aspectos, um CAR de primeira geração é aquele que exclusivamente fornece um sinal induzido por cadeia CD3 após ligação ao antígeno; em alguns aspectos, CARs de segunda geração são aqueles que fornecem tal sinal e sinal coestimulatório, tal como um incluindo um domínio de sinalização intracelular de um receptor coestimulatório tal como CD28 ou CD137; em alguns aspectos, um CAR de terceira geração é um que inclui múltiplos domínios coestimulatórios de receptores coestimulatórios diferentes.

[0437] Por exemplo, em algumas modalidades, o CAR contém um anticorpo, por exemplo, um fragmento de anticorpo, tais como um scFv, específico para um antígeno incluindo qualquer um como descrito, a 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 funcional da mesma e uma porção de sinalização de CD3 zeta ou variante funcional da mesma. Em algumas modalidades, o CAR contém um anticorpo, por exemplo, fragmento de anticorpo, tal como um scFv, específico para um antígeno incluindo qualquer um como descrito, 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 tais modalidades, o receptor também inclui um espaçador contendo uma porção de uma molécula de Ig, tal como a molécula de Ig humana, tal como uma articulação de Ig, por exemplo, uma articulação de IgG4, tal como um espaçador apenas de articulação.

[0438] Em algumas modalidades, o domínio de transmembrana do receptor recombinante, por exemplo, o CAR, é ou inclui um domínio de transmembrana de CD28 humano (por exemplo, Número de Acesso P01747.1) ou variante do mesmo, tal como um domínio de transmembrana que compreende a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 8 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 8; em algumas modalidades, o domínio de transmembrana contendo porção do receptor recombinante compreende a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 9 ou uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos, ou cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para isso.

[0439] Em algumas modalidades, os componentes de sinalização

intracelular do receptor recombinante, por exemplo, o CAR, contém um domínio de sinalização coestimulatória intracelular de CD28 humano ou uma variante funcional ou porção do mesmo, tal como um domínio com uma substituição de LL para GG nas posições 186 a 187 de uma proteína CD28 nativa. Por exemplo, o domínio de sinalização intracelular pode compreender a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 10 ou 11 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 10 ou 11. Em algumas modalidades, o domínio intracelular compreende um domínio de sinalização coestimulatória intracelular de 4-1BB (por exemplo, (No. de Acesso Q07011.1) ou variante funcional ou porção do mesmo, tal como a sequência de aminoácidos fornecida na SEQ ID NO: 12 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 12.

[0440] Em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular do receptor recombinante, por exemplo, o CAR, compreende um domínio de sinalização estimulatória de CD3 zeta humano ou variante funcional do mesmo, tal como um domínio citoplasmático 112 AA de isoforma 3 de CD3ζ humano (No. de Acesso: P20963.2) ou um domínio de sinalização de CD3 zeta como descrito na Patente Norteamericana No. 7.446.190 ou Patente Norteamericana No. 8.911.993. Por exemplo, em algumas modalidades, o domínio de sinalização intracelular compreende a sequência de aminoácidos como fornecida na SEQ ID NO: 13, 14 ou 15 ou uma sequência de aminoácidos que exibe pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência para SEQ ID NO: 13, 14 ou 15.

[0441] Em alguns aspectos, o espaçador contém apenas uma região de articulação de um IgG, tal como apenas uma articulação de IgG4 ou IgG1, tal como o espaçador apenas de articulação fornecido na SEQ ID NO: 1. Em outras modalidades, o espaçador é ou contém uma articulação de Ig, por exemplo, uma articulação derivada de IgG4, opcionalmente ligada a domínios CH2 e/ou CH3. Em algumas modalidades, o espaçador é uma articulação de Ig, por exemplo, uma articulação de IgG4, ligada a domínios CH2 e CH3, tal como fornecida na SEQ ID NO: 4. Em algumas modalidades, o espaçador é uma articulação de Ig, por exemplo, uma articulação de IgG4, ligada a um domínio CH3 apenas, tal como fornecido na SEQ ID NO: 3. Em algumas modalidades, o espaçador é ou compreende uma sequência rica em glicina - serina ou outro ligante flexível tal como ligantes flexíveis conhecidos.

[0442] Por exemplo, em algumas modalidades, o CAR inclui um anticorpo tal como um fragmento de anticorpo, incluindo scFvs, um espaçador, tal como um espaçador contendo uma porção de uma molécula de imunoglobulina, tal como uma região de articulação e/ou uma ou mais regiões constantes de uma molécula de cadeia pesada, tal como uma articulação de Ig contendo espaçador, um domínio de transmembrana contendo todas ou uma porção de um domínio de transmembrana derivado de CD28, um domínio de sinalização intracelular derivado de CD28, e um domínio de sinalização de CD3 zeta. Em algumas modalidades, o CAR inclui um anticorpo ou fragmento, tal como scFv, um espaçador tal como qualquer um da articulação de Ig contendo espaçadores, um domínio de transmembrana derivado de CD28, um domínio de sinalização intracelular derivado de 4-1BB, e um domínio de sinalização derivado de CD3 zeta.

[0443] Marcadores substitutos exemplares podem incluir formas

truncadas de polipeptídeos de superfície, tais como formas truncadas que são não funcionais e não transduzem ou não são capazes de transduzir um sinal ou um sinal comumente transduzido pela forma de tamanho natural do polipeptídeo de superfície celular, e/ou não fazem ou não são capazes de internalizar. Polipeptídeos de superfície truncados exemplares incluindo formas truncadas de fatores de crescimento ou outros receptores tais como um receptor 2 de fator de crescimento epidérmico humano truncado (tHER2), um receptor de fator de crescimento epidérmico truncado (tEGFR, sequência de tEGFR exemplar fornecida em 7 ou 16) ou um antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) ou forma modificada do mesmo. tEGFR pode conter um epítipo reconhecido pelo anticorpo cetuximabe (Erbix®) ou outro anticorpo anti-EGFR terapêutico ou moléculas de ligação, que podem ser usadas para identificar ou selecionar células que foram modificadas para expressar a construção de tEGFR e uma proteína exógena codificada, e/ou para eliminar ou separar células expressando a proteína exógena codificada. Veja Patente Norteamericana No. 8,802,374 e Liu *et al.*, Nature Biotech. 2016 Abril; 34(4): 430–434). Em alguns aspectos, o marcador , por exemplo, marcador substituto, inclui todos ou parte (por exemplo, forma truncada) de CD34, uma NGFR, uma CD19 ou uma CD19 truncada, por exemplo, uma CD19 não humana truncada, ou receptor de fator de crescimento epidérmico (por exemplo, tEGFR). Em algumas modalidades, o marcador é ou compreende uma proteína fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde realçada (EGFP), tal como GFP super duplicada (sfGFP), proteína fluorescente vermelha (RFP), tal como tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed ou DsRed2, proteína fluorescente de ciano (CFP), proteína fluorescente verde azul (BFP), proteína fluorescente azul realçada (EBFP), e proteína fluorescente amarela (YFP), e variantes das

mesmas, incluindo variantes de espécies, variantes monoméricas, e variantes otimizada por códon e/ou realçadas das proteínas fluorescentes. Em algumas modalidades, o marcador é ou compreende uma enzima, tal como uma luciferase, o gene *lacZ* de *E. coli*, fosfatase alcalina, fosfatase alcalina embrionária secretada (SEAP), cloranfenicol acetil transferase (CAT). Genes repórter de emissão de luz exemplares incluem luciferase (*luc*), β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), β -glucuronidase (GUS) ou variantes dos mesmos.

[0444] Em algumas modalidades, o marcador é um marcador de seleção. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é ou compreende um polipeptídeo que confere resistência a agentes exógenos ou fármacos. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é um gene de resistência a antibiótico. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é um gene de resistência a antibiótico confere resistência a antibiótico a uma célula de mamífero. Em algumas modalidades, o marcador de seleção é ou compreende um gene de resistência à puromicina, um gene de resistência à higromicina, um gene de resistência à blasticidina, um gene de resistência à neomicina, um gene de resistência à geneticina ou um gene de resistência à zeocina ou uma forma modificada dos mesmos.

[0445] Em algumas modalidades, o ácido nucleico codificando o marcador é operacionalmente ligado a um polinucleotídeo codificando para uma sequência de ligante, tal como uma sequência de ligante clivável, por exemplo, um T2A. Por exemplo, um marcador, e opcionalmente uma sequência de ligante, pode ser qualquer um como divulgado em Pub de PCT. No. WO2014031687.

[0446] Em algumas modalidades, moléculas de ácido nucleico codificando, tais como construções de CAR também incluem uma sequência codificando um elemento de salto ribossômico T2A e/ou uma sequência de tEGFR, por exemplo, a jusante da sequência codificando

o CAR. Em algumas modalidades, a sequência codifica um elemento de salto ribossômico T2A fornecido na SEQ ID NO: 6 ou 17, 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: 6 ou 17. Em algumas modalidades, células T expressando um receptor de antígeno (por exemplo, CAR) podem também ser geradas para expressar um EGFR truncado (EGFRt) como um epítipo de seleção não imunogênica (por exemplo, por introdução de uma construção codificando o CAR e EGFRt separados por uma mudança de ribossoma T2A para expressar duas proteínas da mesma construção), que então podem ser usadas como um marcador para detectar tais células (veja, por exemplo, Patente Norteamericana No. 8,802,374). Em algumas modalidades, a sequência codifica uma sequência de tEGFR fornecida 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. Em alguns casos, o peptídeo, tal como T2A, pode fazer com que o ribossoma salte a síntese (salto de ribossoma) de uma ligação de peptídeo na terminação C de um elemento 2A, levando a separação entre a extremidade da sequência 2A e o novo peptídeo a jusante (veja, por exemplo, de Felipe. *Genetic Vaccines e Ther.* 2:13 (2004) e de Felipe *et al. Traffic* 5:616-626 (2004)). Muitos elementos de 2A são conhecidos. Exemplos de sequências 2A que podem ser usadas nos métodos e ácidos nucleicos divulgados aqui, sem limitação, sequências 2^a, o vírus da doença do pé e boca (F2A, por exemplo, SEQ ID NO: 21), vírus A da rinite equina (E2A, por exemplo, SEQ ID NO: 20), vírus *Thosea asigna* (T2A, por exemplo, SEQ ID NO: 6 ou 17), e tecnovírus-1 porcino (P2A, por exemplo, SEQ ID NO: 18 ou 19) como descrito em Publicação de Patente Norteamericana no. 20070116690.

[0447] Em alguns casos, a sequência de ácido nucleico codificando 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 sinal de cadeia alfa GMCSFR fornecido na SEQ ID NO: 62 e codificado pela sequência de nucleotídeo fornecida na SEQ ID NO: 61, o peptídeo sinal alfa CD8 fornecido na SEQ ID NO: 60, ou o peptídeo sinal CD33 fornecido na SEQ ID NO:59.

[0448] Os receptores recombinantes, tais como CARs, expressados pela células administradas ao indivíduo geralmente reconhece ou especificamente se liga a uma molécula que é expressa em, associada com, e/ou específico para a doença ou condição ou células das mesmas sendo tratadas. Após ligação específica à molécula, por exemplo, antígeno, o receptor geralmente libera um sinal imunoestimulatório, tal como um sinal transduzido por ITAM, na célula, desse modo promovendo uma resposta imune direcionada à doença ou condição. Por exemplo, em algumas modalidades, as células expressam um CAR que especificamente se liga a um antígeno expresso por uma célula ou tecido da doença ou condição ou associado com a doença ou condição.

B. TCRs

[0449] Em algumas modalidades, células modificadas, tais como células T, são fornecidas para expressar um receptor de célula T (TCR) ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que reconhece um epítipo de peptídeo ou epítipo de célula T de um polipeptídeo alvo, tal como um antígeno de um tumor, proteína viral ou autoimune.

[0450] Em algumas modalidades, um “receptor de célula T” ou “TCR” é uma molécula que contém cadeias variáveis α e β (também conhecidas como TCR α e TCR β , respectivamente) ou cadeias variáveis γ e δ (também conhecidas como TCR α e TCR β , respectivamente), ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos, e que é capaz de ligar

especificamente uma ligação de peptídeo a uma molécula de MHC. Em algumas modalidades, o TCR está na forma $\alpha\beta$. Tipicamente, TCRs que existem nas formas $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ são geralmente estruturalmente similares, mas células T expressando eles podem ter localizações ou funções anatômicas distintas. Um TCR pode ser encontrado sobre a superfície de uma célula ou na forma solúvel. Geralmente, um TCR é encontrado sobre a superfície de células T (ou linfócitos T) onde ele é geralmente responsável por reconhecer antígenos ligados a moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC).

[0451] A menos que de outro modo indicado, o termo “TCR” deve ser entendido como abrangendo TCRs naturais bem como porções de ligação ao antígeno ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, o TCR é um TCR intacto ou de tamanho natural, incluindo TCRs na forma $\alpha\beta$ ou forma $\gamma\delta$. Em algumas modalidades, o TCR é uma porção de ligação ao antígeno que é menor do que um TCR de tamanho natural, mas que se liga a uma ligação de peptídeo específico em uma molécula de MHC, tal como se liga a um complexo de peptídeo de MHC. 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, mas também ainda é capaz de se ligar ao epítipo de peptídeo, tal como complexo de peptídeo MHC, ao qual o TCR natural se liga. Em alguns casos, uma porção de ligação ao antígeno contém os domínios variáveis de um TCR, tais como cadeia α variável e cadeia β variável de TCR, suficientes para formar um sítio de ligação para se ligar a um complexo de peptídeo MHC específico. Geralmente, as cadeias variáveis de um TCR contêm regiões de determinação de complementariedade envolvidas no reconhecimento do peptídeo, MHC e/ou complexo de peptídeo MHC.

[0452] Em algumas modalidades, os domínios variáveis do TCR

contêm alças hipervariáveis, ou regiões de determinação de complementariedade (CDRs), que geralmente são contribuintes primários para reconhecimento de antígeno e capacidades de ligação e especificidade. Em algumas modalidades, uma CDR de um TCR ou combinação da mesma forma todo ou substancialmente todo o sítio de ligação ao antígeno de uma determinada 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 dentre as moléculas de TCR quando comparadas às 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 modalidades, CDR3 é a principal CDR responsável por ligação ao antígeno ou especificidade, ou é a mais importante dentre as três CDRs em uma determinada região variável de TCR para reconhecimento de antígeno, e/ou para interação com a porção de peptídeo processada do complexo peptídeo-MHC. Em alguns contextos, uma CDR1 da cadeia alfa pode interagir com a parte de terminação N de certos peptídeos antigênicos. Em alguns contextos, CDR1 da cadeia beta pode interagir com a parte da terminação C do peptídeo. Em alguns contextos, CDR2 contribui mais fortemente para ou é a CDR primária responsável pela interação com ou reconhecimento da porção de MHC do complexo MHC-peptídeo. Em algumas modalidades, a região variável da cadeia β pode conter uma região hipervariável adicional (CDR4 ou HVR4), que geralmente está envolvida em ligação ao superantígeno e não reconhecimento de antígeno (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0453] Em algumas modalidades, um TCR pode também conter um domínio constante, um domínio de transmembrana e/ou uma cauda citoplásmica curta (veja, por exemplo, Janeway *et al.*, Immunobiology:

The Immune System in Health e Disease, 3ª Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). Em alguns aspectos, cada cadeia do TCR pode possuir um domínio variável de imunoglobulina de terminação N, um domínio constante de imunoglobulina, uma região de transmembrana, e uma cauda citoplásmica curta na extremidade da terminação C. Em algumas modalidades, um TCR é associado com proteínas invariantes do complexo CD3 envolvido na mediação de transdução de sinal.

[0454] Em algumas modalidades, 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 tipo imunoglobulina, tais como um domínio variável (por exemplo, $V\alpha$ ou $V\beta$; tipicamente aminoácidos 1 a 116 baseados em numeração Kabat Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health e Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5ª ed.) e um domínio constante (por exemplo, domínios constantes de cadeia α ou $C\alpha$, tipicamente posições 117 a 259 da cadeia baseada em numeração Kabat ou domínios constantes de cadeia β ou $C\beta$, tipicamente posições 117 a 295 da cadeia baseada 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 cada um contém CDRs. O domínio constante do TCR pode conter sequências de conexão curtas em que um resíduo de cisteína forma uma ligação de dissulfeto, desse modo ligando as duas cadeias do TCR. Em algumas modalidades, um TCR pode ter um resíduo de cisteína adicional em cada uma das cadeias α e β , de modo que o TCR contém duas ligações de dissulfeto nos domínios constantes.

[0455] Em algumas modalidades, as cadeias de TCR contêm

domínio de transmembrana. Em algumas modalidades, o domínio de transmembrana é positivamente carregado. Em alguns casos, a cadeia de TCR contém uma cauda citoplásmica. Em alguns casos, a estrutura permite que o TCR se associe com 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 se associar com subunidades invariantes do complexo ou aparato de sinalização de CD3. As caudas intracelulares de subunidades de sinalização de CD3 (por exemplo, cadeias CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ e CD3 ζ) contêm um ou mais *motif* de ativação de imunoreceptor baseado em tirosina ou ITAM que estão envolvidos na capacidade de sinalização do complexo de TCR.

[0456] Em algumas modalidades, o TCR pode ser um heterodímero de duas cadeias α e β (ou opcionalmente γ e δ) ou ele pode ser uma construção de TCR de cadeia única. Em algumas modalidades, o TCR é um heterodímero contendo duas cadeias separadas (cadeias α e β ou cadeias γ e δ) que são ligadas, tal como por uma ligação de dissulfeto ou ligações de dissulfeto.

[0457] Em algumas modalidades, o TCR pode ser gerado de uma sequência de TCR conhecida, tal como sequências V α , cadeias β , para o qual uma sequência de codificação substancialmente de tamanho natural está prontamente disponível. Métodos para obter sequências de TCR de tamanho natural, incluindo sequências de cadeia V, de fontes celulares são bem conhecidos. Em algumas modalidades, ácidos nucleicos codificando o TCR podem ser obtidos de várias fontes, tais como por amplificação de reação de cadeia de polimerase (PCR) de ácidos nucleicos codificando TCR dentro de ou isolados de uma determinada célula ou células, ou síntese de sequências de DNA de TCR publicamente disponíveis.

[0458] Em algumas modalidades, o TCR é obtido de uma fonte

biológica, tal como de células, tal como de uma célula T (por exemplo, célula T citotóxica), hibridomas de célula T ou outra fonte publicamente disponível. Em algumas modalidades, as células T podem ser obtidas de células isoladas *in vivo*. Em algumas modalidades, o TCR é um TCR timicamente selecionado de TCR. Em algumas modalidades, o TCR é um TCR restrito a neoepítipo. Em algumas modalidades, as células T podem ser um clone ou hibridoma de célula T cultivada. Em algumas modalidades, o TCR ou porção de ligação ao antígeno do mesmo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser sinteticamente gerado de conhecimento da sequência do TCR.

[0459] Em algumas modalidades, o TCR é gerado de um TCR identificado ou selecionado de triagem de uma biblioteca de TCRs candidatos contra um antígeno de polipeptídeo, ou epítipo de célula T alvo do mesmo. Bibliotecas de TCR podem ser geradas por amplificação do repertório de $V\alpha$ e $V\beta$ de células T isoladas de um indivíduo, incluindo células presentes em PBMCs, baço ou outro órgão linfóide. Em alguns casos, células T podem ser amplificadas de linfócitos de infiltração de tumor (TILs). Em algumas modalidades, bibliotecas de TCR podem ser geradas de células T $CD4^+$ ou $CD8^+$. Em algumas modalidades, os TCRs podem ser amplificadas de uma fonte de célula T de um indivíduo normal de saúde, isto é, bibliotecas de TCR normal. Em algumas modalidades, os TCRs podem ser amplificadas de uma fonte de célula T de um indivíduo doente, isto é, bibliotecas de TCR doente. Em algumas modalidades, iniciadores degenerados são usados para ampliar o repertório genético de $V\alpha$ e $V\beta$, tal como por RT-PCR em amostras, tais como células T, obtidas de humanos. Em algumas modalidades, bibliotecas de scTv podem ser montadas de bibliotecas de $V\alpha$ e $V\beta$ virgens em que os produtos amplificadas são clonados ou montados para serem separados por um ligante. Dependendo da fonte do indivíduo e células, as bibliotecas podem ser específicas de alelo

HLA. Alternativamente, em algumas modalidades, bibliotecas de TCR podem ser geradas por mutagênese ou diversificação de uma molécula de TCR padrão ou de estrutura. Em alguns aspectos, os TCRs são submetidos a 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 modalidades, TCRs selecionados podem ser modificados por maturação por afinidade. Em algumas modalidades, células T específicas de antígeno podem ser selecionadas, tal como por triagem para avaliar atividade de CTL contra o peptídeo. Em alguns aspectos, TCRs, por exemplo, presentes nas células T específicas de antígeno, podem ser selecionados, tal como por atividade de ligação, por exemplo, afinidade ou avidéz particular pelo antígeno.

[0460] Em algumas modalidades, o TCR ou porção de ligação ao antígeno do mesmo é um que foi modificado (modified) ou modificado (engineered). Em algumas modalidades, métodos de evolução direcionada são usados para gerar TCRs com propriedades alteradas, tais como com alta afinidade por um complexo MHC-peptídeo específico. Em algumas modalidades, evolução direcionada é alcançada exibindo métodos incluindo, mas não limitado a, exibição de levedura (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 fago (Li *et al.* (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54), ou exibição de célula T (Chervin *et al.* (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84). Em algumas modalidades, abordagens de exibição envolvem modificação (engineering), ou modificação (modifying), um TCR padrão ou de referência conhecido. Por exemplo, em alguns casos, um TCR tipo selvagem pode ser usado como um padrão para produzir TCRs mutagenizados em que em um ou mais resíduos dos CDRs são mutados, e mutantes com uma propriedade alterada desejada, tal como alta afinidade para um antígeno

alvo desejado, são selecionados.

[0461] Em algumas modalidades, peptídeos de um polipeptídeo alvo para uso na produção ou geração de um TCR de interesse são conhecidos ou podem ser prontamente identificados. Em algumas modalidades, peptídeos adequados para uso na geração de TCRs ou porções de ligação ao antígeno podem ser determinados com base na presença de um *motif* restrito à HLA em um polipeptídeo alvo de interesse, tal como um polipeptídeo alvo descrito abaixo. Em algumas modalidades, peptídeos são identificados usando modelos de previsão de computador disponíveis. Em algumas modalidades, para prever sítios de ligação a MHC classe I, tais modelos incluem, mas 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 modalidades, o epítipo restrito à MHC é HLA-A0201, que é expresso em aproximadamente 39 a 46% de todos os caucasianos e por isso, representa uma escolha adequada de antígeno MHC para uso na preparação de um TCR ou outra molécula de ligação a MHC-peptídeo.

[0462] *Motifs* de ligação a HLA-A0201 e os sítios de clivagem para proteassomas e proteassomas imunes usando modelos de previsão de computador são conhecidos. Para prever sítios de ligação a MHC classe I, tais modelos incluem, mas não estão limitados a, ProPred1 (descrito em mais detalhes em Singh e Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001), e SYFPEITHI (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).

[0463] Em algumas modalidades, o TCR ou porção de ligação ao antígeno do mesmo pode ser uma proteína natural recombinantemente

produzida ou forma mutada da mesma em que uma ou mais propriedades, tal como característica de ligação, foi alterada. Em algumas modalidades, um TCR pode ser derivado de uma das várias espécies animais, tal como humano, camundongo, rato, ou outro mamífero. Um TCR pode estar ligado à célula ou na forma solúvel. Em algumas modalidades, para propósitos dos métodos fornecidos, o TCR está na forma ligada à célula expressa sobre a superfície de uma célula.

[0464] Em algumas modalidades, o TCR é um TCR de tamanho natural. Em algumas modalidades, o TCR é uma porção de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o TCR é um TCR dimérico (dTTCR). Em algumas modalidades, o TCR é um TCR de cadeia simples (scTCR). Em algumas modalidades, um dTTCR ou scTCR tem as estruturas como descrito em WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[0465] Em algumas modalidades, o TCR contém uma sequência correspondendo à sequência de transmembrana. Em algumas modalidades, o TCR contém uma sequência correspondendo às sequências citoplásmicas. Em algumas modalidades, o TCR é capaz de formar um complexo de TCR com CD3. Em algumas modalidades, qualquer um dos TCRs, incluindo um dTTCR ou scTCR, podem ser ligados para domínios de sinalização que produzem um TCR ativo sobre a superfície de uma célula T. Em algumas modalidades, o TCR é expresso sobre a superfície de células.

[0466] Em algumas modalidades um dTTCR contém um primeiro polipeptídeo em que uma sequência correspondendo a uma sequência de região variável de cadeia α de TCR é fundida à terminação N de uma sequência correspondendo a uma sequência extracelular de região constante de cadeia α de TCR, e um segundo polipeptídeo em que uma sequência correspondendo a uma sequência de região variável de cadeia β de TCR é fundida à terminação N de uma sequência correspondendo a uma sequência extracelular de região constante de

cadeia β de TCR, os primeiros e segundos polipeptídeos sendo ligados por uma ligação de dissulfeto. Em algumas modalidades, a ligação pode corresponder à ligação de dissulfeto de intercadeia nativa presente em TCRs $\alpha\beta$ diméricos. Em algumas modalidades, as ligações de dissulfeto intercadeia não estão presentes em um TCR nativo. Por exemplo, em algumas modalidades, uma ou mais cisteínas podem ser incorporadas nas sequências extracelulares de região constante de par de polipeptídeo de dTCR. Em alguns casos, ambas as ligações de dissulfeto nativa e não nativa podem ser desejáveis. Em algumas modalidades, o TCR contém uma sequência de transmembrana para ancorar à membrana.

[0467] Em algumas modalidades, um dTCR contém uma cadeia α de TCR contendo um domínio α variável, um domínio α constante e um primeiro *motif* de dimerização ligado à terminação C do domínio α constante, e uma cadeia β de TCR compreendendo um domínio β variável, um domínio β constante e um primeiro *motif* de dimerização ligado à terminação C do domínio β constante, em que o primeiro e segundo *motifs* de dimerização facilmente interagem para formar uma ligação covalente entre um aminoácido no primeiro *motif* de dimerização e um aminoácido no segundo *motif* de dimerização ligando a cadeia α de TCR e cadeia β de TCR juntas.

[0468] Em algumas modalidades, 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); Wülfing, C. e Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. *et al.* PNAS (USA) 90 3830 (1993); PCT publicado Internacional 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 modalidades, um scTCR contém uma ligação intercadeia de dissulfeto não nativa introduzida para facilitar a associação das

cadeias de TCR (veja, por exemplo, PCT publicado Internacional PCT No. WO 03/020763). Em algumas modalidades, um scTCR é um TCR truncado ligado a não dissulfeto em que zíperes de leucina heterólogo fundidos à terminação C dos mesmos facilita associação de cadeia (veja, por exemplo, PCT publicado Internacional No. WO99/60120). Em algumas modalidades, um scTCR contém um domínio variável de TCR α covalentemente ligado a um domínio variável TCR β por meio um ligante de peptídeo (veja, por exemplo, PCT publicado Internacional No. WO99/18129).

[0469] Em algumas modalidades, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de aminoácido correspondendo a uma região variável de cadeia TCR α , um segundo segmento constituído por uma sequência de aminoácido correspondendo a uma região variável de cadeia de TCR β fundida à terminação N de uma sequência de aminoácido correspondendo a uma sequência extracelular de domínios constantes de cadeia TCR β , e uma sequência de ligante ligando a terminação C do primeiro segmento à terminação N do segundo segmento.

[0470] Em algumas modalidades, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia α fundida à terminação N de uma sequência de domínios constantes extracelular de cadeia α , e um segundo segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia β fundida à terminação N de uma constante extracelular de cadeia β de sequência e sequência de transmembrana, e, opcionalmente, uma sequência de ligante ligando a terminação C do primeiro segmento à terminação N do segundo segmento.

[0471] Em algumas modalidades, um scTCR contém um primeiro segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia β de TCR fundida à terminação N de uma sequência de domínios

constantes extracelular de cadeia β , e um segundo segmento constituído por uma sequência de região variável de cadeia α fundida à terminação N de uma sequência constante extracelular de cadeia α e sequência de transmembrana, e, opcionalmente, uma sequência ligante ligando a terminação C do primeiro segmento à terminação N do segundo segmento.

[0472] Em algumas modalidades, o ligante dos TCRs que ligam o primeiro e segundo segmentos de TCR pode ser qualquer ligante capaz de formar um filamento de polipeptídeo simples, enquanto mantém especificidade de ligação à TCR. Em algumas modalidades, a sequência de ligante pode, por exemplo, ter a Fórmula -P-AA-P- em que P é prolina e AA representa uma sequência de aminoácido em que os aminoácidos são glicina e serina. Em algumas modalidades, o primeiro e segundo segmentos estão emparelhados de modo que as sequências de região variável dos mesmos são orientados para tal ligação. Consequentemente, em alguns casos, o ligante tem um tamanho suficiente para percorrer a distância entre a terminação C do primeiro segmento e a terminação N do segundo segmento, ou vice-versa, mas não é tão longo para bloquear ou reduzir ligação do scTCR ao ligante alvo. Em algumas modalidades, o ligante pode conter de 10 a 45 aminoácidos ou de cerca de 10 a cerca de 45 aminoácidos, tal como 10 a 30 aminoácidos ou 26 a 41 resíduos de aminoácidos, por exemplo, 29, 30, 31 ou 32 aminoácidos. Em algumas modalidades, o ligante tem a Fórmula -PGGG-(SGGGG)5-P- em que P é prolina, G é glicina e S é serina (SEQ ID NO:28). Em algumas modalidades, o ligante tem a sequência GSADDAKKDAAKKGKS (SEQ ID NO:29).

[0473] Em algumas modalidades, o scTCR contém uma ligação de dissulfeto covalente ligando 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

modalidades, a ligação de dissulfeto de intercadeia em um TCR nativo não está presente. Por exemplo, em algumas modalidades, uma ou mais cisteínas podem ser incorporadas nas sequências extracelulares de região constante do primeiro e segundo segmentos do polipeptídeo de scTCR. Em alguns casos, ambas as ligações de dissulfeto nativa e não nativa podem ser desejáveis.

[0474] Em algumas modalidades de um dTCR ou scTCR contendo ligações de dissulfeto de intercadeia introduzidas, as ligações de dissulfeto nativo não estão presentes. Em algumas modalidades, uma ou mais das cisteínas nativas formando ligações de dissulfeto de intercadeia nativas são substituídas por outro resíduo, tal como por uma serina ou alanina. Em algumas modalidades, uma ligação de dissulfeto introduzida pode ser formada por mutação de resíduos de não cisteína no primeiro e segundo segmentos para cisteína. Ligações de dissulfeto não nativo exemplares de um TCR são descritas em PCT Internacional publicado No. WO2006/000830.

[0475] Em algumas modalidades, o TCR ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo exibe uma afinidade com uma constante de ligação de equilíbrio para um antígeno alvo dentre ou dentre cerca de 10 a 5 e 10 a 12 M e todos os valores individuais e faixas. Em algumas modalidades, o antígeno alvo é um complexo MHC-peptídeo ou ligante.

[0476] Em algumas modalidades, ácido nucleico ou ácidos nucleicos codificando um TCR, tal como cadeias α e β , podem ser amplificados por PCR, clonando ou outros meios adequados e clonados em 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 designados para propagação e expansão ou para expressão ou ambos, tal como plasmídeos e vírus.

[0477] Em algumas modalidades, o vetor pode ser um vetor da série pUC (Fermentas Life Sciences), a série pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), a série pET (Novagen, Madison, Wis.), a série pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), ou a série pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). Em alguns casos, vetores bacteriófagos, tais como λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4, e λ NM1149, também podem ser usados. Em algumas modalidades, vetores de expressão de planta podem ser usados e incluem pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 e pBIN19 (Clontech). Em algumas modalidades, vetores de expressão animal incluem pEUK-CI, pMAM e pMAMneo (Clontech). Em algumas modalidades, um vetor viral é usado, tal como um vetor retroviral.

[0478] Em algumas modalidades, os vetores de expressão recombinante podem ser preparados usando técnicas de DNA recombinante padrão. Em algumas modalidades, vetores podem conter sequências regulatórias, tais como transcrição e iniciação de tradução e códons de terminação, que são específicos para o tipo de hospedeiro (por exemplo, bactéria, fungo, planta, ou animal) no qual o vetor deve ser introduzido, como apropriado e levando em consideração se o vetor é baseado em DNA ou RNA. Em algumas modalidades, o vetor pode conter um promotor não nativo operavelmente ligado à sequência de nucleotídeo codificando o TCR ou porção de ligação ao antígeno (ou outra molécula de ligação à MHC-peptídeo). Em algumas modalidades, o promotor pode ser um promotor não viral ou um promotor viral, tal como um promotor de citomegalovírus (CMV), um promotor de SV40, um promotor de RSV, e um promotor encontrado na repetição de terminal longo do vírus de célula tronco de murino. Outros promotores conhecidos também são contemplados.

[0479] Em algumas modalidades, para gerar um vetor codificando um TCR, as cadeias α e β são amplificadas por PCR de cDNA total isolado de um clone de célula T expressando o TCR de interesse e

clonadas em um vetor de expressão. Em algumas modalidades, as cadeias α e β são clonadas no mesmo vetor. Em algumas modalidades, as cadeias α e β são clonadas em vetores diferentes. Em algumas modalidades, as cadeias α e β geradas são incorporadas em um vetor retroviral, por exemplo, lentiviral.

V. COMPOSIÇÕES, FORMULAÇÕES, E MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

[0480] Em algumas modalidades, composições de saída de células T enriquecidas produzidas pelos métodos fornecidos aqui, tais como descritos na Seção I, são administradas como uma terapia celular, por exemplo, uma terapia celular adotiva. Em modalidades particulares, uma ou mais composições celulares, por exemplo, composições celulares de saída aqui descritas são administradas como uma terapia celular. Em algumas modalidades, métodos de terapia de célula T adotiva são descritos, por exemplo, na Publicação de Pedido de Patente Norteamericana no. 2003/0170238 para Gruenberg *et al.*; Patente Norteamericana No. 4,690,915 para Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). Veja, por exemplo, Themeliet *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.

[0481] Em certas modalidades, os métodos fornecidos aqui produzem uma composição de saída simples de células T enriquecidas de células de entrada isoladas, selecionadas e/ou enriquecidas de uma amostra biológica simples que é administrada como uma terapia celular. Em modalidades particulares, a composição simples de saída é uma composição de células T CD4+ enriquecidas. Em certas modalidades, a composição simples de saída é uma composição de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos aqui produzem duas ou mais composições de saída de uma fonte única,

por exemplo, uma amostra biológica e/ou composições de entrada isoladas, selecionadas, ou enriquecidas de uma amostra biológica, que são administradas a um indivíduo. Em algumas modalidades, as duas ou mais composições de saída são administradas ao indivíduo separadamente. Em certas modalidades, as duas ou mais composições de saída são combinadas em uma única composição e administradas ao indivíduo. Em certas modalidades, as duas ou mais composições de saída incluem uma composição de saída de células T CD4+ enriquecidas. Em modalidades particulares, as duas ou mais composições de saída incluem uma composição de saída de células T CD8+ enriquecidas.

[0482] Em algumas modalidades, uma composição de saída de células T CD4+ enriquecidas que é administrada a um indivíduo inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em certas modalidades, a composição de saída inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD4+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de saída de células T CD4+ enriquecidas que é administrada ao indivíduo inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD8, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+.

[0483] Em algumas modalidades, uma composição de saída de células T CD8+ enriquecidas que é administrada a um indivíduo inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+. Em modalidades particulares, a composição inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de saída de células T CD8+ enriquecidas que é administrada ao indivíduo inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém nenhuma célula T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+.

[0484] A doença ou condição que é tratada pode ser qualquer uma em que a expressão de um antígeno é associada com e/ou envolvida na etiologia de uma condição de doença ou distúrbio, por exemplo, causa, exacerba ou de outro modo está envolvida em tal doença, condição, ou distúrbio. Doenças e condições exemplares podem incluir doenças ou condições associadas com malignidade ou transformação de células (por exemplo, câncer), doença autoimune ou inflamatória, ou uma doença infecciosa, por exemplo, causada por uma bactéria, vírus ou outro patógeno. Antígenos exemplares, que incluem antígenos associados com várias doenças e condições que podem ser tratadas, são descritos acima. Em modalidades particulares, o receptor de

antígeno quimérico ou TCR transgênico especificamente se liga a um antígeno associado com a doença ou condição.

[0485] Entre as doenças, condições, e distúrbios estão tumores, incluindo tumores sólidos, malignidades hematológicas, e melanomas, e incluindo tumores localizados e metastáticos, doenças infecciosas, tais como infecção por um vírus ou outro patógeno, por exemplo, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV, e doença parasitária, e doenças autoimunes e inflamatórias. Em algumas modalidades, a 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 mielóide aguda (ou mielogênica) (AML), leucemia mielóide crônica (ou mielogênica) (CML), leucemia linfocítica aguda (ou linfobástica) (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de célula pilosa (HCL), linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma de zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de não Hodgkin (NHL), linfoma anaplásico de célula grande (ALCL), linfoma folicular, linfoma folicular refratário, linfoma de célula B grande difuso (DLBCL) e mieloma múltiplo (MM). Em algumas modalidades, doença ou condição é uma malignidade de célula B selecionada dentre leucemia linfoblástica aguda (ALL), ALL adulta, leucemia linfoblástica crônica (CLL), linfoma de não Hodgkin (NHL), e Linfoma de Célula B Grande Difuso (DLBCL). Em algumas modalidades, a doença ou condição é NHL e o NHL é selecionado do grupo que consiste em NHL agressivo, linfoma de célula B grande difuso (DLBCL), NOS (de novo e transformado de indolente), linfoma de célula B grande mediastinal primário (PMBCL), linfoma de célula B grande rica em célula T / histócitos (TCHRBCL), linfoma de Burkitt, linfoma de célula do manto (MCL), e/ou linfoma folicular (FL), opcionalmente, linfoma folicular grau 3B (FL3B). Em alguns aspectos, o receptor recombinante, tal como um

CAR, especificamente se liga a um antígeno associado com a doença ou condição ou expresso em células do ambiente de uma lesão associada com a malignidade de célula B. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados com uma malignidade de célula B, tal como qualquer um de diversos marcadores de célula B conhecidos. Em algumas modalidades, o antígeno direcionado pelo receptor é CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, I κ , I λ , CD79a, CD79b ou CD30, ou combinações dos mesmos.

[0486] Em algumas modalidades, a doença ou condição é um mieloma, tal como um mieloma múltiplo. Em alguns aspectos, o receptor recombinante, tal como um CAR, especificamente se liga a um antígeno associado com a doença ou condição ou expresso em células do ambiente de uma lesão associada com o mieloma múltiplo. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados com mieloma múltiplo. Em alguns aspectos, o antígeno, por exemplo, o segundo antígeno ou antígeno adicional, tal como o antígeno específico de doença e/ou antígeno relacionado, é expresso em mieloma múltiplo, tal como antígeno de maturação de célula B (BCMA), membro D do grupo 5 da classe C do receptor acoplado à proteína G (GPCR5D), CD38 (ADP ribose hidrolase cíclica), CD138 (sindecano-1, sindecano, SYN-1), CS-1 (CS1, subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319, e 19A24), BAFF-R, TACI e/ou FcRH5. Outros antígenos de mieloma múltiplo exemplares incluem CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β 2-Microglobulina, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1, e o receptor tipo IIA de ativina (ActRIIA). Veja Benson e Byrd, *J. Clin. Oncol.* (2012) 30(16): 2013-15; Tao e Anderson, *Bone Marrow Research* (2011):924058; Chu *et al.*, *Leukemia* (2013) 28(4):917-27; Garfall *et al.*, *Discov Med.* (2014) 17(91):37-46. Em algumas modalidades, os antígenos incluem aqueles

presentes em tumores linfóides, mieloma, linfoma associado à AIDS, e/ou linfoproliferações pós-transplante, tais como CD38. Anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, direcionados a tais antígenos são conhecidos e incluem, por exemplo, aqueles descritos em Patente Norteamericana No. 8,153,765; 8,603,477, 8,008,450; Pub. Norteamericana No. US20120189622 ou US20100260748; e/ou Publicação de PCT Internacional Nos. WO2006099875, WO2009080829 ou WO2012092612 ou WO2014210064. Em algumas modalidades, tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos (por exemplo, scFv) estão contidos em anticorpos multiespecíficos, receptores quiméricos multiespecíficos, tais como CARs multiespecíficos, e/ou células multispecíficas.

[0487] Em algumas modalidades, a doença ou condição é uma doença ou condição infecciosa, tal como, mas não limitada a, infecções virais, retrovirais, bacterianas, e por protozoários, imunodeficiência, citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), adenovírus, poliomavírus BK. Em algumas modalidades, a doença ou condição é uma doença ou condição autoimune ou inflamatória, tal como artrite, por exemplo, artrite reumatóide (RA), diabetes tipo I, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), doença intestinal inflamatória, psoríase, esclerodermia, doença autoimune da tireóide, doença de Grave, doença de Crohn, esclerose múltipla, asma, e/ou uma doença ou condição associada com transplante.

[0488] Em algumas modalidades, o antígeno associado com a doença ou distúrbio é selecionado dentre $\alpha\beta6$ integrina (avb6 integrina), antígeno de maturação de célula B (BCMA), B7-H6, anidrase 9 carbônica (CA9, também conhecida como CAIX ou G250), um antígeno de testículos de câncer, câncer / antígeno de testículos 1B (CTAG, também conhecido como NY-ESO-1 e LAGE-2), antígeno carcinoembriônico (CEA), uma ciclina, ciclina A2, Ligante 1 de

Quimiocina de *Motif* C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, proteína de fator de crescimento epidérmico (EGFR), proteína de fator de crescimento epidérmico truncada (tEGFR), mutação de receptor de fator de crescimento epidérmico tipo III (EGFR vIII), glicoproteína 2 epitelial (EPG-2), glicoproteína 40 epitelial (EPG-40), efrinaB2, receptor A2 de efrina (EPHa2), receptor de estrogênio, receptor de Fc tipo 5 (FCRL5; também conhecido como Homólogo 5 de receptor Fc ou FCRH5), receptor de acetilcolina fetal (AChR fetal), uma proteína de ligação de folato (FBP), receptor alfa de folato, receptor de acetilcolina fetal, gangliosídeo GD2, GD2 O-acetilado (OGD2), gangliosídeo GD3, glicoproteína 100 (gp100), Her2/neu (erbB2 de tirosina cinase receptora), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), dímeros erbB, antígeno associado com melanoma de alto peso molecular humano (HMW-MAA), antígeno de superfície de hepatite B, Antígeno A1 de leucócito humano (HLA-AI), Antígeno A2 de leucócito humano (HLA-A2), Receptor alfa de IL-22 (IL-22Ra), receptor alfa 2 de IL-13(IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve kappa, Molécula de adesão de célula L1 (L1CAM), Epítipo CE7 de L1-CAM, Membro A da Família 8 contendo Repetição Rica em Leucina (LRRC8A), Lewis Y, Antígeno associado com melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, mesotelina, c-Met, citomegalovírus de murino (CMV), mucina 1 (MUC1), MUC16, ligantes do membro D de grupo 2 exterminador natural (NKG2D), melano A (MART-1), molécula de adesão de célula neural (NCAM), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), receptor de progesterona, um antígeno específico da próstata, antígeno de célula tronco da próstata (PSCA), antígeno de membrana específica da próstata (PSMA), Receptor 1 Órfão Tipo Tirosina Cinase Receptora (ROR1), survivina, Glicoproteína de trofoblasto (TPBG também

conhecido como 5T4), glicoproteína 72 associada a tumor (TAG72), receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), Tumor Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno, ou um antígeno associado com um marcador universal, e/ou moléculas biotinizadas, e/ou moléculas expressas por HIV, HCV, HBV ou outros patógenos. Antígenos direcionados pelos receptores em algumas modalidades incluem antígenos associados com uma malignidade de célula B, tal como qualquer um de diversos marcadores de célula B conhecidos. Em algumas modalidades, o antígeno direcionado pelo receptor é CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b ou CD30. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno específico de patógeno. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno viral (tal como um antígeno viral de HIV, HCV, HBV, etc.), antígenos bacterianos, e/ou antígenos parasitários.

[0489] Em algumas modalidades, a terapia celular, por exemplo, terapia de célula T adotiva, é realizada por transferência autóloga, em que as células são isoladas e/ou de outro modo preparadas do indivíduo que deve receber a terapia celular, ou de uma amostra derivada de tal indivíduo. Desse modo, em alguns aspectos, as células são derivadas de um indivíduo, por exemplo, paciente, em necessidade de um tratamento e as células, após isolamento e processamento são administradas ao mesmo indivíduo.

[0490] Em algumas modalidades, a terapia celular, por exemplo, terapia de célula T adotiva, é realizada por transferência alogênica, em que as células são isoladas e/ou de outro modo preparadas de um indivíduo que não um indivíduo que deve receber ou que finalmente recebe a terapia celular, por exemplo, um primeiro indivíduo. Em tais modalidades, as células em seguida são administradas a um indivíduo diferente, por exemplo, um segundo indivíduo, da mesma espécie. Em

algumas modalidades, os primeiro e segundo indivíduos são geneticamente idênticos. Em algumas modalidades, o primeiro e segundo indivíduos são geneticamente similares. Em algumas modalidades, o segundo indivíduo expressa a mesma classe de HLA ou subtipo como o primeiro indivíduo.

[0491] As células, por exemplo, células modificadas geradas por um método fornecido na Seção I, podem ser administradas por quaisquer meios adequados. Em modalidades particulares, células de duas ou mais composições de saída separadas, por exemplo, composições de células T enriquecidas produzidas pelos métodos descritos na Seção-I, são combinadas em uma única composição de células para serem administradas. Em certas modalidades, as células de composições de saída separadas são cada uma administradas separadamente ao indivíduo. Em certas modalidades, células T CD4+ são administradas separadamente de células T CD8+.

[0492] Em algumas modalidades as células podem ser administradas infusão por bolus, por injeção, por exemplo, injeções intravenosas ou subcutâneas, injeção intraocular, injeção periocular, injeção subretinal, injeção intravítrea, injeção trans-septal, injeção subescleral, injeção intracoroidal, injeção intracamerar, injeção subconjuntival, injeção subtenoniana, injeção retrobulbar, injeção peribulbar, ou liberação justaescleral posterior. Em algumas modalidades, elas são administradas por administração parenteral, intrapulmonar, e intranasal, e, se desejado, para tratamento local, intralesional. Infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, ou subcutânea. Em algumas modalidades, uma determinada dose é administrada por administração por bolus única das células. Em algumas modalidades, ela é administrada por múltiplas administrações por bolus das células, por exemplo, durante um período de não mais do que 3 dias, ou por

administração por infusão contínua das células. Em algumas modalidades, administração da dose de célula ou quaisquer terapias adicionais, por exemplo, a terapia de linfodepleção, terapia de intervenção e/ou terapia de combinação, é realizada por meio de liberação ambulatorial.

[0493] Para a prevenção ou tratamento de doença, a dosagem apropriada pode depender do tipo de doença a ser tratada, o tipo de células ou receptores recombinantes, a severidade e curso da doença, se as células são administradas para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, o histórico clínico do indivíduo e resposta às células, e o critério do médico assistente. As composições e células são em algumas modalidades adequadamente administradas ao indivíduo de uma só vez ou durante uma série de tratamentos.

[0494] Em algumas modalidades, as células são administradas como parte de um tratamento de combinação, tal como simultaneamente com ou sequencialmente com, em qualquer ordem, outra intervenção terapêutica, tal como um anticorpo ou célula modificada ou receptor ou agente, tais como um agente citotóxico ou terapêutico. As células em algumas modalidades são coadministradas com uma ou mais agentes terapêuticos adicionais ou em conexão com outra intervenção terapêutica, simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem. Em alguns contextos, as células são coadministradas com outra terapia suficientemente perto no tempo de modo que as populações celulares realçam o efeito de um ou mais agentes terapêuticos adicionais, ou vice-versa. Em algumas modalidades, as células são administradas antes de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, as células são administradas após um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades, um ou mais agentes adicionais incluem uma citocina, tal como IL-2, por exemplo, para realçar persistência. Em algumas

modalidades, os métodos compreendem administração de um agente quimioterápico.

[0495] Em algumas modalidades, os métodos compreendem administração de um agente quimioterápico, por exemplo, um agente quimioterápico de condicionamento, por exemplo, para reduzir carga tumoral antes da administração.

[0496] Indivíduos pré-recondicionantes com terapias de imunodepleção (por exemplo, linfodepleção) em alguns aspectos podem melhorar os efeitos de terapia celular adotiva (ACT).

[0497] Desse modo, em algumas modalidades, os métodos incluem administrar um agente pré-condicionante, tal como um agente de linfodepleção ou quimioterápico, tal como ciclofosfamida, fludarabina, ou combinações dos mesmos, a um indivíduo antes do início da terapia celular. Por exemplo, ao indivíduo pode ser administrado um agente pré-condicionante pelo menos 2 dias antes, tal como pelo menos 3, 4, 5, 6, ou 7 dias antes, do início da terapia celular. Em algumas modalidades, ao indivíduo é administrado um agente pré-condicionante não mais do que 7 dias antes, tal como não mais do que 6, 5, 4, 3, ou 2 dias antes, do início da terapia celular.

[0498] Em algumas modalidades, o indivíduo é pré-condicionado com ciclofosfamida em uma dose entre ou entre cerca de 20 mg / kg e 100 mg / kg, tal como entre ou entre cerca de 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 modalidades, a ciclofosfamida pode ser administrada em uma dose única ou pode ser administrada em uma pluralidade in uma pluralidade doses de doses, tal como determinado diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida é administrada uma vez ao dia por um ou dois dias. Em algumas modalidades, onde o agente de linfodepleção compreende ciclofosfamida, ao indivíduo é administrada

ciclofosfamida em uma dose entre ou entre cerca de 100 mg / m² e 500 mg / m², tal como entre ou entre cerca de 200 mg / m² e 400 mg / m², ou 250 mg / m² e 350 mg / m², inclusive. Em alguns casos, ao indivíduo é administrado cerca de 300 mg / m² de ciclofosfamida. Em algumas modalidades, a ciclofosfamida pode ser administrada em uma dose única ou pode ser administrada em várias doses, tal como determinado diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas modalidades, ciclofosfamida é administrada diariamente, tal como durante 1 a 5 dias, por exemplo, durante 3 a 5 dias. Em alguns casos, ao indivíduo é administrado cerca de 300 mg / m² de ciclofosfamida, diariamente durante 3 dias, antes do início da terapia celular.

[0499] Em algumas modalidades, onde o agente de linfodepleção compreende fludarabina, ao indivíduo é administrado fludarabina em uma dose entre ou entre cerca de 1 mg / m² e 100 mg / m², tal como entre ou entre cerca de 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, ao indivíduo é administrado cerca de 30 mg / m² de fludarabina. Em algumas modalidades, a fludarabina pode ser administrada em uma dose única ou pode ser administrada em várias doses, tal como determinado diariamente, a cada dois dias ou a cada três dias. Em algumas modalidades, fludarabina é administrada diariamente, tal como durante 1 a 5 dias, por exemplo, durante 3 a 5 dias. Em alguns casos, ao indivíduo é administrado cerca de 30 mg / m² de fludarabina, diariamente durante 3 dias, antes do início da terapia celular.

[0500] Em algumas modalidades, o agente de linfodepleção 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, tal como aquele descrito acima, e fludarabina em

qualquer dose ou esquema de administração, tal como aquele descrito acima. Por exemplo, em alguns aspectos, ao indivíduo é administrado 60 mg / kg (~2 g / m²) de ciclofosfamida e 3 a 5 doses de 25 mg / m² de fludarabina antes da primeira dose ou dose subsequente.

[0501] Após administração das células, a atividade biológica das populações de células modificadas em algumas modalidades é medida, por exemplo, por qualquer um de diversos métodos conhecidos. Parâmetros para avaliar incluem ligação específica de uma célula T modificada ou natural ou outra célula imune ao antígeno, *in vivo*, por exemplo, por imageamento, ou *ex vivo*, por exemplo, por ELISA ou citometria de fluxo. Em certas modalidades, a capacidade das células modificadas de destruir células direcionadas pode ser medida usando quaisquer métodos conhecidos adequados, tais como ensaios de citotoxicidade descritos em, por exemplo, Kochenderfer *et al.*, *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009), e Herman *et al.* *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). Em certas modalidades, a atividade biológica das células é medida avaliando expressão e/ou secreção de uma ou mais citocinas, tais como CD107a, IFN γ , IL-2, e TNF. Em alguns aspectos a atividade biológica é medida avaliando resultado clínico, tal como redução na carga tumoral ou carga.

[0502] Em certas modalidades, as células modificadas são também modificadas 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 diretamente ou indiretamente através de um ligante a uma porção de direcionamento. A prática de conjugação de compostos, por exemplo, o CAR ou TCR, a porções de direcionamento é conhecida. Veja, por exemplo, Wadwa *et al.*, *J. Drug Targeting* 3: 1 1 1 (1995), e Patente Norteamericana 5,087,616.

[0503] Em algumas modalidades, a dose de células é administrada

a indivíduos de acordo com os métodos fornecidos, e/ou com as composições ou artigos de fabricação fornecidos. Em algumas modalidades, o tamanho ou tempo das doses é determinado como uma função da doença ou condição em particular no indivíduo. Em alguns casos, o tamanho ou tempo das doses para uma doença particular tendo em vista a descrição fornecida pode ser empiricamente determinada.

[0504] Em algumas modalidades, 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, tal 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 a ou cerca de 6×10^5 das células / kg e a ou cerca de 8×10^5 das células / kg. Em algumas modalidades, a dose de células compreende não mais do que 2×10^5 das células (por exemplo, células expressando antígeno, tal como expressando CAR) por quilograma de peso corporal do indivíduo (células / kg), tais 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. Em algumas modalidades, a dose de células compreende pelo menos ou pelo menos cerca de ou a ou cerca de 2×10^5 células (por exemplo, células expressando antígeno, tal como expressando CAR) por quilograma de peso corporal do indivíduo (células / kg), tal como pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 3×10^5 células / kg, pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 4×10^5 células / kg, pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 5×10^5 células / kg, pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de $6 \times$

10^5 células / kg, pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 7×10^5 células / kg, pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 8×10^5 células / kg, pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 9×10^5 células / kg, pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 1×10^6 células / kg, ou pelo menos ou pelo menos cerca de, ou a, ou cerca de 2×10^6 células / kg.

[0505] Em certas modalidades, as células, ou populações individuais de subtipos de células, são administradas ao indivíduo em uma faixa de cerca de um milhões a cerca de 100 bilhões de células e/ou essa quantidade de células por quilograma de peso corporal, tal como, por exemplo, 1 milhões a cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, cerca de 5 milhões de células, cerca de 25 milhões de células, cerca de 500 milhões de células, cerca de 1 bilhões de células, cerca de 5 bilhões de células, cerca de 20 bilhões de células, cerca de 30 bilhões de células, cerca de 40 bilhões de células, ou uma faixa definida por quaisquer dos dois valores anteriores), tal como cerca de 10 milhões a cerca de 100 bilhões de células (por exemplo, cerca de 20 milhões de células, cerca de 30 milhões de células, cerca de 40 milhões de células, cerca de 60 milhões de células, cerca de 70 milhões de células, cerca de 80 milhões de células, cerca de 90 milhões de células, cerca de 10 bilhões de células, cerca de 25 bilhões de células, cerca de 50 bilhões de células, cerca de 75 bilhões de células, cerca de 90 bilhões de células, ou uma faixa definida por quaisquer dos dois valores anteriores), e em alguns casos cerca de 100 milhões de células a cerca de 50 bilhões de células (por exemplo, cerca de 120 milhões de células, cerca de 250 milhões de células, cerca de 350 milhões de células, cerca de 450 milhões de células, cerca de 650 milhões de células, cerca de 800 milhões de células, cerca de 900 milhões de células, cerca de 3 bilhões de células, cerca de 30 bilhões de células, cerca de 45 bilhões de células) ou qualquer valor entre essas faixas e/ou por quilograma de

peso corporal. Dosagens podem variar dependendo dos atributos particulares para uma doença ou distúrbio e/ou paciente e/ou outros tratamentos.

[0506] Em algumas modalidades, a dose de células é uma dose plana de células ou dose fixada de células de modo que a dose de células não está vinculada ou baseada na área de superfície corporal ou peso de um indivíduo.

[0507] Em algumas modalidades, por exemplo, onde o indivíduo é um humano, a dose inclui menos que cerca de 1×10^8 de células expressando receptor recombinante total (por exemplo, CAR), células T, ou células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), por exemplo, na faixa de cerca de 1×10^6 a 1×10^8 de tais células, tal como 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , ou 1×10^8 de células totais, ou a faixa entre qualquer um dos dois valores anteriores. Em algumas modalidades, onde o indivíduo é um humano, a dose inclui entre cerca de 1×10^6 e 3×10^8 de células expressando receptor recombinante total (por exemplo, CAR), por exemplo, na faixa de cerca de 1×10^7 a 2×10^8 de tais células, tal como 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 ou $1,5 \times 10^8$ de tais células totais, ou a faixa entre qualquer um dos dois valores anteriores. Em algumas modalidades, ao paciente são administradas múltiplas doses, e cada uma das doses ou a dose total pode estar dentro de quaisquer valores anteriores. Em algumas modalidades, a dose de células compreende a administração de, ou de cerca de 1×10^5 a 5×10^8 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, 1×10^5 a 1×10^8 de células T expressando receptor recombinante total ou célula T total, de, ou de cerca de 5×10^5 a 1×10^7 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, ou de, ou de cerca de 1×10^6 a 1×10^7 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, cada inclusive.

[0508] Em algumas modalidades, as células T da dose incluem

células T CD4+, células T CD8+ ou CD4+ e células T CD8+.

[0509] Em algumas modalidades, por exemplo, onde o indivíduo é humano, as células T CD8+ da dose, incluindo na dose incluindo células T CD4+ e CD8+, inclui entre cerca de 1×10^6 e 1×10^8 de células CD8+ expressando receptor recombinante total (por exemplo, CAR), por exemplo, na faixa de cerca de 5×10^6 a 1×10^8 de tais células, tais células 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$ ou 1×10^8 de tais células totais, ou a faixa entre qualquer um dos dois valores anteriores. Em algumas modalidades, ao paciente são administradas múltiplas doses, e cada uma das doses ou a dose total pode incluir-se em qualquer um dos valores anteriormente mencionados. Em algumas modalidades, a dose de células compreende a administração de, ou de cerca de 1×10^7 a $0,75 \times 10^8$ de células T CD8+ expressando receptor recombinante total, 1×10^7 a $2,5 \times 10^7$ de células T CD8+ expressando receptor recombinante total, de, ou de cerca de 1×10^7 a $0,75 \times 10^8$ de células T CD8+ expressando receptor recombinante total, cada inclusive. Em algumas modalidades, a dose de células compreende a administração de ou cerca de 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$ ou 1×10^8 de células T CD8+ expressando receptor recombinante total.

[0510] Em algumas modalidades, a dose de células, por exemplo, células T expressando receptor recombinante, é administrada ao indivíduo como uma única dose ou é administrada apenas uma vez dentro de um período de duas semanas, um mês, três meses, seis meses, 1 ano ou mais.

[0511] No contexto de terapia celular adotiva, administração de uma determinada "dose" abrange administração da determinada quantidade ou número de células como uma única composição e/ou única administração ininterrupta, por exemplo, como uma única injeção ou infusão contínua, e também abrange administração da determinada quantidade ou número de células como uma dose dividida ou como

várias composições, fornecida em múltiplas composições individuais ou infusões, durante um período de tempo especificado, tal como durante não mais do que 3 dias. Desse modo, em alguns contextos, a dose é uma administração única ou contínua do número especificado, determinado ou iniciado de células em um único ponto no tempo. Em alguns contextos, entretanto, a dose é administrada em múltiplas injeções ou infusões durante um período de não mais do que três dias, tais como uma vez por dia durante três dias ou durante dois dias ou por múltiplas infusões durante um único período de dias.

[0512] Desse modo, em alguns aspectos, as células da dose são administradas em uma única composição farmacêutica. Em algumas modalidades, as células da dose são administradas em várias composições, coletivamente contendo as células da dose.

[0513] Em algumas modalidades, o termo “dose dividida” refere-se a uma dose que é dividida de modo que ela é administrada durante mais do que um dia. Este tipo de dosagem é englobado pelos métodos presentes e é considerado ser uma dose única.

[0514] Desse modo, a dose de células pode ser administrada como uma dose dividida, por exemplo, uma dose dividida administrada durante um tempo. Por exemplo, em algumas modalidades, a dose pode ser administrada ao indivíduo durante 2 dias ou durante 3 dias. Métodos exemplares para dosagem dividida incluem administrar 25% da dose no primeiro dia e administrar os 75% restantes da dose no segundo dia. Em outras modalidades, 33% da dose podem ser administrados no primeiro dia e os 67% restantes administrados no segundo dia. Em alguns aspectos, 10% da dose é administrado no primeiro dia, 30% da dose é administrada no segundo dia, e 60% da dose é administrado no terceiro dia. Em algumas modalidades, a dose dividida não está espalhada por mais de 3 dias.

[0515] Em algumas modalidades, células da dose podem ser

administradas por administração de diversas composições ou soluções, tais 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 diferente população e/ou subtipos de células, é administrada separadamente ou independentemente, opcionalmente dentro de um certo período de tempo. Por exemplo, as populações ou subtipos de células podem incluir células T CD8+ e CD4+, respectivamente, e/ou populações enriquecidas por CD8+- e CD4+, respectivamente, por exemplo, células T CD4+ e/ou CD8+ cada qual individualmente incluindo células geneticamente modificadas para expressar o receptor recombinante. Em algumas modalidades, a administração da dose compreende a administração de uma composição compreendendo a dose de células T CD8+ ou uma dose de células T CD4+ e administração de uma segunda composição compreendendo a outra dose de células T CD4+ e as células T CD8+.

[0516] Em algumas modalidades, a administração da composição ou dose, por exemplo, administração da pluralidade de composições celulares, envolve administração das composições celulares separadamente. Em algumas modalidades, as composições celulares são composições de saída separadas produzidas pelos métodos descritos na Seção I. Em alguns aspectos, as administrações separadas são realizadas simultaneamente, ou sequencialmente, em qualquer ordem. Em algumas modalidades, a dose compreende uma primeira composição e uma segunda composição, e a primeira composição e segunda composição são administradas com 0 a 12 horas de intervalo, 0 a 6 horas de intervalo ou 0 a 2 horas de intervalo. Em algumas modalidades, o início de administração da primeira composição e o início de administração da segunda composição são realizados com não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, ou não mais do que 30

minutos de intervalo, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo. Em algumas modalidades, o início e/ou conclusão de administração da primeira composição e a conclusão e/ou início de administração da segunda composição são realizados com não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, ou não mais do que 30 minutos de intervalo, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo.

[0517] Em alguma composição, a primeira composição, por exemplo, primeira composição da dose, compreende células T CD4+. Em alguma composição, a primeira composição, por exemplo, primeira composição da dose, compreende células T CD8+. Em algumas modalidades, a primeira composição é administrada antes da segunda composição.

[0518] Em algumas modalidades, a dose ou composição de células inclui uma relação definida ou direcionada de células T CD4+ expressando um receptor recombinante para células T CD8+ expressando um receptor recombinante e/ou de células T CD4+ para células T CD8+, cuja relação opcionalmente é aproximadamente de 1 : 1 ou é entre aproximadamente 1 : 3 e aproximadamente 3 : 1, tal como aproximadamente 1 : 1. Em alguns aspectos, a administração de uma composição ou dose com a relação direcionada ou desejada de populações celulares diferentes (tal como relação de CD4+ : CD8+ ou relação de CAR+CD4+ : CAR+CD8+, por exemplo, de 1 : 1) envolve a administração de uma composição celular contendo uma das populações e em seguida administração de uma composição celular separada compreendendo as outras populações, onde a administração está em ou aproximadamente na relação direcionada ou desejada. Em alguns aspectos, administração da dose ou composição de células em uma relação definição leva a expansão melhorada, persistência e/ou

atividade antitumor da terapia de célula T.

[0519] Em algumas modalidades, o indivíduo recebe múltiplas doses, por exemplo, duas ou mais doses ou múltiplas doses consecutivas, das células. Em algumas modalidades, duas doses são administradas a um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo recebe a dose consecutiva, por exemplo, a segunda dose, é administrada aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 dias após a primeira dose. Em algumas modalidades, múltiplas doses consecutivas são administradas após a primeira dose, de modo que uma dose adicional ou doses são administradas após administração da dose consecutiva. Em alguns aspectos, o número de células administradas ao indivíduo na dose adicional é o mesmo como ou similar à primeira dose e/ou dose consecutiva. Em algumas modalidades, a dose adicional ou doses são maiores do que as doses anteriores.

[0520] Em alguns aspectos, o tamanho da primeira e/ou dose consecutiva é determinado com base em uma ou mais critérios tal como resposta do indivíduo antes do tratamento, por exemplo, quimioterapia, carga de doença no indivíduo, tal como carga de tumor, volume, tamanho ou grau, extensão, ou tipo de metástase, estágio, e/ou probabilidade ou incidência do indivíduo desenvolvendo resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófago, síndrome de lise de tumor, neurotoxicidade, e/ou uma resposta imune do hospedeiro contra as células e/ou receptores recombinantes sendo administrado.

[0521] Em alguns aspectos, o tempo entre a administração da primeira dose e a administração da dose consecutiva é de cerca de 9 a cerca de 35 dias, cerca de 14 a cerca de 28 dias, ou 15 a 27 dias. Em algumas modalidades, a administração da dose consecutiva está em um ponto de tempo maior do que cerca de 14 dias após e menos do que

cerca de 28 dias após a administração da primeira dose. Em alguns aspectos, o tempo entre a primeira dose e dose consecutiva é de cerca de 21 dias. Em algumas modalidades, uma dose adicional ou doses, por exemplo, doses consecutivas, são administradas após administração da dose consecutiva. Em alguns aspectos, a dose consecutiva adicional ou doses são administradas pelo menos cerca de 14 e menos do que cerca de 28 dias após administração da dose anterior. Em algumas modalidades, a dose adicional é administrada menos do que cerca de 14 dias após a dose anterior, por exemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou 13 dias após a dose anterior. Em algumas modalidades, nenhuma dose é administrada menos do que 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.

[0522] Em algumas modalidades, a dose de células, por exemplo, células expressando receptor recombinante, compreende duas doses (por exemplo, uma dose dupla), compreendendo uma primeira dose das células T e a dose consecutiva das células T, em que uma ou ambas da primeira dose e a segunda dose compreende administração da dose dividida de células T.

[0523] Em algumas modalidades, a dose de células é geralmente grande o suficiente para ser eficaz na redução da carga de doença.

[0524] Em algumas modalidades, as células são administradas em uma dosagem desejada, que em alguns aspectos inclui uma dose desejada ou número de células ou tipos de célula e/ou uma relação desejada de tipos de célula. Desse modo, a dosagem de células em algumas modalidades é baseada em um número total de células (ou número por kg de peso corporal) e uma relação desejada das populações individuais ou subtipos, tal como a relação de CD4+ para CD8+. Em algumas modalidades, a dosagem de células é baseada em um número total desejado (ou número por kg de peso corporal) de

células nas populações individuais ou de tipos celulares individuais. Em algumas modalidades, a dosagem é baseada em uma combinação de tais características, tais como um número desejado de células totais, relação desejada, e número de células totais desejado nas populações individuais.

[0525] Em algumas modalidades, as populações ou subtipos de células, tais como células T CD8⁺ e CD4⁺, são administradas em ou dentro de uma diferença tolerada de uma dose desejada células totais, tal 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 a quem as células são administradas, por exemplo, células / kg. Em alguns aspectos, a dose desejada está em ou acima de 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 individuais ou subtipos estão presentes em ou próximos a uma relação de saída desejada (tal como relação de CD4⁺ para CD8⁺), por exemplo, dentro de uma certa diferença tolerada ou erro de tal relação.

[0526] Em algumas modalidades, as células são administradas em ou dentro de uma diferença tolerada de uma dose desejada de uma ou mais das populações individuais ou subtipos de células, tais como uma dose desejada de células T CD4⁺ e/ou uma dose desejada de células T CD8⁺. Em alguns aspectos, a dose desejada é um número desejado de células do subtipo ou população, ou um número desejado de tais células por unidade de peso corporal do indivíduo a quem as células são administradas, por exemplo, células / kg. Em alguns aspectos, a dose desejada está em ou acima de um número mínimo de células da população ou subtipo, ou número mínimo de células da população ou subtipo por unidade de peso corporal.

[0527] Desse modo, em algumas modalidades, a dosagem é baseada em uma dose fixada desejada de células totais e uma relação desejada, e/ou baseada em uma dose fixada desejada de um ou mais, por exemplo, cada, dos subtipos individuais ou subpopulações. Desse modo, em algumas modalidades, a dosagem é baseada em uma dose fixada desejada ou mínima de células T e uma relação desejada de células T CD4⁺ para CD8⁺, e/ou é baseada em uma dose fixada desejada ou mínima de células T CD4⁺ e/ou CD8⁺.

[0528] Em algumas modalidades, as células são administradas em ou dentro de uma faixa tolerada de uma relação de saída desejada de múltiplas populações celulares ou subtipos, tais como células T CD4⁺ e CD8⁺ ou subtipos. Em alguns aspectos, a relação desejada pode ser uma relação específica ou pode ser uma faixa de relações. Por exemplo, em algumas modalidades, a relação desejada (por exemplo, relação de células T CD4⁺ para T CD8⁺) está entre em ou cerca de 5 : 1 e em ou cerca de 5 : 1 (ou mais do que cerca de 1 : 5 e menos do que cerca de 5 : 1), ou entre em ou cerca de 1 : 3 e em ou cerca de 3 : 1 (ou mais do que cerca de 1 : 3 e menos do que cerca de 3 : 1), tal como entre em ou cerca de 2 : 1 e em ou cerca de 1 : 5 (ou maior do que cerca de 1 : 5 e menos do que cerca de 2 : 1, tais como em ou cerca de 5 : 1, 4,5 : 1, 4 : 1, 3,5 : 1, 3 : 1, 2,5 : 1, 2 : 1, 1,9 : 1, 1,8 : 1, 1,7 : 1, 1,6 : 1, 1,5 : 1, 1,4 : 1, 1,3 : 1, 1,2 : 1, 1,1 : 1, 1 : 1, 1 : 1,1, 1 : 1,2, 1 : 1,3, 1 : 1,4, 1 : 1,5, 1 : 1,6, 1 : 1,7, 1 : 1,8, 1 : 1,9 : 1 : 2, 1 : 2,5, 1 : 3, 1 : 3,5, 1 : 4, 1 : 4,5, ou 1 : 5. Em alguns aspectos, a diferença tolerada 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 essas faixas. Em certas modalidades, as composições de células T CD4⁺ enriquecidas e células T CD8⁺ enriquecidas são combinadas na relação desejada e

administradas ao indivíduo como uma única composição celular. Em uma modalidade particular, as composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são administradas as composições separadas na relação desejada.

[0529] Em modalidades particulares, os números e/ou concentrações de células referem ao número de células expressando receptor recombinante (por exemplo, CAR). Em outras modalidades, os números e/ou concentrações de células referem-se ao número ou concentração de todas as células, células T, ou células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) administrado.

[0530] Em alguns aspectos, o tamanho da dose é determinado baseado em um ou mais critérios tais como resposta do indivíduo antes do tratamento, por exemplo, quimioterapia, carga de doença no indivíduo, tal como carga tumoral, volume, tamanho, ou grau, extensão, ou tipo de metástase, estágio, e/ou probabilidade ou incidência do indivíduo desenvolvendo resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófago, síndrome de lise de tumor, neurotoxicidade, e/ou uma resposta imune do hospedeiro às células e/ou receptores recombinantes que estão sendo administrados.

[0531] Em algumas modalidades, os métodos também incluem administrar uma ou mais doses adicionais de células expressando um receptor de antígeno quimérico (CAR) e/ou terapia de linfodepleção, e/ou uma ou mais etapas dos métodos são repetidos. Em algumas modalidades, uma ou mais doses adicionais são a mesma como a dose inicial. Em algumas modalidades, uma ou mais dose adicional é diferente da dose inicial, por exemplo, maior, tal como 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes ou maior do que a dose inicial, ou inferior, tal como, por exemplo, maior, tal como 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes ou 10 vezes ou maior do que a dose inicial. Em algumas

modalidades, administração de uma ou mais doses adicionais é determinada baseada na resposta do indivíduo para o tratamento inicial ou qualquer tratamento anterior, carga de doença no indivíduo, tal como carga tumoral, volume, tamanho, grau ou extensão, ou tipo de metástase, estágio, e/ou probabilidade ou incidência do indivíduo desenvolvendo resultados tóxicos, por exemplo, CRS, síndrome de ativação de macrófago, síndrome de lise de tumor, neurotoxicidade, e/ou uma resposta imune de hospedeiro às células e/ou receptores que estão sendo recombinantes sendo administrados.

ARTIGOS DE FABRICAÇÃO

[0532] São também fornecidos artigos de fabricação e kits contendo células modificadas expressando um receptor recombinante produzido pelos métodos fornecidos aqui, tais como os métodos aqui descritos, tal como na Seção I, por exemplo, as 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 aqui descritos, tal como na Seção III.

[0533] Em algumas modalidades, são fornecidos aqui artigos de fabricação e/ou kits que incluem uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer uma das células modificadas como aqui descrito, e instruções para administrar, a um indivíduo para tratar uma doença ou condição. Em algumas modalidades, as instruções podem especificar alguns ou todos os elementos dos métodos para administrar as células que são fornecidas aqui. Em algumas modalidades, as instruções especificam instruções particulares para administração das células para terapia celular, por exemplo, doses, cronometragem, seleção e/ou identificação de indivíduos para administração e condições para administração. Em algumas modalidades, os artigos de fabricação e/ou kits também compreendem um agente para terapia de linfodepleção, e

opcionalmente também inclui instruções para administrar a terapia de linfodepleção. Em algumas modalidades, as instruções podem ser incluídas como uma marcação ou bula acompanhando as composições para administração.

[0534] Em algumas modalidades, o artigo de fabricação pode ter um recipiente, opcionalmente um frasco, contendo uma composição de células T CD4+ enriquecidas expressando um receptor recombinante. Em algumas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende opcionalmente um segundo recipiente, opcionalmente um segundo frasco, contendo uma composição de células T CD8+ enriquecidas expressando um receptor recombinante. Em algumas modalidades, um crioprotetor é incluído nas células. Em alguns aspectos, o recipiente é um frasco ou um saco. Em algumas modalidades, o recipiente contém uma composição de células T CD4+ e CD8+ enriquecidas.

[0535] Em algumas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas dentro do recipiente inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD4+. Em certas modalidades, a composição do recipiente inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD4+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de células T CD4+ enriquecidas dentro do recipiente inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do

que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD8, e/ou não contém nenhuma célula T CD8+ e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD8+.

[0536] Em algumas modalidades, a composição de células T CD8+ enriquecidas dentro do recipiente inclui pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+. Em modalidades particulares, a composição com o recipiente inclui pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou em, ou a cerca de 100% de células T CD8+ que expressam o receptor recombinante e/ou foram transduzidas ou transfectadas com o polinucleotídeo recombinante. Em certas modalidades, a composição de saída de células T CD8+ enriquecidas que é administradas ao indivíduo inclui menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30%, menos do que 25%, menos do que 20%, menos do que 15%, menos do que 10%, menos do que 5%, menos do que 1%, menos do que 0,1%, ou menos do que 0,01% de células T CD4+, e/ou não contém nenhuma célula T CD4+, e/ou é livre ou substancialmente livre de células T CD4+.

[0537] Em algumas modalidades, as instruções especificam a dose de células a ser administrada. Por exemplo, em algumas modalidades, a dose especificada nas instruções inclui células expressando receptor recombinante total (por exemplo, CAR) entre cerca de 1×10^6 e 3×10^8 , por exemplo, na faixa de cerca de 1×10^7 a 2×10^8 de tais células, tal como 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 ou $1,5 \times 10^8$ de tais células totais, ou a faixa entre qualquer um dos dois valores anteriores. Em algumas modalidades, ao paciente são administradas múltiplas doses, e cada

uma das doses, ou a dose total pode incluir-se em qualquer um dos valores anteriormente mencionados.

[0538] Em algumas modalidades, o recipiente tal como o frasco compreende mais do que ou mais do que cerca de 10×10^6 de células T ou células T expressando receptor recombinante, mais do que ou mais do que cerca de 15×10^6 de células T ou células T expressando receptor recombinante, mais do que ou mais do que cerca de 25×10^6 de células T ou célula T expressando receptor recombinante. Em alguns aspectos, o frasco compreende entre cerca de 10 milhões de células por mL e cerca de 70 milhões células por ml, entre cerca de 10 milhões de células por mL e cerca de 50 milhões de células por ml, entre cerca de 10 milhões de células por mL e cerca de 25 milhões de células por ml, entre cerca de 10 milhões de células por mL e cerca de 15 milhões de células por ml, 15 milhões de células por mL e cerca de 70 milhões de células por ml, entre cerca de 15 milhões de células por mL e cerca de 50 milhões de células por ml, entre cerca de 15 milhões de células por mL e cerca de 25 milhões de células por ml, entre cerca de 25 milhões de células por mL e cerca de 70 milhões de células por ml, entre cerca de 25 milhões de células por mL e cerca de 50 milhões de células por ml, e entre cerca de 50 milhões de células por mL e cerca de 70 milhões de células por ml.

[0539] Em algumas modalidades, a pluralidade de frascos ou pluralidade de células ou dose unitária de células especificadas para administração, coletivamente, compreende a dose de células compreendendo de, ou de cerca de 1×10^5 a 5×10^8 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, 1×10^5 a 1×10^8 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, de, ou de cerca de 5×10^5 a 1×10^7 células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, ou de, ou de cerca de 1×10^6 a 1×10^7 de células T expressando receptor recombinante total ou

células T totais, cada inclusive. 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 ou cerca de 1×10^7 e em ou cerca de 2×10^8 células T expressando receptor recombinante, entre ou cerca de 5×10^7 e em ou cerca de $1,5 \times 10^8$ células T expressando receptor recombinante, em ou cerca de 5×10^7 células T expressando receptor recombinante, em ou cerca de 1×10^8 de células T expressando receptor recombinante, ou em ou cerca de $1,5 \times 10^8$ de células T expressando receptor recombinante, opcionalmente em que a informação técnica especifica administração de uma ou mais de várias doses unitárias e/ou um volume correspondendo a tais várias doses unitárias. Em alguns casos, o artigo compreende uma ou mais doses unitárias das células T CD8+, em que a dose compreende entre ou cerca de 5×10^6 e em ou cerca de 1×10^8 de células T CD8+ expressando receptor recombinante, a dose compreende entre em ou cerca de 1×10^7 e em ou cerca de $0,75 \times 10^8$ células expressando receptor recombinante T CD8+, a dose compreende em ou cerca de $2,5 \times 10^7$ de células T CD8+ expressando receptor recombinante, ou a dose compreende em ou cerca de 5×10^7 células T CD8+ expressando receptor recombinante, ou a dose compreende em ou cerca de $0,75 \times 10^8$ de células T CD8+ expressando receptor recombinante, opcionalmente em que a informação especifica administração de uma ou de várias doses unitárias e/ou um volume correspondendo a tal, ou várias doses unitárias. Em algumas modalidades, as células no artigo, coletivamente, compreendem a dose de células compreendendo não mais do que 1×10^8 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, não mais do que 1×10^7 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, não mais do que $0,5 \times 10^7$ de células T expressando receptor recombinante total

ou células T totais, não mais do que 1×10^6 de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais, não mais do que $0,5 \times 10^6$ de células T expressando receptor recombinante total ou células T totais.

[0540] Em algumas modalidades, as instruções podem especificar o regime de dosagem e cronometragem da administração. Por exemplo, em algumas modalidades, as instruções podem especificar administração ao indivíduo de múltiplas doses, por exemplo, duas ou mais doses, das células. Em algumas modalidades, as instruções especificam a cronometragem 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.

[0541] Em algumas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende uma composição de células T CD4+ enriquecidas expressando um receptor recombinante, e instruções para administrar, a um indivíduo tendo uma doença, toda ou uma porção da composição de células T CD4+ enriquecidas e também adicionar células T CD8+ expressando um receptor recombinante. Em algumas modalidades, as instruções especificam administrar as células T CD4+ antes de administrar as células T CD8+. Em alguns casos, as instruções especificam administrar as células T CD8+ antes de administrar as células T CD4+. Em algumas modalidades, o artigo de fabricação ou kit compreende uma pluralidade células T CD8+ expressando um receptor recombinante, e instruções para administrar, a um indivíduo tendo uma doença ou condição, toda ou uma porção da pluralidade de células T CD8+ e células T CD4+ expressando um receptor recombinante. Em algumas modalidades, as instruções especificam regime de dosagem e cronometragem da administração das células.

[0542] Em alguns aspectos, as instruções especificam administrar

todas ou uma porção das células T CD4+ e todas ou uma porção das células T CD8+ com 0 a 12 horas de intervalo, 0 a 6 horas de intervalo ou 0 a 2 horas de intervalo. Em alguns casos, as instruções especificam administrar as células T CD4+ e as células T CD8+ não mais do que 2 horas, não mais do que 1 hora, não mais do que 30 minutos, não mais do que 15 minutos, não mais do que 10 minutos ou não mais do que 5 minutos de intervalo.

[0543] Em algumas modalidades, as instruções especificam a dose ou número de células ou tipos celulares e/ou uma relação de tipos celulares, por exemplo, populações individuais ou subtipos, tais como a relação de CD4+ para CD8+. Em algumas modalidades, as populações ou subtipos de células, tais como células T CD8+ e CD4+. Por exemplo, em algumas modalidades, as instruções especificam que as células são administradas em ou dentro de uma faixa tolerada de uma relação de saída de múltiplas populações celulares ou subtipos, tais como células T CD4+ e CD8+ ou subtipos, dentre ou cerca de 5 : 1 e em ou cerca de 5 : 1 (ou maior do que cerca de 1 : 5 e menos do que cerca de 5 : 1), ou entre ou cerca de 1 : 3 e em ou cerca de 3 : 1 (ou maior do que cerca de 1 : 3 e menos do que cerca de 3 : 1), tal como entre ou cerca de 2 : 1 e em ou cerca de 1 : 5 (ou maior do que cerca de 1 : 5 e menos do que cerca de 2 : 1, tal como 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 modalidades, 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 única composição celular. Em modalidades particulares, as instruções especificam as composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são administradas às 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 nestas faixas.

VI. DEFINIÇÕES

[0544] A menos que de outro modo indicado, todos os termos de técnica, notações outros termos técnicos e científicos ou terminologia usada aqui se destinam a ter o mesmo significado como é comumente entendido por aqueles versados na técnica à qual o assunto reivindicado pertence. Em alguns casos, termos com significados comumente entendidos são definidos aqui para maior clareza e/ou para referência, e a inclusão de tais definições aqui não devem ser necessariamente construídas para representar uma diferença substancial sobre o que é geralmente entendido na técnica.

[0545] Os termos “polipeptídeo” e “proteína” são usados alternadamente para se referirem a um polímero de resíduos de aminoácido, e não são limitados a um tamanho mínimo. Polipeptídeos, incluindo os receptores fornecidos e outros polipeptídeos, por exemplo, ligantes ou peptídeos, pode-se incluir resíduos de aminoácido incluindo resíduos de aminoácido natural e/ou não natural. Os termos também incluem modificações após expressão do polipeptídeo, por exemplo, glicosilação, sialilação, acetilação, e fosforilação. Em alguns aspectos, os polipeptídeos podem conter modificações com respeito a uma sequência nativa ou natural, desde que a proteína mantenha a atividade desejada. Estas modificações podem ser deliberadas, como através de mutagênese direcionada ao sítio, ou podem ser acidentais, tal como através de mutações de hospedeiros que produzem as proteínas ou erros devido à amplificação de PCR.

[0546] Como aqui usado, um “indivíduo” é um mamífero, tal como

um humano ou outro animal, e tipicamente é humano. Em algumas modalidades, o indivíduo, por exemplo, paciente, a quem o agente ou agentes, células, populações celulares, ou composições são administrados, é um mamífero, tipicamente um primata, tal como um humano. Em algumas modalidades, o primata é um macaco ou gorila. O indivíduo pode ser macho ou fêmea e pode estar em qualquer idade, incluindo indivíduos criança, jovem, adolescente, adulto, e geriátrico. Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero não primata, tal como um roedor.

[0547] Como aqui usado, “tratamento” (e variações gramaticais do mesmo tais como “tratar” ou “tratando”) refere-se a melhora ou redução completa ou parcial de uma doença ou condição ou distúrbio, ou um sintoma, resultado ou efeito adverso, ou fenótipo associado a isso. Efeitos de tratamento desejáveis incluem, mas não estão limitados a, prevenir ocorrência ou recorrência de doença, alívio de sintomas, diminuição de quaisquer consequências patológicas diretas ou indiretas da doença, prevenção de metástase, redução da taxa de progressão da, melhora ou palição de um estado de doença, e remissão ou prognóstico melhorado. Os termos não implicam cura completa de uma doença ou eliminação completa de qualquer sintoma ou efeito em todos os sintomas ou resultados.

[0548] Como aqui usado, “atrasando o desenvolvimento de uma doença” significa adiar, dificultar, retardar, atrasar, estabilizar, suprimir e/ou adiar o desenvolvimento de uma doença (tal como câncer). Este atraso pode ser de diferentes comprimentos de tempo, dependendo da história da doença e/ou indivíduo sendo tratado. Em algumas modalidades, atraso suficiente ou significativo pode, em efeito, abranger prevenção, na qual o indivíduo não desenvolve a doença. Por exemplo, um câncer em estágio avançado, tal como desenvolvimento de metástase, pode ser atrasado.

[0549] “Prevenção,” como aqui usado, inclui fornecer profilaxia com respeito à ocorrência ou recorrência de uma doença em um indivíduo que pode ser predisposto a uma doença, mas não foi diagnosticado como câncer em estágio avançado da doença. Em algumas modalidades, as células e composições fornecidas são usadas para atrasar desenvolvimento de uma doença ou para retardar a progressão de uma doença.

[0550] Como aqui usado, “suprimir” uma função ou atividade é reduzir a função ou atividade quando comparado à condições iguais de outro modo exceto para uma condição ou parâmetro de interesse, ou alternativamente, quando comparada a outra condição. Por exemplo, células que suprimem o crescimento de tumor reduzem a taxa de crescimento do tumor comparado à taxa de crescimento do tumor na ausência das células.

[0551] Uma “quantidade eficaz” de um agente, por exemplo, uma formulação farmacêutica, células, ou composição, no contexto de administração, refere-se uma quantidade eficaz, em dosagens / quantidades e por período de tempo, necessários, para alcançar um resultado desejado, tal como um resultado terapêutico ou profilático.

[0552] Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” de um agente, por exemplo, uma formulação farmacêutica ou células, se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar um resultado terapêutico desejado, tal como para tratamento de uma doença, condição, ou distúrbio, e/ou efeito farmacocinético ou farmacodinâmico do tratamento. A quantidade terapeuticamente eficaz pode variar de acordo com fatores tais como um estado de doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e as populações de células administradas. Em algumas modalidades, os métodos fornecidos envolvem administrar as células e/ou composições em quantidades eficazes, por exemplo, quantidades terapeuticamente

eficazes.

[0553] Uma “quantidade profilaticamente eficaz” refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, desde que uma dose profilática seja usada em indivíduos antes de ou em um estágio antes de doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor do que a quantidade terapêuticamente eficaz. No contexto de menor carga tumoral, a quantidade profilaticamente eficaz em alguns aspectos será maior do que a quantidade terapêuticamente eficaz.

[0554] O termo “cerca de” como usado aqui se refere à faixa de erro usual para o respectivo valor prontamente conhecido por aquele versado neste campo técnico. Referência a “cerca de” um valor ou parâmetro aqui inclui (e descreve) modalidades que são direcionadas esse valor ou parâmetro em si.

[0555] Como aqui usado, as formas singulares “um, uma (a),” “um, uma (an),” e “o, a” incluem referentes plurais a menos que o contexto claramente dite de outro modo. Por exemplo, “um, uma (a),” ou “um, uma (an),” significam “em pelo menos um” ou “um ou mais.”

[0556] Em toda esta descrição, vários aspectos do assunto reivindicado são apresentados em um formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição na forma da faixa é meramente para conveniência e brevidade e não deve ser construída como uma limitação inflexível no escopo da matéria objeto reivindicada. Portanto, a descrição de uma faixa deve ser considerada tendo especificamente descrito todas as subfaixas possíveis, bem como valores numéricos individuais dentro dessa faixa. Por exemplo, onde uma faixa de valores é fornecida, deve ser entendido que cada valor intermediário, entre o limite superior e inferior daquela faixa e qualquer outro valor intermediário ou definido naquela faixa definida é abrangido pelo

assunto reivindicado. Os limites superior e inferior destas faixas menores podem independentemente ser incluídos nas faixas menores, e são incluídos no assunto reivindicado, sujeitos a qualquer limite especificamente excluído na faixa estabelecida. A faixa estabelecida inclui um ou ambos os limites, faixas excluindo qualquer ou ambos os limites incluídos, são também inclusas na matéria objeto reivindicada. Isso se aplica independentemente da amplitude da faixa.

[0557] Como aqui usado, uma composição refere-se a qualquer mistura de dois ou mais produtos, substâncias, ou compostos, incluindo células. Ela pode ser uma solução, uma suspensão, líquido, pó, uma pasta, aquosa, não aquosa ou qualquer combinação dos mesmos.

[0558] Como aqui usado, “enriquecer” quando se referindo a um ou mais tipos celulares particulares ou população celular, refere-se ao aumento do número ou percentagem do tipo celular ou população, por exemplo, comparado ao número total de células em, ou volume da, composição, ou relativo a outros tipos celulares, tais como por seleção positiva baseada em marcadores expressos pela população ou célula, ou por seleção negativa baseada em um marcador não presente na população celular ou célula a ser esgotada. O termo não requer completa remoção de outras células, tipo celular, ou populações da composição e não requer que as células desse modo enriquecidas estejam presentes em ou mesmo próximo a 100 % na composição enriquecida.

[0559] Como aqui usado, uma afirmativa de que uma célula ou população celular é “positiva” para um marcador particular refere-se à presença detectável sobre ou na célula de um marcador particular, tipicamente um marcador de superfície. Quando se referindo a um marcador de superfície, o termo refere-se à presença de expressão de superfície como detectado por citometria de fluxo, por exemplo, por manchamento com um anticorpo que especificamente se liga ao

marcador e detecta o referido anticorpo, em que o manchamento é detectável por citometria de fluxo em um nível substancialmente acima do manchamento detectado realizando o mesmo procedimento com um controle de pareamento com o isotipo ou controle de fechamento fluorescência menos um (FMO) sob condições de outro modo idênticas e/ou em um nível substancialmente similar àquele para uma célula que se sabe ser positiva para o marcador, e/ou em um nível substancialmente maior do que aquele para uma célula que se sabe ser negativa para o marcador.

[0560] Como aqui usado, uma afirmativa de que uma célula ou população celular é “negativa” para um marcador particular refere-se à ausência de presença detectável substancial sobre ou na célula de um marcador particular, tipicamente um marcador de superfície. Quando se referindo 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 um anticorpo que especificamente se liga ao marcador e detecta o 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 de pareamento com o isotipo ou controle de fechamento fluorescência menos um (FMO) sob condições de outro modo idênticas, e/ou em um nível substancialmente menor do que aquele para a célula que se sabe ser positiva para o marcador, e/ou em um nível substancialmente similar quando comparado àquele para uma célula que se sabe ser negativa para o marcador.

[0561] O termo “vector,” como aqui usado, refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de propagar outro ácido nucleico ao qual está ligada. O termo inclui o vetor como uma estrutura de ácido nucleico autorreplicante bem como o vetor incorporado no genoma de uma célula hospedeira na qual foi introduzido. Certos vetores são

capazes de direcionar a expressão de ácidos nucleicos aos quais estão operativamente ligados. Tais vetores são referidos aqui como “vetores de expressão.”

VIII. MODALIDADES EXEMPLARES

[0562] Entre as modalidades fornecidas estão:

[0563] 1. Um método para produzir uma composição de células modificadas, o método compreendendo cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias que compreendem células modificadas com um receptor recombinante, em que células na composição não foram expostas ao agente antes de serem cultivadas; e

[0564] em que o método resulta na proliferação ou expansão das células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T modificadas.

[0565] 2. Método de modalidade 1, em que as células primárias são células T CD4+ e/ou CD8+.

[0566] 3. Método de modalidade 1 ou 2, em que a composição de célula T modificada compreende células T CD4+ enriquecidas.

[0567] 4. Método de modalidade 1 ou 2, em que a composição de célula T modificada compreende células T CD8+ enriquecidas.

[0568] 5. Método para produzir uma composição de células modificadas, o método compreendendo cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias CD4+ e/ou CD8+ enriquecidas compreendendo células T modificadas com um receptor recombinante;

[0569] em que o método resulta na proliferação ou expansão de células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T CD4+ enriquecidas ou CD8+ enriquecidas

modificadas.

[0570] 6. Método de qualquer uma das modalidades 2, 3, ou 5, em que a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD4+; e/ou

[0571] a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+.

[0572] 7. Método de qualquer uma das modalidades 2, 4, ou 5, em que a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD8+; e/ou

[0573] a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD8+.

[0574] 8. Método de qualquer uma das modalidades 2 a 5, em que a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% Células T humanas primárias CD4+ e CD8+; e/ou

[0575] a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+ e CD8+.

[0576] 9. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 8, em que o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas,

opcionalmente em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem uma ou mais de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, G-CSF, e GM-CSF, opcionalmente em que as referidas uma ou mais citocinas compreendem IL-2, IL-7 ou IL-15.

[0577] 10. Método de modalidade 9, em que as referidas uma ou mais citocinas são citocinas recombinantes.

[0578] 11. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 10, em que, antes do cultivo, o método também compreende:

[0579] (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada que compreende células T primárias, as referidas condições de estimulação compreendendo 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, desse modo gerando uma composição estimulada; e

[0580] (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

[0581] 12. Método de modalidade 11, em que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD4+ e/ou CD8+ primárias.

[0582] 13. Método de modalidade 11 ou 12, em que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD4+ enriquecidas.

[0583] 14. Método de modalidade 11 ou 12, em que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD8+ enriquecidas.

[0584] 15. Método para produzir uma composição de células modificadas, o método compreendendo:

[0585] (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T enriquecidas por células T humanas primárias CD4+ e/ou CD8+, as referidas condições de estimulação compreendendo a presença de (i) 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 (ii) um agente que inibe a atividade de mTOR; e

[0586] (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

[0587] 16. Método de qualquer uma das modalidades 12, 13, e 15, em que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD4+; e/ou

[0588] a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+.

[0589] 17. Método de qualquer uma das modalidades 12, 14, ou 15, em que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD8+; e/ou

[0590] a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD8+.

[0591] 18. Método de qualquer uma das modalidades 12-15, em que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% Células T humanas primárias CD4+ e CD8+; e/ou

[0592] a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+ e CD8+.

[0593] 19. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 18, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é uma molécula pequena, uma molécula orgânica pequena, um polinucleotídeo, um oligonucleotídeo, um siRNA, ou a polipeptídeo, opcionalmente em que o agente que inibe a atividade de mTOR é uma molécula orgânica pequena.

[0594] 20. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, em que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe atividade de mTORC1 e/ou mTORC2 cinase.

[0595] 21. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, em que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de pelo menos uma cinase adicional, opcionalmente em que a referida pelo menos uma cinase adicional é PI3K.

[0596] 22. Método de qualquer uma das modalidades 19 a 21, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI-103, SAR245409, SF1126, VS5584, ou XL765.

[0597] 23. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, em

que o agente que inibe a atividade de mTOR:

[0598] (i) não inibe a atividade de PI3K;

[0599] (ii) não inibe detectavelmente a atividade de PI3K na IC50 para atividade de mTOR; e/ou

[0600] (iii) não inibe detectavelmente PI3K em todas as concentrações que inibem detectavelmente a atividade de mTOR.

[0601] 24. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19 ou 23, em que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 e mTORC2 cinase.

[0602] 25. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, 23, ou 24, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é uma pirazolopirimidina, Torina I, Torcinibe, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a, ou AZD8055.

[0603] 26. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, em que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe seletivamente a atividade de mTORC1.

[0604] 27. O método de 26 em que o agente que inibe a atividade de mTOR:

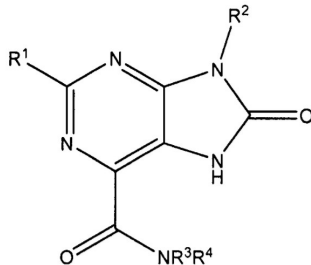
[0605] (i) não inibe a atividade de mTORC2;

[0606] (ii) não inibe detectavelmente a atividade de mTORC2 na IC50 para a atividade de mTORC1; e/ou

[0607] (iii) não inibe detectavelmente mTORC2 em todas as concentrações que inibem detectavelmente a atividade de mTORC1.

[0608] 28. Método de modalidade 26 ou 27, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é rapamicina, tensirolimus, everolimus, deforolimus, ou AZD8055.

[0609] 29. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, 23, ou 24, em que o agente compreende uma fórmula mencionada na Fórmula I,



Fórmula (I)

[0610] em que:

[0611] R1 é C1-8 alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

[0612] R2 é C1-8 alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída, e

[0613] R3 e R4 são independentemente H ou C₁₋₈ alquila.

[0614] 30. Método de modalidade 29, em que R1 é arila substituída, heteroarila substituída ou não substituída, tal como fenila substituída.

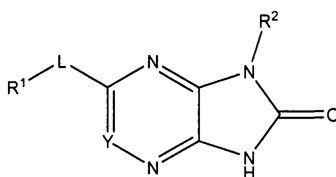
[0615] 31. Método de modalidade 29 ou 30, em que R2 é arila substituída ou não substituída, e/ou uma fenila substituída ou não substituída.

[0616] 32. Método de qualquer uma das modalidades 29 a 31, em que grupos que são substituídos, são substituídos com um ou mais grupos halogênios; C1-8 alquila; C2-8 alquenila; C2-8 alquinila; hidroxila; C1-8 alcoxila; amino; nitro; tiol; tioéter; imina; ciano; amido; fosfonato; fosfina; carboxila; tiocarbonila; sulfonila; sulfonamida; cetona; aldeído; éster; carbonila; haloalquila; B(OH)₂; cicloalquila carbocíclica, heterocicloalquila, heteroarila ou arila monocíclica ou policíclica fundida ou não fundida; amino; alquila O-inferior; O-arila, arila; aril-alquila inferior; CO₂CH₃; CONH₂; OCH₂CONH₂; NH₂; SO₂NH₂; OCHF₂;

CF₃; ou OCF₃.

[0617] 33. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, 23, 24, ou 29 a 32 em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63.

[0618] 34. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, 23, ou 24, em que o agente compreende a Fórmula mencionada na Fórmula (II),



Fórmula (II)

[0619] em que L é uma ligação direta, NH ou O,

[0620] Y é N ou CR³,

[0621] em que R¹ é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, C₂₋₈ alquenila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

[0622] R² é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

[0623] R³ é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquila substituída ou não substituída, -NHR⁴ ou -N(R⁴)₂, e

[0624] R⁴ é em cada ocorrência independentemente C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída.

[0625] 35. Método de modalidade 34, em que R1 é arila substituída, e/ou uma fenila substituída.

[0626] 36. Método de modalidade 34 ou 35, em que Y é CH.

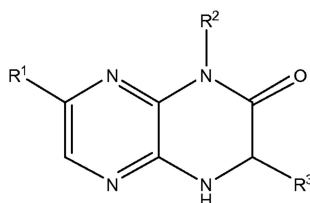
[0627] 37. Método de qualquer uma das modalidades 34 a 36, em que L é uma ligação direta.

[0628] 38. Método de qualquer uma das modalidades 34 a 37, em que R1 é arila substituída e R2 é C1-8 alquila substituída por um ou mais substituintes selecionados de alcóxi, amino, hidróxi, cicloalquila, ou heterocicloalquila.

[0629] 39. Método de modalidade 38, em que R2 é C1-8 alquila substituída por uma heterocicloalquila.

[0630] 40. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, 23, 24, ou 34-39, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 155.

[0631] 41. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, 23, ou 24, em que o agente compreende uma fórmula mencionada na Fórmula III



Fórmula (III)

[0632] em que R¹ é C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, ou heterociclilalquila substituída ou não substituída,

[0633] R² é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, heterociclilalquila substituída ou não substituída, substituída ou não substituída aralquila, ou cicloalquilalquila substituída ou não

substituída, e

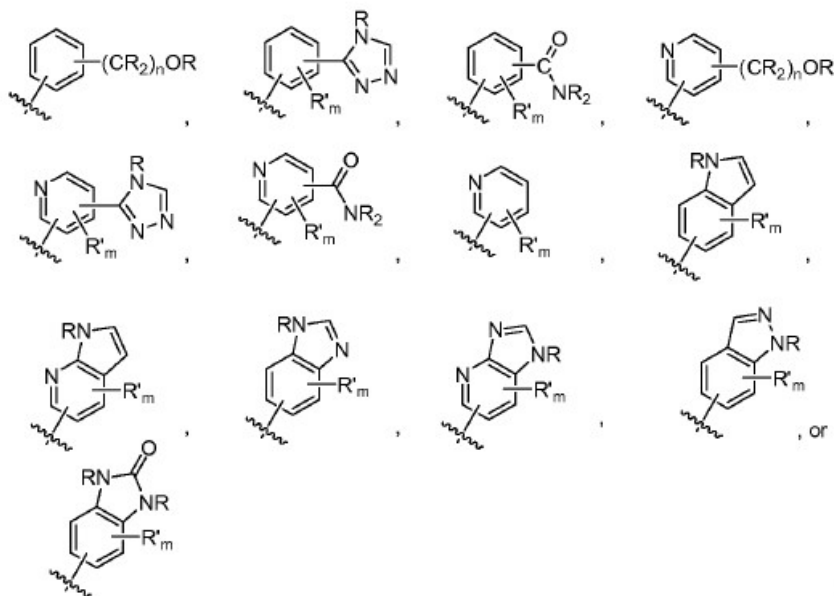
[0634] R³ é H, ou a substituída ou não substituída C₁₋₈ alquila.

[0635] 42. Método de modalidade 41, em que R1 é arila substituída ou não substituída ou heteroarila substituída ou não substituída.

[0636] 43. Método de modalidade 41 ou 42, em que R1 é piridila que é substituída.

[0637] 44. Método de qualquer uma das modalidades 41 a 43, em que R1 é piridila substituída com um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída (, halogênio, aminocarbonila, ciano, hidroxialquila, -OR, e -NR₂, em que cada R é independentemente H, ou uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída. Em algumas modalidades, R1 é 1H-pirrolo[2,3-b]piridila ou benzimidazolila, opcionalmente substituída por um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, e -NR₂, em que R é independentemente H, ou uma C₁₋₄ alquila substituída ou não substituída.

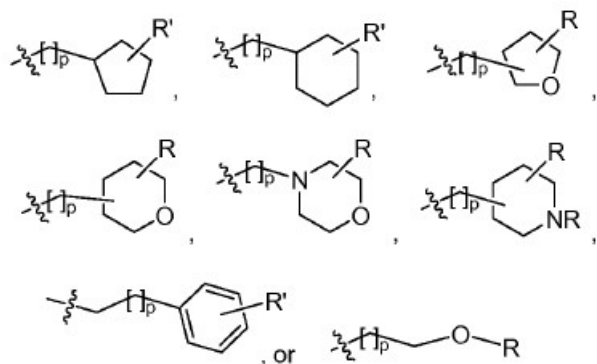
[0638] 45. Método de qualquer uma das modalidades 41 a 44, em que R1 é



[0639] em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou uma C1-4 alquila substituída ou não substituída (por exemplo, metila); R1 é em cada ocorrência independentemente a substituída ou não substituída C1-4 alquila, halogênio, ciano, -OR, ou -NR₂; m é 0-3; e n é 0-3.

[0640] 46. Método de qualquer uma das modalidades 41 a 45, em que R₂ é H, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, sec-butila, isobutila, terc-butila, n-pentila, isopentila, ciclopentila, ciclo-hexila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila, (C1-4 alquil)-fenila, (C1-4 alquil)-ciclopropila, (C1-4 alquil)-ciclobutila, (C1-4 alquil)-ciclopentila, (C1-4 alquil)-ciclo-hexila, (C1-4 alquil)-pirrolidila, (C1-4 alquil)-piperidila, (C1-4 alquil)-piperazinila, (C1-4 alquil)-morfolinila, (C1-4 alquil)-tetra-hidrofuranila, ou (C1-4 alquil)-tetra-hidropiranila, cada opcionalmente substituída.

[0641] 47. Método de qualquer uma das modalidades 41 a 46, em que R₂ é H, C1-4 alquila, (C1-4 alquil)(OR),



[0642] em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou uma C1-8 alquila substituída ou não substituída, R' é em cada ocorrência independentemente H, -OR, ciano, ou uma C1-8 alquila substituída ou não substituída, e p é 0-3.

[0643] 48. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 19, 23, 24, ou 41-47, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 246.

[0644] 49. Método para produzir uma composição de células modificadas, o método compreendendo cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias enriquecidas compreendendo células T modificadas com um receptor recombinante;

[0645] em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246; e

[0646] em que o método resulta na proliferação ou expansão de células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T modificadas.

[0647] 50. Método de modalidade 33 ou 49, em que a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 63.

[0648] 51. Método de modalidade 40 ou 49, em que a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 μ M,

entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 155.

[0649] 52. Método de modalidade 48 ou 49, em que a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 246.

[0650] 53 Método de modalidade 49, em que, antes do cultivo, o método também compreende:

[0651] (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T primárias na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR; 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, desse modo gerando uma composição estimulada; e em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246; and

[0652] (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

[0653] 54. Método para produzir uma composição de células modificadas, o método compreendendo:

[0654] (a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T humanas primárias, as referidas condições de estimulação compreendendo a presença de (i) 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 (ii) um agente que inibe a

atividade de mTOR, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246; and

[0655] (b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

[0656] 55. Método de modalidade 53 ou 54, em que as células primárias são células T CD4+ enriquecidas e/ou células T CD8+.

[0657] 56. Método de qualquer uma das modalidades 11 a 48, 53, 54 ou 55, em que o reagente estimulatório compreende:

[0658] um agente primário que especificamente se liga a um membro de um complexo TCR, opcionalmente que especificamente se liga a CD3; e

[0659] opcionalmente um agente secundário que especificamente se liga a uma molécula coestimulatória de célula T,

[0660] opcionalmente em que a molécula coestimulatória é selecionada de CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, ou ICOS.

[0661] 57. Método de modalidade 55 ou 56, 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 dos mesmos.

[0662] 58. Método de qualquer uma das modalidades 55 a 57, em que o agente primário e/ou agente secundário estão presentes sobre a superfície de um suporte sólido.

[0663] 59. Método de modalidade 58, em que o suporte sólido é ou compreende uma conta.

[0664] 60. Método de modalidade 59, em que a conta compreende um diâmetro de mais do que ou mais 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 .

[0665] 61. Método de modalidade 60 ou 61, em que a conta compreende um diâmetro de ou cerca de 4,5 μm .

[0666] 62. Método de qualquer uma das modalidades 59 a 61, em que a conta é inerte.

[0667] 63. Método de qualquer uma das modalidades 59 a 62, em que a conta é ou compreende uma superfície de poliestireno.

[0668] 64. Método de qualquer uma das modalidades 59 a 63, em que a conta é magnética ou superparamagnética.

[0669] 65. Método de qualquer uma das modalidades 59 a 64, em que a relação de contas para células é de, ou de cerca de 4:1 a 0,25:1.

[0670] 66. Método de qualquer uma das modalidades 11 a 48 ou 53 a 65, em que a introdução compreende transduzir células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[0671] 67. Método de modalidade 66, em que o vetor viral é um vetor retroviral.

[0672] 68. Método de modalidade 66 ou 67, em que o vetor viral é um vetor lentiviral ou vetor gamarretroviral.

[0673] 69. Método de qualquer uma das modalidades 11 a 48 ou 53 a 65, em que a introdução compreende transfectar as células da composição estimulada com um vetor compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

[0674] 70. Método de modalidade 69, em que o vetor é um transposon, opcionalmente um transposon Sleeping Beauty (SB) ou um transposon Piggybac.

[0675] 71. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 14, 16 a 53, ou 55 a 70, em que subsequente ao cultivo, o método também compreende coletar células da composição de saída.

[0676] 72. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 14, 16 a

53, ou 55 a 71, também compreendendo formular células da composição de saída para criopreservação e/ou administração a um indivíduo, opcionalmente na presença de um excipiente farmacologicamente aceitável.

[0677] 73. Método de modalidade 72, em que as células da composição de saída são formuladas na presença de um crioprotetor.

[0678] 74. Método de modalidade 73, em que o crioprotetor compreende DMSO.

[0679] 75. Método de qualquer uma das modalidades 72 a 74, em que as células da composição de saída são formuladas em um recipiente, opcionalmente um frascónete ou uma bolsa.

[0680] 76. Método de qualquer uma das modalidades 11 a 48 ou 53 a 75, também compreendendo isolar as células T CD4+ e/ou CD8+ de uma amostra biológica antes da incubação.

[0681] 77. Método de modalidade 76, em que o isolamento compreende selecionar células com base na expressão de superfície de CD4 e/ou CD8, opcionalmente por seleção positiva ou negativa.

[0682] 78. Método de modalidade 76 ou 77, em que o isolamento compreende realizar seleção com base em imunoafinidade.

[0683] 79. Método de qualquer uma das modalidades 76 a 78 em que a amostra biológica compreende células T primárias obtidas de um indivíduo.

[0684] 80. Método de qualquer uma das modalidades 76 a 79, em que a amostra biológica é ou compreende 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.

[0685] 81. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 80, em que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno alvo que

é associado com, específico para, e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

[0686] 82. Método de modalidade 81, 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.

[0687] 83. Método de modalidade 81 ou 82, em que o antígeno alvo é um antígeno de tumor.

[0688] 84. Método de qualquer uma das modalidades 81 a 83, em que o antígeno alvo é selecionado dentre 5T4, 8H9, avb6 integrina, B7-H6, antígeno de maturação de célula B (BCMA), CA9, um antígeno de testículos de câncer, anidrase 9 carbônica (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, efrinaB2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR VIII, receptor de estrogênio, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína de ligação de folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, Receptor 5D Acoplado à Proteína G (GPRC5D), gp100, Her2/neu (erbB2 de tirosina cinase receptora), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor alfa 2 de IL-13(IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve kappa, Lewis Y, Molécula de adesão de célula L1 (L1-CAM), Antígeno associado com melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV de murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, ligantes NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, tEGFR, receptores VEGF, VEGF-R2, Tumor Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno e um antígeno associado com um

marcador universal.

[0689] 85. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 84, em que o receptor recombinante é ou compreende um receptor de antígeno não TCR funcional ou um TCR ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

[0690] 86. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 85, em que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[0691] 87. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 86, em que o receptor recombinante é um CAR anti-CD19.

[0692] 88. Método de modalidade 87, em que o receptor de antígeno quimérico compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação a antígeno.

[0693] 89. Método de modalidade 88, 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.

[0694] 90. Método de modalidade 89, em que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

[0695] 91. Método de modalidade 89 ou 90, em que o fragmento compreende uma scFv.

[0696] 92. Método de qualquer uma das modalidades 90 a 91, em que o receptor de antígeno quimérico também compreende um espaçador e/ou uma região de articulação.

[0697] 93. Método de qualquer uma das modalidades 90 a 92, em que o receptor de antígeno quimérico compreende uma região de sinalização intracelular.

[0698] 94. Método de modalidade 93, em que a região de sinalização intracelular compreende um domínio de sinalização

intracelular.

[0699] 95. Método de modalidade 94, 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).

[0700] 96. Método de modalidade 95, 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 do mesmo.

[0701] 97. Método de qualquer uma das modalidades 94 a 96, em que o receptor de antígeno quimérico também compreende um domínio de transmembrana disposto entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

[0702] 98. Método de qualquer uma das modalidades 94 97, em que a região de sinalização intracelular também compreende uma região de sinalização coestimulatória.

[0703] 99. Método de modalidade 98, 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 do mesmo.

[0704] 100. Método de modalidade 98 ou 99, em que a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização do mesmo.

[0705] 101. Método de qualquer uma das modalidades 99 a 100, em que a região de sinalização coestimulatória é entre o domínio de transmembrana e a região de sinalização intracelular.

[0706] 102. Método de qualquer uma das modalidades 1 a 14, 16 a 53, ou 55 a 100, em que

[0707] (i) as células T primárias compreendem composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas, e em que as composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são cultivadas separadamente; ou

[0708] (ii) as células T primárias compreendem composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas, e em que as composições são misturadas a fim de cultivar as células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas juntas.

[0709] 103. Uma composição compreendendo células modificadas produzidas por um método de qualquer uma das modalidades 1 a 102.

[0710] 104. Uma composição de modalidade 103, também compreendendo um veículo farmacologicamente aceitável.

[0711] 105. Uma composição de modalidade 103 ou 104, compreendendo um crioprotetor, opcionalmente DMSO.

[0712] 106. Um artigo de fabricação, compreendendo uma composição de qualquer uma das modalidades 103 a 105, e instruções para a administração da composição de saída a um indivíduo.

[0713] 107. O artigo de fabricação de modalidade 106, 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 de, a doença ou condição.

[0714] 108. O artigo de fabricação de modalidade 106 ou 107, em que a composição de saída é uma composição de células T CD4+ modificadas.

[0715] 109. O artigo de fabricação de modalidade 107 ou 108, em que a composição de saída é uma composição modificada de células T

CD8+.

[0716] 110. Um artigo de fabricação compreendendo uma composição de células T CD4+ modificadas produzida pelo método de qualquer uma das modalidades 2 a 3, 5 a 6, 9 a 14, 16 a 17, 19 a 49, 51 a 53, ou 56 a 109, uma composição de células T CD8+ modificadas produzida pelo método de qualquer uma das modalidades 2, 4, 5, 7, 9 a 13, 15, 16, 18 a 49, 51 a 53, ou 56 a 109, e instruções para administração das células T CD4+ modificadas e as células T CD8+ a um indivíduo.

[0717] 111. O artigo de fabricação de modalidade 110, em que as instruções especificam separadamente administrar as células T CD4+ e células T CD8+ ao indivíduo.

[0718] 112. O artigo de fabricação de modalidade 110 ou 111, em que as instruções especificam administrar as células T CD4+ e as células T CD8+ ao indivíduo em uma relação desejada.

IX. EXEMPLOS

[0719] Os exemplos a seguir são incluídos para propósitos ilustrativos apenas e não se destinam a limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1: Determinação da Dose do Inibidor de mTOR cinase para Culturas de Células T Humanas Primárias

[0720] O efeito da dose dos inibidores de mTOR cinase exemplares em células T humanas primárias foi avaliado monitorando a inibição da proteína ribossômica S6.

[0721] As células T CD4+ e CD8+ foram isoladas por enriquecimento à base de imunoafinidade a partir de amostras de leucaferese de indivíduos doadores humanos. As células T CD4+ e CD8+ isoladas foram misturadas 1:1 e estimuladas com contas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 na presença de concentrações crescentes de um inibidor de mTOR cinase, PI-103, Composto 155, Composto 63 ou Composto 246. As culturas de células T foram

incubadas durante a noite (aproximadamente 16 horas) a 37°C. Após a incubação na presença de PI-103, Composto 155, Composto 63 ou Composto 246, as células T foram avaliadas quanto à fosforilação intracelular de S6 e cocoradas quanto à expressão superficial de CD4 ou CD8, por citometria de fluxo.

[0722] Os resultados são mostrados nas **FIGURAS 1A-D**. Todos os inibidores de mTOR cinase avaliados inibiram a fosforilação de S6 nas células T CD4+ e CD8+. As IC50s para a inibição da fosforilação de S6 nas células T por PI-103, Composto 155, Composto 63 e Composto 246 foram aproximadamente 100 nM, 100 nM, 500 nM e 500 nM, respectivamente. A IC50 nas células T CD4+ e CD8+ é mostrado na Tabela E1.

Tabela E1: IC50 para inibição de fosforilação de Ribo-S6		
Composto	CD4	CD8
PI-103	121 nM	88,4 nM
Composto 155	121 nM	127 nM
Composto 63	468 Nm	503 nM
Composto 246	475 nM	502 nM

Exemplo 2: Avaliação da Expansão de Células T Após a Incubação na Presença de um Inibidor de mTOR Cinase

[0723] As composições separadas de células CD4+ e CD8+ foram isoladas a partir de amostras de leucaferese humana por enriquecimento à base de imunoafinidade e criocongelamento. As células CD4+ e CD8+ das composições foram posteriormente descongeladas e ativadas por cultura separadamente das células sob condições estimulantes na presença de contas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 e IL-2, IL-7 e/ou IL-15 recombinante por aproximadamente 20 horas. As células foram, em seguida, transduzidas com um vetor viral que codifica um receptor de antígeno quimérico anti-

CD19 (CAR). Após a transdução, as células CD4⁺ e CD8⁺ foram incubadas separadamente na presença de um inibidor de mTOR cinase, Composto 155, Composto 63 ou Composto 246, em várias concentrações. Para os controles, as células foram incubadas apenas com meios, veículo de DMSO ou com PI-103 200 nM. A incubação foi realizada a 37°C por aproximadamente 8 dias após o descongelamento com uma mudança de meios, ponto no qual os compostos foram readicionados aos meios de cultura na mesma concentração.

[0724] A porcentagem de células T CD8⁺ e CD4⁺ no final do processo em comparação à quantidade de células semeadas para cultura após a transdução é mostrada na **FIGURA 2**. O corte para selecionar uma dose tolerada foi estabelecido em 70% dos valores médios dos meios e controles de DMSO. A dose tolerada mais alta do Composto 155, Composto 63 e Composto 246 que resultou em níveis semelhantes de expansão de células T CD8 e CD4, como observado no grupo de controle veículo, foi de 100 nM, 1 µM e 100 nM, respectivamente.

Exemplo 3: Avaliação Funcional de Células T Transduzidas por Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) (Células CAR T) Expandidas na Presença de um Inibidor de mTOR Cinase

[0725] As composições separadas de células CD4⁺ e CD8⁺ foram isoladas de três doadores humanos, ativadas e transduzidas com um vetor viral que codifica um CAR anti-CD19 substancialmente como descrito no Exemplo 2. Após a transdução, as células T CD4⁺ e CD8⁺ derivadas de cada doador foram incubadas separadamente por 8 dias na presença de um inibidor de mTOR cinase para expandir as células T substancialmente como descrito no Exemplo 2, exceto na presença de 200 nM de PI-103, 1 µM de Composto 63 ou com controles veículo de DMSO ou de apenas meios. As células T CD4⁺ e CD8⁺ de cada doador foram, em seguida, separadamente colhidas, formuladas e

criocongeladas. As células T CD4+ e CD8+ modificadas criocongeladas foram descongeladas, lavadas para remover o composto, e as células do mesmo doador foram, em seguida, combinadas em uma relação de 1:1 de células T CD4+/CAR+ viáveis para CD8+/CAR+ viáveis para produzir uma composição de célula CAR-T anti-CD19 expandida contendo células T CD4+ e CD8+. As atividades funcionais das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas foram avaliadas.

Metabolismo Glicolítico

[0726] Alterações no metabolismo glicolítico celular em resposta à estimulação do receptor de células T (TCR) foram medidas em células CAR-T CD8+ a partir da composição de células CAR-T anti-CD19 geradas antes da combinação com células T CD4+. O metabolismo glicolítico foi avaliado medindo a taxa de acidificação extracelular (ECAR) em células CAR-T CD8+ em tempo real com um bioanalisador de fluxo extracelular (Seahorse Bioanalyzer, Agilent Technologies). As medições de ECAR da linha de base foram tiradas a partir das células CAR-T CD8+ cultivadas a partir da composição de células CAR-T anti-CD19 geradas. Após a terceira medição de ECAR (aproximadamente 20 minutos no ensaio), as contas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 foram adicionadas à cultura. A área sob a curva (AUC) para as taxas de ECAR (mpH/min) de 0 a 76 minutos do ensaio e a relação de explosão glicolítica de ECAR máxima em relação aos controles de meios (n = 3 doadores) foram determinadas.

[0727] Como mostrado na **FIGURA 3A**, a estimulação com contas anti-CD3/anti-CD28 aumentou o ECAR em células CAR-T CD8+ entre todas as composições de células CAR-T anti-CD19 geradas. Uma tendência para a explosão glicolítica realçada no estímulo de TCR de CAR-T CD8+ entre células CAR-T anti-CD19 geradas por expansão na presença do Composto 63 foi observada pela relação de AUC de ECAR (**FIGURA 3B**) ou de ECAR (**FIGURA 3C**) em relação ao controle de

meios em cada um dos 3 doadores.

Sinalização de CAR em Células CAR-T Expandidas

[0728] A sinalização dependente de antígeno de células CAR-T entre composições de células CAR-T anti-CD19 geradas foi avaliada monitorando-se a ativação de fosfo-S6. As células das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas, expandidas na presença de apenas meios, veículo de DMSO, PI-103 ou Composto 63, foram cocultivadas com células K562 irradiadas transduzidas para expressar CD19 (células alvo K562-CD19) em uma relação de 1:1. Após 20 horas, as células foram avaliadas quanto à fosforilação intracelular de S6 e cocoradas quanto à expressão de superfície de CD4 ou CD8, por citometria de fluxo.

[0729] Como mostrado na **FIGURA 4A**, após a estimulação com células de expressão de antígeno, foram observados níveis mais altos de fosfo-S6 em células T CD4+ e CD8+ entre cada uma das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas em comparação às células que não foram estimuladas com antígeno. O manchamento de fosfo-S6 foi similar em células T CD4+ e CD8+ entre as composições que foram expandidas na presença de PI-103 ou Composto 63, em comparação às composições controle que foram expandidas com veículo de DMSO ou meios apenas. Estes resultados são consistentes com a descoberta de que as células expandidas na presença de inibidores da mTOR cinase mantêm a atividade de sinalização da mTOR cinase normal após a lavagem do inibidor.

Atividade Citolítica

[0730] Para avaliar a atividade citolítica, as composições de células CAR-T anti-CD19 geradas foram cocultivadas com células alvo K562-CD19 em uma relação de 3:1 ou 1:1 de células efetoras para células alvo. As células alvo foram rotuladas com NuLight Red (NLR) para permitir o rastreamento por microscopia fluorescente. Como um controle

negativo, as células alvo K562-CD19 foram cultivadas sozinhas ou cocultivadas com células T CD4+ e CD8+ que não expressavam um CAR anti-CD19. A atividade de extermínio foi avaliada medindo a perda de células alvo viáveis após 80 horas, como determinado pelo sinal fluorescente vermelho (usando o INCUCYTE® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). A morte celular foi quantificada como o inverso da área sob a curva em função da quantidade de células alvo viáveis ao longo do tempo.

[0731] Como mostrado na **FIGURA 4B**, as células que foram expandidas na presença de PI-103 ou Composto 63 exibiram atividade citolítica semelhante às células de controle que foram expandidas com veículo de DMSO ou meios apenas. Estes resultados indicam que a função de morte de células alvo foi mantida em células T que foram expandidas na presença de inibidores da mTOR cinase.

Medição de Citocinas

[0732] Para medir citocinas após a estimulação de antígeno, as células das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas foram cocultivadas com células alvo K562-CD19 irradiadas ou células alvo de origem K562 em uma relação de 1:1 de célula efetora:alvo. Após a cultura durante a noite (~ 16 horas), os sobrenadantes de cultura de células foram colhidos e a produção de citocinas TNF-alfa, IFN-gama e IL-2 foi medida usando um Ensaio Luminex Multiplex. A mudança de duplicação da produção de citocinas observada em sobrenadantes de cocultura foi determinada a partir de composições de células CAR-T anti-CD19 geradas expandidas na presença de PI-103, Composto 63 ou veículo de DMSO em comparação às células expandidas apenas no meio.

[0733] Como mostrado na **FIGURA 5**, a produção de TNF-alfa, IFN-gama e IL-2 foi detectada a partir de células T cocultivadas com células de expressão de antígenos. As células das composições de células

CAR-T anti-CD19 geradas que foram expandidas na presença de PI-103 ou Composto 63 exibiram melhorias na produção de citocinas em comparação às células controle, particularmente no que diz respeito à produção de IFN-gama, que foi melhorada nas células expandidas com PI-103 ou Composto 63.

[0734] Citocinas intracelulares, CD107a, IFN-gama (IFN γ), IL-2, IL-17a e TNF-alfa (TNF α), foram avaliadas em células T cocultivadas que foram divididas em dois grupos e incubadas por mais 5 horas com PMA/Ionomicina e um inibidor de Golgi ou um inibidor de Golgi apenas. O acúmulo intracelular de citocinas foi expresso como uma mudança de duplicação na frequência de células positivas para citocinas a partir de controles de meios apenas. As células T CD8+ (**FIGURA 6A**) e as células T CD4+ (**FIGURA 6B**) que foram expandidas com PI-103 ou Composto 63 exibiram uma frequência aumentada de certos perfis de citocinas polifuncionais em comparação às células de controle (perfis em caixas nas **FIGURAS 6A e 6B**). Em particular, as células T CD8+ exibiram um perfil polifuncional aumentado das células positivas CD107a+IFN γ +TNF α + após re-estimulação com PMA/Ionomicina e um inibidor de Golgi, e um perfil polifuncional aumentado de células CD107a+IFN γ +IL-2+ após incubação apenas com um inibidor de Golgi (**FIGURA 6A**). Em células CD4+, foi observado um perfil polifuncional aumentado de células CD107a+IFN γ +TNF α + após o tratamento com PMA/Ionomicina e um inibidor de Golgi, ou um inibidor de Golgi apenas, enquanto os perfis polifuncionais de células CD107a+IFN γ +IL-2+ TNF α + aumentaram após a re-estimulação com PMA/Ionomicina e um inibidor de Golgi, e os perfis polifuncionais das células CD107a+IFN γ + aumentaram após a incubação com um inibidor de Golgi apenas (**FIGURA 6B**).

Estimulação Serial

[0735] A capacidade das células de se expandir *ex vivo* após

estímulos repetidos em alguns aspectos pode indicar a capacidade das células CAR-T persistirem (por exemplo, após a ativação inicial) e/ou é indicativa da função *in vivo* (Zhao e outro (2015) *Cancer Cell*, 28: 415-28). Para avaliar a função das células em um ensaio de estimulação serial, as composições de células CAR-T anti-CD19 geradas foram incubadas com células alvo K562-CD19 irradiadas. A cada 3-4 dias, as células T foram colhidas, contadas e re-estimuladas com novas células alvo usando as mesmas condições de cultura após redefinir o número de células para a densidade inicial de semeadura para cada ciclo. Após quatro ciclos de re-estimulação, as células T foram recultivadas por mais 4 dias, sem re-estimulação adicional com as células alvo. As duplicações da população (**FIGURA 7A**) e a área sob as curvas (AUC) como uma função da duplicação da população ao longo do tempo em relação à AUC das células expandidas apenas com os meios (**FIGURA 7B**) foram determinadas.

[0736] Como mostrado na **FIGURA 7A**, o número de células T de expressão de CAR anti-CD19 aumentou neste ensaio, consistente com a capacidade destas células proliferarem-se na presença de células de expressão CD19. Como mostrado na mudança de duplicação de AUC das duplicações da população, as células T das composições de células CAR T anti-CD19 geradas que foram expandidas com o Composto 63 tiveram uma AUC média maior em comparação às células T expandidas com PI-103 ou veículo de DMSO (**FIG 7B**). Esta observação indica que a presença do Composto 63 durante a expansão das células CAR-T suporta a expansão e sobrevivência prolongadas das células T, mesmo após a estimulação de antígeno repetida.

[0737] Para avaliar a atividade após outra estimulação secundária, as células CAR-T foram colhidas no dia 11 após a re-estimulação serial e foram estimuladas com células alvo K562-CD19 irradiadas em uma relação efetora:alvo de 1:1 por aproximadamente 16 horas. O

sobrenadante foi coletado e a produção de citocina TNF-alfa, IFN-gama e IL-2 foi medida usando um Ensaio Luminex Multiplex substancialmente como descrito acima. A mudança de duplicação da produção de citocinas observada em sobrenadantes de cocultura a partir das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas expandida na presença de PI-103, Composto 63 ou veículo de DMSO em comparação às células expandidas em apenas em meios foi determinada e são mostradas na **FIGURA 7C**. A avaliação dos perfis de citocinas polifuncionais das células no dia 11, após a incubação com um Inibidor de Golgi por 4 horas substancialmente como descrito acima, mostrou um perfil de citocina polifuncional de CD8+ aumentado de células CD107a+IFN γ + (**FIGURA 7D**).

[0738] A capacidade das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas que foram expandidas na presença de inibidores de mTOR para manter a capacidade e a sobrevivência de citocinas melhoradas através da exposição de antígeno prolongada é consistente com uma resistência à exaustão funcional.

Expansão Específica de CAR

[0739] A capacidade das células de se expandir após a estimulação do CAR foi avaliada pela incubação de células das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas com superfície de contas conjugada com um anticorpo anti-idiotipo específico ao CAR anti-CD19. As contas conjugadas com anticorpo anti-idiotipo foram incubadas com células em uma relação de 1:1 de conta:célula em cavidades de vasos de expansão G-rex de 24 cavidades (Argos Technologies) por 15 dias. As células T vivas totais por cavidade foram determinadas pela contagem de células nas culturas a cada 5 dias (**FIGURA 8A**). A área média sob a curva (AUC) como uma função do número de células T ao longo do tempo foi calculada em relação à AUC de células expandidas apenas com meios (**FIGURA 8B**).

[0740] Como mostrado na **FIGURA 8A**, a estimulação de células com contos conjugadas com anticorpo anti-idiotípico resultou em uma expansão inicial que foi seguida por um declínio no número de células. As células T das composições de células CAR T anti-CD19 geradas que foram previamente expandidas com o Composto 63 ou PI-103 tiveram uma AUC média maior em comparação às células T previamente expandidas com o veículo de DMSO (**FIGURA 8B**). Os resultados indicam que a presença de um inibidor de mTOR cinase durante a expansão suporta a expansão e sobrevivência realçadas após uma única estimulação específica de CAR.

[0741] A resposta de citocina secundária após a estimulação com células de expressão de antígeno foi avaliada em células CAR-T colhidas no dia 11 após a expansão com contos conjugadas com anticorpo anti-idiotipo. As células estimuladas com anticorpo anti-idiotipo foram incubadas com células alvo K562-CD19 irradiadas em uma relação efetora:alvo de 1:1 por aproximadamente 16 horas. O sobrenadante foi coletado e a produção de citocina TNF-alfa, IFN-gama e IL-2 foi medida usando um Ensaio Luminex Multiplex substancialmente como descrito acima. A mudança de duplicação da produção de citocinas observada em sobrenadantes de cocultura foi determinada a partir de composições de células CAR-T anti-CD19 geradas expandidas na presença de PI-103, Composto 63 ou veículo de DMSO em comparação às células expandidas apenas com meios. Como mostrado na **FIGURA8C**, as células T das composições de células CAR T anti-CD19 geradas que haviam sido previamente expandidas com o Composto 63 ou PI-103 exibiram melhor produção de citocinas secundárias após a estimulação subsequente com antígeno. Além disso, algumas células derivadas de doadores que foram modificadas e expandidas com o Composto 63 exibiram uma frequência aumentada de células T CD8+ que foram células

CD107a+IFN γ + no dia 11, como determinado pelo manchamento de citocinas intracelular após incubação com um Inibidor de Golgi por 4 horas substancialmente como descrito acima (**FIGURA 8D**).

Exemplo 4: Análise de Expressão de Gene de Células T CD4+ e CD8+ Modificadas Expandidas na Presença de um Inibidor de mTOR Cinase

[0742] A expressão de gene entre as células das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas descritas no Exemplo 2, gerada pela expansão das células na presença de PI-103, Composto 63, veículo de DMSO ou apenas meios, foi avaliada por sequenciamento de RNA (RNA-Seq). O RNA foi extraído de composições geradas a partir de três doadores sob cada condição de expansão e uma avaliação do transcriptoma total foi realizada por Sequenciamento de RNA. Os valores de FPKM e FPKQ foram determinados; valores de FPKQ foram transformados em log (log₂). A expressão de gene foi determinada comparando perfis de expressão de células CD4+, CD8+ ou CD4+/CD8+ combinadas entre células das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas que foram expandidas na presença apenas de meios, PI-103 ou Composto 63, como em comparação às células expandidas com veículo de DMSO. Produtos de gene foram identificados, os quais foram diferentes entre cada grupo, com base na análise de uma plotagem Volcano, impondo um corte de FDR \leq 10% entre as duas condições.

[0743] Como mostrado nas plotagens Volcano na **FIGURA 9A**, a expressão de gene significativamente alterada foi identificada entre as células T CD4+ e/ou CD8+ expandidas na presença de PI-103 ou Composto 63, com genes subregulados representados à esquerda do ponto médio ("0") de cada plotagem e genes super-regulados representados à direita do ponto médio.

[0744] A expressão de cada gene diferencialmente expresso em

células expandidas com PI-103 ou Composto 63 foi plotada como a mudança de duplicação de Log^2 em comparação à expressão em células expandidas com DMSO. Como mostrado na **FIGURA 9B**, foi identificada uma relação linear entre a expressão dos genes diferencialmente expressos nas células expandidas com PI-103 ou composto 63, indicando uma forte correlação positiva entre a expressão dos genes diferencialmente expressos nas células expandidas com PI-103 e as células expandidas com o composto 63 ($R^2 = 0,9$).

[0745] A análise de enriquecimento ontológico nos genes diferencialmente expressos foi realizada para identificar categorias de ontologia de gene (GO), com base em reguladores transcricionais de genes diferencialmente expressos que foram ativados ou inibidos em comparação à expressão em células expandidas com veículo de DMSO. As pontuações TZ do regulador transcricional foram calculadas com base na concordância das direções esperadas do efeito transcricional em cada rede reguladora em relação aos efeitos transcricionais observados em células expandidas com PI-103 ou Composto 63. **FIGURA 9C** lista categorias de GO identificadas exemplares, definidas pelo membro regulador de cada cluster, em relação às suas pontuações Z correspondentes.

Exemplo 5: Avaliação da Carga de Tumor e Sobrevivência em um Modelo de Xenoenxerto de Tumor Após Administração de Células CAR-T Expandidas na Presença de um Inibidor de mTORCinase

[0746] Efeitos antitumorais das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas, geradas por expansão na presença de PI-103, Composto 63 ou apenas meios como descrito no Exemplo 2. O modelo de camundongo de xenoenxerto de tumor foi gerado implantando-se camundongos imunodeficientes nod scid gama (NSG) com $0,5 \times 10^6$ células Raji (uma linhagem de células de tumor de linfócitos B humana imortalizada que expressa CD19), que foram permitidas enxertar. As

células Raji foram transfectadas com vaga-lume luciferase para facilitar a detecção por imageamento por bioluminescência. Após sete dias, camundongos não receberam tratamento, veículo de DMSO ou uma dose baixa ($0,25 \times 10^6$) ou uma dose alta ($1,0 \times 10^6$) de células CAR+ T das composições de células CAR-T anti-CD19 geradas. A carga de tumor foi avaliada por bioluminescência semanalmente ou a cada 10 dias.

[0747] O tratamento de camundongos portadores de tumor com a dose baixa ou alta de células CAR-T melhorou a carga e a sobrevivência do tumor em comparação a nenhum tratamento ou veículo de DMSO. A carga de tumor reduzida foi observada após a administração de uma dose baixa ou alta de células CAR-T de uma composição de célula CAR-T anti-CD19 que foi expandida na presença de PI-103 (**FIGURA 10A**, painéis superiores) ou Composto 63 (**FIGURA 11A**, painéis superiores) em comparação ao veículo de DMSO. Os camundongos portadores de tumor administrados com uma dose baixa ou alta de células CAR-T que haviam sido previamente expandidas na presença de PI-103 ou Composto 63 da mesma forma exibiram sobrevivência substancialmente melhorada em comparação aos camundongos portadores de tumor administrados com células CAR-T expandidas com o veículo de DMSO (**FIGURAS 10A e 11A**, painéis inferiores). Os camundongos portadores de tumor administrados com a alta dose de células CAR-T expandidas na presença do Composto 63 exibiram 100% de sobrevivência por pelo menos 80 dias após o implante de células de tumor. **Figuras 10B e 11B** mostram resultados para a sobrevivência de camundongos portadores de tumor em pontos de tempo posteriores até 100 dias após o implante de células de tumor após o tratamento com células CAR-T expandidas na presença de PI-103 ou Composto 63, respectivamente; os resultados foram consistentes com o efeito das células produzidas na presença do composto 63, resultando em melhor

desempenho das células CAR-T administradas. Os resultados indicam que uma composição de células CAR-T produzida na presença de um inibidor de mTOR cinase, como o Composto 63, exibe melhor desempenho em ensaios *in vivo*. A depuração e sobrevivência de tumor melhoradas no modelo *in vivo* são consistentes com uma melhoria qualitativa do estado e/ou função das células CAR-T que foi alcançada através da inibição da sinalização de mTOR durante a geração de células CAR-T.

Exemplo 6: Ensaio *in vitro* para Estimulação Crônica de Células CAR+ T Utilizando Contas Conjugadas Anti-Idiotipo

[0748] As composições separadas de células CD4+ e CD8+ foram isoladas de doadores humanos, estimuladas pela ativação com contas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 e transduzidas com um vetor viral que codifica um CAR anti-CD19 com um scFv derivado de FMC63. Após o cultivo sob condições para expandir as células, as composições de células T contendo células T CD4+ e CD8+ modificadas de cada doador foram em seguida separadamente colhidas, formuladas e criocongeladas. As células T CD4+ e CD8+ modificadas por criocongelamento foram descongeladas e formuladas em uma relação de 1:1 de células T CD4+ e CD8+ do mesmo doador para gerar uma composição de células T contendo células T CAR+. As contas conjugadas por anticorpo anti-idiotipo (ID) contra o CAR anti-CD19 foram incubadas com células em uma relação de 1:1 de conta:célula por 14 dias.

[0749] A resposta secundária das células CAR-T colhidas no dia 14 após a estimulação específica de CAR com contas conjugadas anti-ID (dia 14; secundária) foi avaliada após a estimulação com células alvo de expressão de antígeno K562-CD19 em uma relação efetora-alvo de 1:1 (para avaliar os níveis de citocinas) ou 3:1 (para avaliar a atividade citolítica). A resposta primária das células T da composição das células

T que não foram incubadas com as contas conjugadas anti-ID da mesma forma foi determinada por estimulação similar com células de expressão de antígeno (Dia 0; "primário"). Para avaliar a atividade citolítica, as células alvo foram marcadas com NuLight Red (NLR) para permitir o rastreamento por microscopia fluorescente. A atividade de extermínio foi avaliada medindo a perda de células alvo viáveis por 72 horas, como determinado pela perda de sinal fluorescente ao longo do tempo por microscopia de fluorescência cinética (usando o INCUCYTE® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). O índice de extermínio foi determinado como o inverso da área sob a curva (AUC) para a fluorescência alvo ao longo do tempo. Os níveis intracelulares de citocinas de IL-2 e TNF-alfa foram avaliados por citometria de fluxo em células T cocultivadas após a incubação na presença de um inibidor de Golgi.

[0750] Como mostrado na **FIGURA 12A**, a morte celular alvo por uma composição de células T contendo células CAR+ T coletadas após a estimulação específica de CAR por 14 dias com contas conjugadas com anti-ID foi reduzida em comparação à atividade citolítica de células CAR+ T que não foram submetidas à estimulação prévia específica para CAR. Os níveis intracelulares de citocinas de IL-2 e TNF-alfa foram da mesma forma reduzidos em células CAR+ T que receberam estimulação específica de CAR a longo prazo com as contas conjugadas anti-ID (**FIGURA 12B**). Estes resultados são consistentes com uma observação de que a estimulação específica a longo prazo do CAR, como por incubação com contas conjugadas anti-ID por 14 dias, leva à estimulação crônica de CAR e à perda da função prolongada.

[0751] O ensaio de estimulação crônica descrito acima foi usado para avaliar os efeitos do PI-103 ou do composto 63 na melhoria da função das células CAR+ T após a estimulação em longo prazo. As composições de células CAR T anti-CD19+ foram geradas como

descrito acima, exceto na presença de PI-103, Composto 63 ou um controle de veículo a partir do início da estimulação. As células de cada composição de célula CAR-T gerada foram incubadas com contas paramagnéticas conjugadas com anti-ID em uma relação 1:1 de conta para célula por 14 dias.

[0752] A resposta primária das composições de células CAR-T no descongelamento (sem estimulação com contas conjugadas anti-ID) ou a resposta secundária de composições CAR-T estimuladas por CAR (após 14 dias de estimulação específica de CAR com contas conjugadas anti-ID) foi avaliada um após a estimulação com células de expressão de antígenos. As composições de células CAR-T foram cultivadas 1:1 com células de expressão de antígeno K562-CD19 na presença de um inibidor de Golgi, e a produção de citocinas polifuncionais foi avaliada por citometria de fluxo após manchamento intracelular por citocina para IL-2, IFN-gama e TNF-alfa. Uma contagem polifuncional foi determinada a partir dos níveis cumulativos de citocinas, como determinado nas células CD8+, após a normalização dos dados por escala dentro dos grupos de doadores (**FIGURA 13A**). As citocinas de IL-2, TNF e IFN-gama totais secretadas de sobrenadante de cultura de células de coculturas após 20 horas de incubação com células alvo foram determinadas, e a média dos escores em escala das três citocinas foi calculada, como mostrado na **FIGURA 13A**. Como mostrado na **FIGURA 13A**, PI-103 ou Composto 63 resultou em respostas primárias ou secundárias melhoradas com base na capacidade das composições de células CAR-T de produzir citocinas. Melhorias na resposta citolítica primária ou secundária, após a cocultura com células alvo na proporção de célula efetora:alvo de 3:1, como descrito acima, foram da mesma forma observadas entre as composições de células T produzidas na presença de PI-103 ou Composto 63 (**FIGURAS 13B e 13C**).

[0753] Estes resultados demonstram a utilidade dos ensaios de estimulação crônicos para avaliar as composições de células CAR-T, incluindo diferentes composições de células CAR-T produzidas em diferentes condições ou na presença de PI-103 ou Composto 63 ou outros agentes, por sua capacidade de exibir sobrevivência a longo prazo e/ou sustentar a função após a estimulação crônica das células CAR-T, tal como pode ocorrer após exposição prolongada ao antígeno *in vivo*.

Exemplo 7: Avaliação Funcional de Células T Transduzidas por Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) (Células CAR T) Preparadas na Presença de um Inibidor de mTOR Cinase

[0754] O impacto da presença de um inibidor da mTOR cinase durante a produção de células foi também avaliado em um processo de modificação de células T, em que as populações de células T CD4+ e CD8+ foram enriquecidas separadamente e em seguida misturadas e processadas em uma única composição. As etapas de processamento, incluindo aquelas para estimulação, transdução com um vetor que codifica um receptor de antígeno quimérico e expansão.

[0755] Composições separadas de células CD4+ e CD8+ foram selecionadas de PBMCs isoladas de uma amostra de leucaferese do mesmo doador humano por seleção baseada em imunoafinidade, e as composições celulares selecionadas foram criocongeladas. As composições separadas de células T CD4+ e CD8+ foram subsequentemente descongeladas e misturadas em uma relação 1:1 de células T CD4+ viáveis para células T CD8+ viáveis. Neste estudo, as populações de células CD4+ e CD8+ misturadas foram incubadas na presença do Composto 63, PI103 ou sem inibidor (controle veículo de DMSO), começando no início da estimulação. Em mais detalhes, a composição de células CD4+ e CD8+ misturadas foi estimulada (na presença ou ausência de um inibidor, como indicado) na presença de

contas revestidas com poliestireno paramagnéticas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 ligados por um período entre 18 a 30 horas e foram em seguida transduzidos com um vetor lentiviral que codifica um CAR anti-CD19. O CAR continha um domínio de ligação ao antígeno scFv específico para CD19 (derivado de FMC63), uma região de transmembrana CD28, uma região de sinalização coestimuladora de 4-1BB e um domínio de sinalização intracelular derivado de CD3-zeta. As células foram em seguida expandidas na presença de citocinas tipicamente por aproximadamente 6-7 dias. Começando com a estimulação e pela duração do processo, os meios continham DMSO (controle veículo), 2 μ M de PI103 ou 1 μ M do composto 63. O controle veículo continha DMSO em um volume para corresponder ao das amostras tratadas com inibidor de mTOR. As células expandidas foram criopreservadas. Para avaliação, as células CAR-T criopreservadas foram descongeladas e lavadas antes da avaliação em meios de ensaio sem citocinas de suporte e sem inibidor ou veículo.

[0756] As células foram avaliadas por citometria de fluxo quanto a níveis dos marcadores da superfície celular e níveis de marcador pró-apoptótico, caspase intracelular 3. As plotagens representativas de citometria de fluxo de três doadores são mostradas na **FIGURA 14**. Como mostrado, as células CAR-T preparadas na presença do Composto 63 foram observadas como tendo níveis diminuídos do marcador pró-apoptótico, caspase intracelular 3.

[0757] Os atributos funcionais das células CAR-T geradas foram avaliados em um ensaio de estimulação serial por incubação do anticorpo das células CAR-T geradas conjugado com contas. O anticorpo anti-CAR era um anticorpo anti-idiotípico que reconhecia o scFv derivado de FMC63 de CAR. As células CAR-T descongeladas foram misturadas com contas específicas de CAR, semeadas e incubadas por 14 dias. A cada 3-4 dias, as células T foram contadas.

Como mostrado na **FIGURA 15**, células CAR-T geradas preparadas na presença de PI103 ou Composto 63 exibiram expansão melhorada após re-estimulação.

[0758] A atividade citolítica das células CAR-T geradas foi avaliada através da cultura das células CAR-T geradas, recentemente descongeladas ou no dia 14 da reestimulação acima, com células alvo de expressão de CD19 em uma relação 3:1 de efetora para alvo. A morte da célula alvo foi quantificada ao longo do tempo. A área de crescimento de células de tumor sob a curva (AUC) de sinal ao longo do tempo para cada concentração foi determinada. Um índice de extermínio foi calculado como o inverso da área sob a curva de crescimento de células de tumor ($1/AUC$). As células CAR-T que foram geradas em um processo na presença de PI103 ou Composto 63 exibiram morte da célula alvo melhorada (**FIGURA 16**) em comparação às células CAR-T preparadas na presença de DMSO.

[0759] Os níveis intracelulares de citocinas foram monitorados em células de coculturas incubadas com células CAR-T geradas recentemente descongeladas ou células CAR-T após re-estimulação secundário com células alvo de expressão de CD19. As células CAR-T foram incubadas com células que expressam o alvo na presença de inibidor de golgi por 5 horas. A expressão intracelular de IL-2, TNF-alfa e IFN-gama foi determinada e um escore polifuncional foi calculado por obstrução para células CAR-T cumulativas positivas para IL-2 e qualquer combinação de IFN-gama e TNF-alfa. Como mostrado na **FIGURA 17A**, as células CAR-T preparadas na presença de PI103 ou Composto 63 exibiram perfis de citocinas efetoras polifuncionais melhoradas nos subconjuntos CD8⁺ e CD4⁺ após a estimulação primária ou secundária (**FIGURA 17A**) em comparação às células CAR-T preparadas na presença de DMSO. As células CAR-T geradas foram da mesma forma cultivadas com células de expressão de antígeno

CD19 por 20 horas e os níveis de IL-2, TNF-alfa e IFN-gama foram avaliados em sobrenadantes da cultura de células por ELISA. As células CAR-T geradas com PI103 ou Composto 63 exibiram níveis aumentados de citocinas segregadas em sobrenadantes (**FIGURA 17B**).

[0760] Juntamente, estes resultados são consistentes com a observação de que a presença de PI103 e Composto 63 durante um processo para produção de células CAR-T a partir de uma população misturada de células T CD4+ e CD8+ melhora a função e a atividade das células CAR-T.

Exemplo 8: Análise da Expressão de Gene de Células CAR-T Preparadas na Presença de um Inibidor de mTOR cinase

[0761] A expressão de gene entre células das composições contendo células CAR-T anti-CD19 (preparadas na presença DMSO, PI-103 ou Composto 63, como descrito no Exemplo 7) foi avaliada por análise de expressão diferencial (DESeq2) de Sequência de RNA. A sequência de RNA foi realizada nas amostras de DNA complementar (cDNA) preparadas a partir do RNA isolado das células CAR-T. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para os conjuntos de dados de sequência de RNA, gerados a partir de contagens normalizadas com DESeq2. As análises de expressão diferencial em nível de gene foram realizadas em R (versão 3.4) usando o pacote DESeq2 (versão 1.16.1) comparando-se amostras tratadas com composto para o controle de DMSO, controlando para doadores. Antes da análise da expressão diferencial, o conjunto de genes foi filtrado para excluir genes com contagem zero em todas as amostras. Os genes diferencialmente expressos (DE) foram identificados pela imposição de um corte de mudança dupla de log₂ de 0,5 e um corte da taxa de detecção falsa (FDR) ajustado por Benjamini-Hochberg de 0,1. Ambos perfis de expressão de gene sobrepostos e não sobrepostos foram

observados em composições contendo células CAR-T preparadas na presença de PI103 ou Composto 63 (FIGURA 18).

Exemplo 9: Avaliação da Carga de Tumor e Sobrevida em um Modelo de Xenoenxerto de Tumor Após Administração de Células CAR-T Preparadas na Presença de um Inibidor de mTOR Cinase

[0762] Os efeitos anti-tumor das composições de células CAR-T anti-CD19 preparadas na presença de DMSO, PI-103 ou Composto 63, como descrito no Exemplo 7, foram avaliados *in vivo*. O modelo de camundongo de xenoenxerto de tumor foi gerado através do implante de camundongos imunodeficientes nod scid gama (NSG) com $0,5 \times 10^6$ células Raji (uma linhagem de célula de tumor de linfócitos B humanos imortalizadas que expressa CD19), que foram deixadas enxertar. As células Raji foram transfectadas com vaga-lume luciferase para facilitar a medição da carga de tumor por imageamento por bioluminescência. Após sete dias, os camundongos não receberam tratamento ou tratamento com uma dose baixa ($0,25 \times 10^6$) ou alta ($1,0 \times 10^6$) de células CAR T anti-CD19+ preparadas na presença de DMSO (veículo) ou DMSO e um inibidor de mTOR cinase. A carga de tumor e a mortalidade foram avaliadas semanalmente.

[0763] Composições de células CAR-T anti-CD19 que foram preparadas separadamente a partir de células de três doadores humanos diferentes, em um processo que inclui a presença de DMSO, foram observadas demonstrar efeitos antitumorais demonstráveis em animais neste estudo, em comparação aos animais não tratados, com animais tratados exibindo diminuição da mortalidade. Os resultados das células preparadas a partir de um doador correspondente são mostrados nas **FIGURAS 19A-B e 20A-20B**. A inclusão do composto inibidor de mTOR cinase 63 (quando comparado à ausência de inibidor, isto é, veículo de DMSO) no processo usado para gerar as células CAR-T, resultou em uma melhoria nas respostas anti-tumor *in vivo* em

animais neste estudo. Resultados exemplares são mostrados nas **FIGURAS 20A e 20B**. Resultados substancialmente similares foram observados com células CAR-T geradas a partir de outro doador. Os resultados que comparam as células CAR-T geradas na presença ou ausência do inibidor PI103 são mostrados nas (**Figuras 19A e 19B**). Para células CAR-T geradas a partir de outro doador, efeitos anti-tumor comparáveis foram observados para células produzidas na presença de PI103 e para células produzidas na ausência de inibidor (veículo de DMSO).

Exemplo 10: Avaliação da Persistência das Células CAR-T *in vivo*

[0764] A presença e o número das células CAR-T anti-CD19 foram avaliados no sangue de animais após a administração de composições contendo as células que foram preparadas na presença de PI-103, Composto 63 ou nenhum inibidor, como descrito no exemplo 7) para os animais. O modelo de xenoenxerto de tumor de linfoma CD19+ de Raji Burkitt descrito no Exemplo 9 foi utilizado. Os camundongos não receberam tratamento, ou receberam tratamento com uma dose baixa ($0,25 \times 10^6$) ou uma dose alta ($1,0 \times 10^6$) das respectivas composições de células CAR T anti-CD19+. A carga de tumor e a mortalidade foram avaliadas a cada 7-10 dias.

[0765] Os camundongos foram sangrados nos dias 18, 25 e 36 após a infusão, e a presença de células CAR+ T CD4+ circulantes ou células CAR+ T CD8+ de sangue periférico foi avaliada por citometria de fluxo. A inclusão do Composto 63 ou PI103 durante a preparação das células CAR-T do mesmo doador pareado como descrito no Exemplo 10 foi observada para resultar em números aumentados de células CAR+ T ao longo do tempo, consistente com uma interpretação de que o uso dos inibidores durante a produção das composições celulares resultou em maior exposição, tal como devido ao aumento da expansão ou persistência, de células *in vivo*, após administração neste modelo de

tumor animal (**FIGURAS 21A e 21B**). Resultados substancialmente similares foram observados com células CAR-T geradas a partir de um segundo doador.

[0766] A presente invenção não é pretendida ser limitada no escopo das modalidades particulares descritas, que são fornecidas, por exemplo, para ilustrar vários aspectos da invenção. Várias modificações nas composições e métodos descritos tornar-se-ão a partir da descrição e dos ensinamentos aqui contidos. Tais variações podem ser praticadas sem afastar-se do verdadeiro escopo e espírito da descrição e pretende-se que se incluam no escopo da presente descrição.

SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
1	ESKYGPPCPPCP	espaçador (articulação IgG4) (aa) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	espaçador (articulação IgG4) (nt) homo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	Espaçador articulação-CH3 Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	Espaçador articulação-CH2- CH3 Homo sapiens
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNT GRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLL	IgD-articulação- Fc

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
	TPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKV PTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSV TCTLNHPQLPPQRLMALREPAQAQAPVKLSLNLLASDPP EAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPAR PPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHE SRTLLNASRSLEVSIVTDH	Homo sapiens
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A artificial
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSIN ATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFHTPPLDPQEL DILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYAN TINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRE FVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYID GPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPN CTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVAL GIGLFM	tEGFR artificial
8	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 153-179 de Número de Acesso P10747) Homo sapiens
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (aminoácidos 114-179 de Número de Acesso P10747) Homo sapiens
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRS	CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747)

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
		Homo sapiens
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYS	CD28 (LL a GG) Homo sapiens
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011.1) Homo sapiens
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	CD3 zeta Homo sapiens
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	CD3 zeta Homo sapiens
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	CD3 zeta Homo sapiens
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENR TDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVS RGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAM NITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNT LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPK IPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR artificial
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A artificial
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
22	PGGG-(SGGG)5-P- em que P é prolina, G é glicina e S é serina	Ligante exemplar
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Ligante exemplar
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Ligante exemplar
25	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Articulação IgG Exemplar
26	X1PPX2P X1 é glicina, cisteína ou arginina X2 é cisteína ou treonina	Articulação IgG Exemplar
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Articulação IgG Exemplar
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Articulação IgG Exemplar
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCP	Articulação IgG Exemplar
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Articulação IgG Exemplar
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Articulação IgG Exemplar
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Articulação IgG Exemplar
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Articulação IgG Exemplar
34	MLGTGPAAATTAATTSSNVSVLQQFASGLKSRNEETRA KAAKELQH YVTMELREMSQEESTRFYDQLNHHIFELVS SSDANERKGGILAIASLIGVEGGNATRIGRFANYLRNLLP SNDPVVMEMASKAIGRLAMAGDTFTA EYVEFEVKRALE WLGADRNEGRRHA AVLVLREL AISVPTFFFQVQPFFD NIFVAVWDPKQAIREGAVAALRA CLITTTQREP KEMQKP QWYRHTFEEAEKGFDETLAKEKGMNRDDRIHGALLILN ELVRISSMEGERLREEMEEITQQQLVHDKYCKDLMGFG TKPRHITPFTSFQAVQPQQSNALVGLLGYSSHQGLMGF GTSPSPAKSTLVESRCCRDLMEEFDQVCQWVLKCRN SKNSLIQMTILNLLPRLA AFRPSAFTDTQYLQDTMNHVL SCVKKEKERTAAFQALGLLSVAVRSEFKVYLPRVLDIIRA ALPPKDFAHKRQKAMQVDATVFTCISMLARAMGPGIQQ DIKELLEPMLAVGLSPALTAVLYDLSRQIPQLKKDIQDGL	Proteína mTOR humana

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
	LKMLSLVLMHKPLRHPGMPKGLAHQLASPGLTTLPEAS DVGSITLALRTLGSFEFEGHSLTQFVRHCADHFLNSEHK EIRMEAARTCSRLLTPSIHLISGHAHVVSQTAVQVVADV LSKLLVVGITDPDPDIRYCVLASLDERFDAHLAQAENLQ ALFVALNDQVFEIRELAICTVGRLLSSMNP AFVMPFLRKM LIQILTELEHSGIGRIKEQSARMLGHLVSNAPRLIRPYME PILKALILKLDPPDPNPGVINNVLATIGELAQVSGLEM RKWVDELFIIMDMLQDSSLLAKRQVALWTLGQLVASTG YVVEPYRKYPTLLEVLLNFKTEQNGQTRREAIRVLGLL GALDPYKHKVNIGMIDQSRDASAVLSSESKSSQDSSDY STSEMLVNMGNLPLDEFYPAVSMVALMRIFRDQSLSHH HTMVVQAITFIFKSLGLKCVQFLPQVMPTFLNVIRVCDG AIREFLFQQLGMLVSFVKSHIRPYMDEIVTLMREFWVMN TSIQSTIILLIEQIVVALGGEFKLYLPQLIPHMLRVFMHDN SPGRIVSIKLLAAIQLFGANLDDYLHLLLPPIVKLFDAPEA PLPSRKALETVDRLTESLDFDYASRIIHPIVRTLQDQSP ELRSTAMDTLSSLVFQLGKKYQIFIPMVNKVLRHRINH QRYDVLICRIVKGYTLADEEEDPLIYQHRMLRSGQGDAL ASGPVETGPMKKLHVSTINLQAWGAARRVSKDDWLE WLRRLSLELLKDSSSPSLRSCWALAQAYNPMARDLFNA AFVSCWSELNEDQQDELIRSIELALTSQDIAEVTQTLLNL AEFMEHSDKGPLPLRDDNGIVLLGERAAKCRAYAKALH YKELEFQKGPTPAILESISINNKLQQPEAAAGVLEYAMK HFGELEIQATWYEKLHEWEDALVAYDKKMDTNKDDPEL MLGRMRCLEALGEWGQLHQCCCKWTLVNDQAKM ARMAAAA WGLGQWDSMEEYTCMIPRDTHDGAFYRA VLALHQDLFSLAQQCIDKARDLLDAELTAMAGESYSRAY GAMV SCHMLSELEEV IQYKLVPERREIIRQIWWERLQG CQRIVEDWQKILMVRSLVSPHEDMRTWLKYASLCGKS GRLALAHKTLVLLLGVDPSRQLDHPLPTVHPQVTYAYM KNMWKSARKIDAFQHMQH FVQTMQQQAQHAIATEDQ QHKQELHKL MARCF LKLG EWQLNLQGINESTIPKVLQY YSAATEHDRSWYKAWHAWVMNFEAVLHYKHQNQAR DEKKLRHASGANITNATTAATTAATTTASTEGSNSE SEAESTENSPTPSPLQKKVTEDL SKTLLMYT VPAVQGGFF RSISLSRGNLQDTLRVLTLWFDYGHWPDVNEALVEGV KAIQIDTWLQVIPQLIARIDTPRPLVGRLIHQLLTDIGRYH	

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
	PQALIYPLTVASKSTTTARHNAANKILKNMCEHSNTLVQ QAMMVSEELIRVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVK GMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQ EWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKQLPQLT SLELQYVSPKLLMCRDLELAVPGTYDPNQPIIRIQSIAPS LQVITSKQRPRKLTLMGSNGHEFVLLKGHEDLRQDER VMQLFGLVNTLLANDPTSLRKNLSIQRYAVIPLSTNSGLI GWVPHCDTLHALIRDYREKKKILLNIEHRIMLRMAPDYD HLTLMQKVEVFEHAVNNTAGDDLAKLLWLKSPSSEVWF DRRTNYTRSLAVMSMVGYLGLGDRHPSNLMLDRLSGK ILHIDFGDCFEVAMTREKFPEKIPFRLTRMLTNAMEVTGL DGNYRITCHTVMEVLREHKDSVMAVLEAFVYDPLLNRW LMDTNTKGNKRSRTRTDSYSAGQSVEILDGVELGEPAH KKTGTTVPESIHSGFIGDGLVKPEALNKKAIQIINRVRDKLT GRDFSHDDTLDVPTQVELLIKQATSHENLCQCYIGWCP FW	
35	QQGNTLPYT	CDR L3
36	RASQDISKYLN	CDR L1
37	SRLHSGV	CDR L2
38	GNTLPYTFG	CDR L3
39	DYGVS	CDR H1
40	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
41	YAMDYWG	CDR H3
42	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIR QPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ VFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	VH
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL
44	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKP GSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRL TTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYA MDYWGQGTSTVTVSS	scFv

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
45	KASQNVGTNVA	CDR L1
46	SATYRNS	CDR L2
47	QQYNRYPYT	CDR L3
48	SYWMN	CDR H1
49	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
50	KTISSVDFYFDY	CDR H3
51	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWW KQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADK SSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYW GQGTTVTVSS	VH
52	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQ QKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
53	GGGGSGGGSGGGGS	Ligante
54	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWW KQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADK SSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIELTQSPKFM STSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLI YSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADY FCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
55	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
56	HTSRLHS	CDR L2
57	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Ligante
58	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctggcgac cgggtgaccatcagctgccggccagccaggacatcagcaagtacctgaac tggtatcagcagaagcccagcggcaccgtcaagctgctgatctaccacacca gccggctgcacagcggcgtgccagccggttagcggcagcggctccggca ccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatgccaccta ctttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaaacaaag ctggaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcga gggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctg gtggccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagc ctgccgactacggcgtgagctggatccggcagccccaggaagggcctg gaatggctggcgtgatctggggcagcagaccacctactacaacagcggc ctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgtc ctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgcatctactactgcgcc	Sequência codificando scFv

SEQ ID NO.	SEQUÊNCIA	DESCRIÇÃO
	aagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggc accagcgtgaccgtgagcagc	
59	MPLLLLLPLLWAGALA	Peptídeo sinal CD33
60	MALPVTALLLPLALLHA	Peptídeo sinal alfa CD8
61	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcct cctgatcca	Sequência sinal de cadeia alfa GMCSFR
62	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	Sequência sinal de cadeia alfa GMCSFR

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma composição de células modificadas, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T humanas primárias, as referidas condições de estimulação compreendendo a presença de (i) 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 (ii) um agente que inibe a atividade de mTOR, em que o agente que inibe a atividade de mTOR é selecionado de 2-(3-hidroxifenil)-9-(2-isopropilfenil)-8-oxo-8,9-di-hidro-7H-purina-6-carboxamida (Composto 63), 6-(4-(2H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)-1-(2-(tetra-hidro-2H-piran-4-il)etil)-1H-imidazo [4,5-b]pirazina-2(3H)-ona (Composto 155), ou 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-((1r,4r)-4-metoxiciclo-hexil)-3,4-di-hidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona (Composto 246); e

(b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende também incubar as células modificadas, em que a incubação compreende a presença do agente que inibe a atividade de mTOR, desse modo produzindo uma composição de saída.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a incubação adicional é realizada na presença de uma ou mais citocinas recombinantes.

4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a incubação adicional compreende cultivar sob condições que resultem em uma proliferação ou expansão

de células na composição.

5. Método para produzir uma composição de células modificadas, o método caracterizado pelo fato de que compreende cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias enriquecidas compreendendo células T modificadas com um receptor recombinante;

em que o agente que inibe a atividade de mTOR é selecionado de 2-(3-hidroxifenil)-9-(2-isopropilfenil)-8-oxo-8,9-di-hidro-7H-purina-6-carboxamida (Composto 63), 6-(4-(2H-1,2,4-triazol-3-il)fenil)-1-(2-(tetra-hidro-2H-piran-4-il)etil)-1H-imidazo [4,5-b]pirazina-2(3H)-ona (Composto 155), ou 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-((1r,4r)-4-metoxiciclo-hexil)-3,4-di-hidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona (Composto 246); e

em que o método resulta na proliferação ou expansão de células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T modificadas.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que, antes do cultivo, o método também compreende:

(a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T primárias na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR; 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, desse modo gerando uma composição estimulada; e em que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63, Composto 155, ou Composto 246; e

(b) introduzir um receptor recombinante na composição

estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

7. Método para produzir uma composição de células modificadas, o método caracterizado pelo fato de que compreende cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias que compreendem células modificadas com um receptor recombinante, em que células na composição não foram expostas ao agente antes de serem cultivadas; e

em que o método resulta na proliferação ou expansão das células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T modificadas.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que as células primárias são células T CD4+ e/ou CD8+.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que a composição de célula T modificada compreende células T CD4+ enriquecidas.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado pelo fato de que a composição de célula T modificada compreende células T CD8+ enriquecidas.

11. Método para produzir uma composição de células modificadas, o método caracterizado pelo fato de que compreende cultivar, na presença de um agente que inibe a atividade de mTOR, uma composição celular modificada que compreende células T humanas primárias CD4+ enriquecidas ou CD8+ enriquecidas compreendendo células T modificadas com um receptor recombinante;

em que o método resulta na proliferação ou expansão de células na composição para produzir uma composição de saída que compreenda células T CD4+ enriquecidas ou CD8+ enriquecidas

modificadas.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 9 e 11, caracterizado pelo fato de que a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD4+; e/ou

a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8 e 10, caracterizado pelo fato de que a composição de célula T modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD8+; e/ou

a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD8+.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 12, caracterizado pelo fato de que o cultivo é realizado na presença de uma ou mais citocinas recombinantes.

15. Método de acordo com a reivindicação 3, 4 ou 8, caracterizado pelo fato de que as referidas uma ou mais citocinas recombinantes compreendem uma ou mais de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, G-CSF, e GM-CSF, opcionalmente em que as referidas uma ou mais citocinas recombinantes compreende uma ou mais de IL-2, IL-7 ou IL-15.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 15, caracterizado pelo fato de que, antes do cultivo, o método também compreende:

(a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada que compreende células T primárias, as referidas condições de estimulação compreendendo 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, desse modo gerando uma composição estimulada; e

(b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 16, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD4+ e/ou CD8+ primárias.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, 16 e 17, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD4+ enriquecidas.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, 16 e 17, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende células T CD8+ enriquecidas.

20. Método para produzir uma composição de células modificadas, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) incubar, sob condições de estimulação, uma composição de entrada compreendendo células T enriquecidas por

CD4+ ou células T humanas primárias CD8+, as referidas condições de estimulação compreendendo a presença de (i) 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 (ii) um agente que inibe a atividade de mTOR; e

(b) introduzir um receptor recombinante na composição estimulada, desse modo gerando uma composição modificada compreendendo células T modificadas.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, 16 a 18 e 20, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD4+; e/ou

a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD4+.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, 16 e 18 a 20, caracterizado pelo fato de que a composição de entrada, a composição estimulada, e/ou a composição modificada compreende mais do que ou mais do que cerca de 70%, mais do que ou mais do que cerca de 75%, mais do que ou mais do que cerca de 80%, mais do que ou mais do que cerca de 85%, mais do que ou mais do que cerca de 90%, mais do que ou mais do que cerca de 95% ou mais do que, ou mais do que cerca de 98% de células T humanas primárias CD8+; e/ou

a composição de entrada consiste essencialmente em células T humanas primárias CD8+.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 22, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é um composto, uma molécula pequena, uma molécula orgânica pequena, um polinucleotídeo, um oligonucleotídeo, um siRNA, ou um polipeptídeo.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 23, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe atividade de mTORC1 e/ou mTORC2 cinase.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 24, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de pelo menos uma cinase adicional.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a referida pelo menos uma cinase adicional é PI3K.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é BEZ235, BGT226, GDC0980, NVP-BEZ235, PF-04691502, PI-103, SAR245409, SF1126, VS5584, ou XL765.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 27, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR:

(i) não inibe a atividade de PI3K;

(ii) não inibe detectavelmente a atividade de PI3K na IC_{50} para atividade de mTOR; e/ou

(iii) não inibe detectavelmente PI3K em todas as concentrações que inibem detectavelmente a atividade de mTOR.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe a atividade de mTORC1 e mTORC2 cinase.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 27, 28, ou 29, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é uma pirazolopirimidina, Torina I, Torcinibe, PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth), OSI-027, DS3078a, AZD8055.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 30, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR inibe seletivamente a atividade de mTORC1.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR:

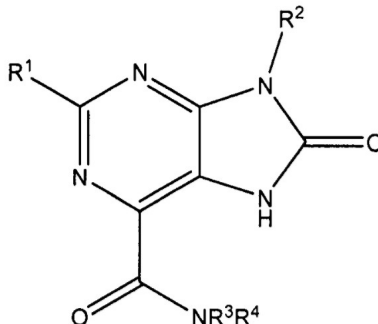
(i) não inibe a atividade de mTORC2;

(ii) não inibe detectavelmente a atividade de mTORC2 na IC_{50} para a atividade de mTORC1; e/ou

(iii) não inibe detectavelmente mTORC2 em todas as concentrações que inibem detectavelmente a atividade de mTORC1.

33. Método de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é rapamicina, tensirolimus, everolimus, deforolimus, ou AZD8055.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 24, 28, ou 29, caracterizado pelo fato de que o agente compreende uma fórmula mencionada na Fórmula I,



Fórmula (I)

em que R^1 é C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

R^2 é C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída, e

R^3 e R^4 são independentemente H ou C_{1-8} alquila.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que R^1 é arila substituída, heteroarila substituída ou não substituída, tal como fenila substituída.

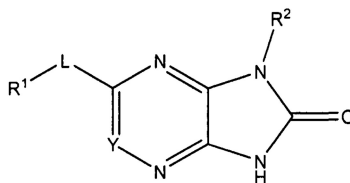
36. Método de acordo com a reivindicação 34 ou 35, caracterizado pelo fato de que R^2 é arila substituída ou não substituída, e/ou uma fenila substituída ou não substituída.

37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 36, caracterizado pelo fato de que grupos que são substituídos são substituídos com um ou mais grupos halogênio; C_{1-8} alquila; C_{2-8} alquenila; C_{2-8} alquinila; hidroxila; C_{1-8} alcoxila; amino; nitro; tiol; tioéter; imina; ciano; amido; fosfonato; fosfina; carboxila; tiocarbonila; sulfonila; sulfonamida; cetona; aldeído; éster; carbonila; haloalquila; $B(OH)_2$; cicloalquila carbocíclica, heterocicloalquila, heteroarila ou arila monocíclica ou policíclica fundida ou não fundida;

amino; alquila O-inferior; O-arila, arila; aril-alquila inferior; CO₂CH₃; CONH₂; OCH₂CONH₂; NH₂; SO₂NH₂; OCHF₂; CF₃; ou OCF₃.

38. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 24, 28, ou 29, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é 2-(3-hidroxifenil)-9-(2-isopropilfenil)-8-oxo-8,9-di-hidro-7H-purina-6-carboxamida (Composto 63).

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 24, 28, ou 29, caracterizado pelo fato de que o agente compreende a fórmula mencionada na Fórmula (II),



Fórmula (II)

em que L é uma ligação direta, NH ou O,

Y é N ou CR³,

em que R¹ é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, C₂₋₈ alquenila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

R² é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída,

R³ é H, C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquila substituída ou não substituída, -NHR⁴ ou -N(R⁴)₂, e

R⁴ é em cada ocorrência independentemente C₁₋₈

alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, ou heterocicloalquila substituída ou não substituída.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que R^1 é arila substituída, e/ou uma fenila substituída.

41. Método de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que Y é CH.

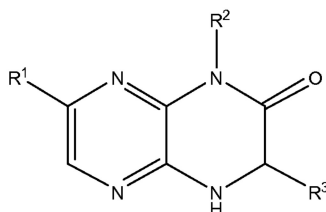
42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 41, caracterizado pelo fato de que L é uma ligação direta.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 42, caracterizado pelo fato de que R^1 é arila substituída e R^2 é C_{1-8} alquila substituída por um ou mais substituintes selecionados de alcóxi, amino, hidróxi, cicloalquila, ou heterocicloalquila.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que R^2 é C_{1-8} alquila substituída por uma heterocicloalquila.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, 23, 24, ou 34 a 39, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 155.

46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 24, 28, ou 29, caracterizado pelo fato de que o agente compreende uma fórmula mencionada na Fórmula III



Fórmula (III)

em que R^1 é C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, ou heterociclilalquila substituída ou não substituída,

R^2 é H, C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída, heterociclilalquila substituída ou não substituída, substituída ou não substituída aralquila, ou cicloalquilalquila substituída ou não substituída, e

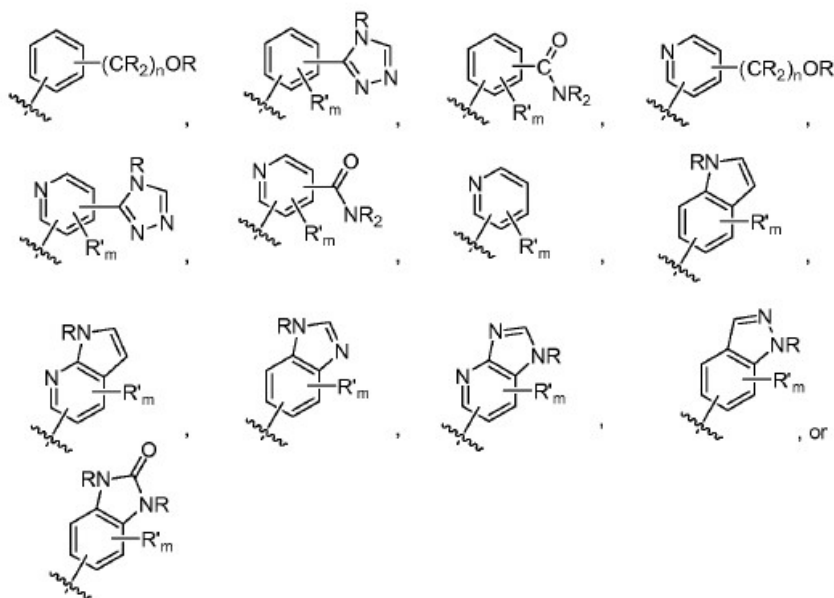
R^3 é H, ou a substituída ou não substituída C_{1-8} alquila.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que R^1 é arila substituída ou não substituída ou heteroarila substituída ou não substituída.

48. Método de acordo com a reivindicação 46 ou 47, caracterizado pelo fato de que R^1 é piridila que é substituída.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 48, caracterizado pelo fato de que R^1 é piridila substituída com um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída (halogênio, aminocarbonila, ciano, hidroxialquila, -OR, e -NR₂, em que cada R é independentemente H, ou uma C_{1-4} alquila substituída ou não substituída. Em algumas modalidades, R^1 é 1H-pirrolo[2,3-b]piridila ou benzimidazolila, opcionalmente substituída por um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em C_{1-8} alquila substituída ou não substituída, e -NR₂, em que R é independentemente H, ou uma C_{1-4} alquila substituída ou não substituída.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 49, caracterizado pelo fato de que R^1 é

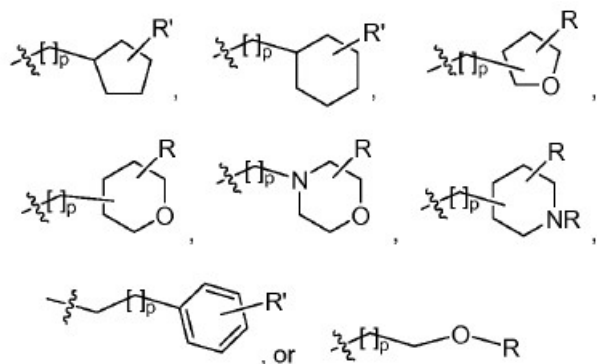


legenda: ou

em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou uma C_{1-4} alquila substituída ou não substituída (por exemplo, metila); R^1 é em cada ocorrência independentemente a substituída ou não substituída C_{1-4} alquila, halogênio, ciano, -OR, ou $-NR_2$; m é 0-3; e n é 0-3.

51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 50, caracterizado pelo fato de que R^2 é H, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, sec-butila, isobutila, *terc*-butila, n-pentila, isopentila, ciclopentila, ciclo-hexila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila, (C_{1-4} alquil)-fenila, (C_{1-4} alquil)-ciclopropila, (C_{1-4} alquil)-ciclobutila, (C_{1-4} alquil)-ciclopentila, (C_{1-4} alquil)-ciclo-hexila, (C_{1-4} alquil)-pirrolidila, (C_{1-4} alquil)-piperidila, (C_{1-4} alquil)-piperazinila, (C_{1-4} alquil)-morfolinila, (C_{1-4} alquil)-tetra-hidrofuranila, ou (C_{1-4} alquil)-tetra-hidropiranila, cada opcionalmente substituída.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 50, caracterizado pelo fato de que R^2 é H, C_{1-4} alquila, (C_{1-4} alquil)(OR),



em que R é em cada ocorrência independentemente H, ou uma C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, R' é em cada ocorrência independentemente H, -OR, ciano, ou uma C₁₋₈ alquila substituída ou não substituída, e p é 0-3.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 24, 28, ou 29, ou 46 a 52, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é 7-(6-(2-hidroxiopropan-2-il)piridin-3-il)-1-((1r,4r)-4-metoxiciclo-hexil)-3,4-di-hidropirazino[2,3-b]pirazin-2(1H)-ona (Composto 246).

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 6 e 38, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63 e a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 µM, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 63.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 38, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 63 e a composição celular modificada é incubada na presença de entre 500 nM e 2 µM, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 63.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 45, caracterizado pelo fato de que o agente que

inibe a atividade de mTOR é Composto 155 e a composição celular modificada é incubada na presença de entre 500 nM e 2 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 155.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 6 e 38, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 155 e a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 155.

58. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 53, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 246 e a composição celular modificada é incubada na presença de entre 500 nM e 2 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 246.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 6 e 53, caracterizado pelo fato de que o agente que inibe a atividade de mTOR é Composto 246 e a composição celular modificada é cultivada na presença de entre 500 nM e 2 μ M, entre 1 nM e 100 nM, entre 50 nM e 250 nM, ou entre 100 nM e 500 nM de Composto 246.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 16 a 58, 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.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, 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.

62. Método de acordo com a reivindicação 60 ou 61, 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 dos mesmos.

63. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59 a 61, caracterizado pelo fato de que o agente primário e/ou agente secundário estão presentes sobre a superfície de um suporte sólido, opcionalmente em que o suporte sólido é ou compreende uma conta.

64. Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que a conta compreende um diâmetro de mais do que ou mais 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 .

65. Método de acordo com a reivindicação 63 ou 64, caracterizado pelo fato de que a conta compreende um diâmetro de ou cerca de 4,5 μm .

66. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 65, caracterizado pelo fato de que a conta é inerte.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 66, caracterizado pelo fato de que a conta é ou compreende uma superfície de poliestireno.

68. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 67, caracterizado pelo fato de que a conta é magnética ou superparamagnética.

69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 68, caracterizado pelo fato de que a relação de contas para células é de, ou de cerca de 4:1 a 0,25:1.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 16 a 69, caracterizado pelo fato de que a introdução compreende transduzir células da composição estimulada com um vetor viral compreendendo um polinucleotídeo codificando o receptor recombinante.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é um vetor retroviral.

72. Método de acordo com a reivindicação 70 ou 71, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é um vetor lentiviral ou vetor gamarretroviral.

73. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 72, caracterizado pelo fato de que o método também compreende coletar células da composição de saída.

74. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 73, caracterizado pelo fato de que também compreende formular células da composição de saída para criopreservação e/ou administração a um indivíduo, opcionalmente na presença de um excipiente farmacologicamente aceitável.

75. Método de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que as células da composição de saída são formuladas na presença de um crioprotetor.

76. Método de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que o crioprotetor compreende DMSO.

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 76, caracterizado pelo fato de que as células da composição de saída são formuladas em um recipiente, opcionalmente um frascote ou uma bolsa.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 16 a 77, caracterizado pelo fato de que também compreende isolar as células T CD4+ e/ou CD8+ de uma amostra biológica antes da incubação.

79. Método de acordo com a reivindicação 78, 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.

80. Método de acordo com a reivindicação 78 ou 79, caracterizado pelo fato de que o isolamento compreende realizar seleção com base em imunoafinidade.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 80, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica compreende células T primárias obtidas de um indivíduo.

82. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 81, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é ou compreende 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.

83. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 82, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é capaz de se ligar a um antígeno alvo que é associado com, específico para, e/ou expresso em uma célula ou tecido de uma doença, distúrbio ou condição.

84. Método de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que a doença, distúrbio ou condição é uma doença ou distúrbio infeccioso, uma doença autoimune, uma doença inflamatória, ou um tumor ou um câncer.

85. Método de acordo com a reivindicação 83 ou 84, caracterizado pelo fato de que o antígeno alvo é um antígeno de tumor.

86. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 a 85, caracterizado pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado dentre 5T4, 8H9, avb6 integrina, B7-H6, antígeno de maturação de célula B (BCMA), CA9, um antígeno de testículos de câncer, anidrase 9 carbônica (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, efrinaB2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, dímeros erbB, EGFR vIII, receptor de estrogênio, AchR fetal, receptor alfa de folato, proteína de ligação de folato (FBP), FCRL5, FCRH5, receptor de acetilcolina fetal, G250/CAIX, GD2, GD3, Receptor 5D Acoplado à Proteína G (GPRC5D), gp100, Her2/neu (erbB2 de tirosina cinase receptora), HMW-MAA, IL-22R-alfa, receptor alfa 2 de IL-13(IL-13Ra2), receptor de domínio de inserção de cinase (kdr), cadeia leve kappa, Lewis Y, molécula de adesão de célula L1 (L1-CAM), antígeno associado com melanoma (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, mesotelina, CMV de murino, mucina 1 (MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, ligantes NKG2D, NY-ESO-1, GD2 O-acetilado (OGD2), antígeno oncofetal, antígeno preferencialmente expresso de melanoma (PRAME), PSCA, receptor de progesterona, survivina, ROR1, TAG72, tEGFR, receptores VEGF, VEGF-R2, Tumor Wilms 1 (WT-1), um antígeno específico de patógeno e um antígeno associado com um marcador universal.

87. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 86, 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 dos mesmos.

88. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 87, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é um receptor de antígeno quimérico (CAR).

89. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 88, caracterizado pelo fato de que o receptor recombinante é um CAR anti-CD19.

90. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico compreende um domínio extracelular compreendendo um domínio de ligação ao antígeno e uma região de sinalização intracelular, compreendendo um domínio de sinalização intracelular.

91. Método de acordo com a reivindicação 90, 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.

92. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende regiões variáveis de anticorpo unidas por um ligante flexível.

93. Método de acordo com a reivindicação 91 ou 92, caracterizado pelo fato de que o fragmento compreende uma scFv.

94. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 93, caracterizado pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico também compreende um domínio de membrana entre o domínio extracelular e a região de sinalização intracelular.

95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 94, caracterizado pelo fato de que o receptor de antígeno quimérico também compreende um espaçador entre o domínio de ligação ao antígeno e o domínio de membrana, opcionalmente

em que o espaçador é uma porção de uma região constante de imunoglobulina, opcionalmente em que a porção é ou compreende uma região de articulação.

96. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 90 a 95, 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).

97. Método de acordo com a reivindicação 96, 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 do mesmo.

98. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 90 a 97, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização intracelular também compreende uma região de sinalização coestimulatória.

99. Método de acordo com a reivindicação 98, caracterizado 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 do mesmo.

100. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, caracterizado pelo fato de que a região de sinalização coestimulatória compreende um domínio de sinalização intracelular de uma CD28, um 4-1BB ou um ICOS ou uma porção de sinalização do mesmo.

101. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 100, caracterizado pelo fato de que a região de

sinalização coestimulatória é entre o domínio de transmembrana e a região de sinalização intracelular.

102. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 15 a 101, caracterizado pelo fato de que as células T primárias compreendem composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas, e em que as composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são incubadas separadamente.

103. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 16 e 23 a 101, caracterizado pelo fato de que as células T primárias compreendem composições separadas de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas, e em que as composições de células T CD4+ enriquecidas e células T CD8+ enriquecidas são cultivadas separadamente.

104. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende células modificadas produzidas por um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 103.

105. Composição de acordo com a reivindicação 104, caracterizada pelo fato de que também compreende um veículo farmacologicamente aceitável.

106. Composição de acordo com a reivindicação 104 ou 105, caracterizada pelo fato de que compreende um crioprotetor, opcionalmente DMSO.

107. Artigo de fabricação, caracterizado pelo fato de que compreende uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 104 a 106, e instruções para a administração da composição de saída a um indivíduo.

108. Artigo de fabricação de acordo com a reivindicação 107, 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.

109. Artigo de fabricação de acordo com a reivindicação 107 ou 108, caracterizado pelo fato de que a composição de saída é uma composição de células T CD4+ modificadas.

110. Artigo de fabricação de acordo com a reivindicação 107 ou 108, caracterizado pelo fato de que a composição de saída é uma composição modificada de células T CD8+.

111. Artigo de fabricação de acordo com a reivindicação 107 ou 108, caracterizado pelo fato de que a composição de saída é uma composição modificada de células T CD4+ e CD8+.

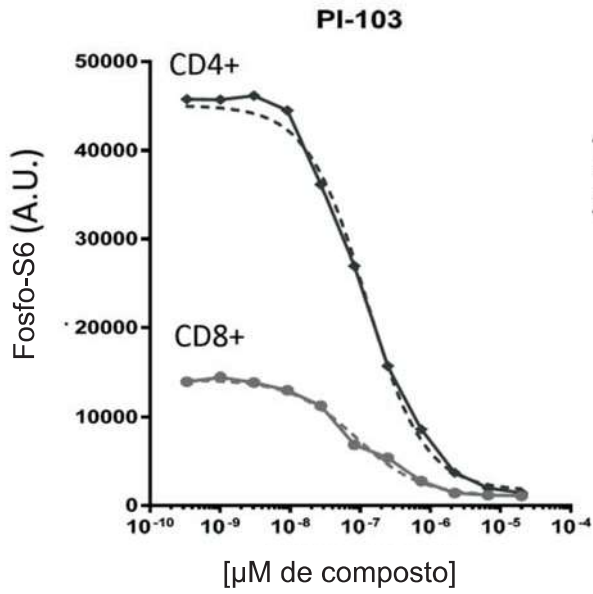


FIG. 1A

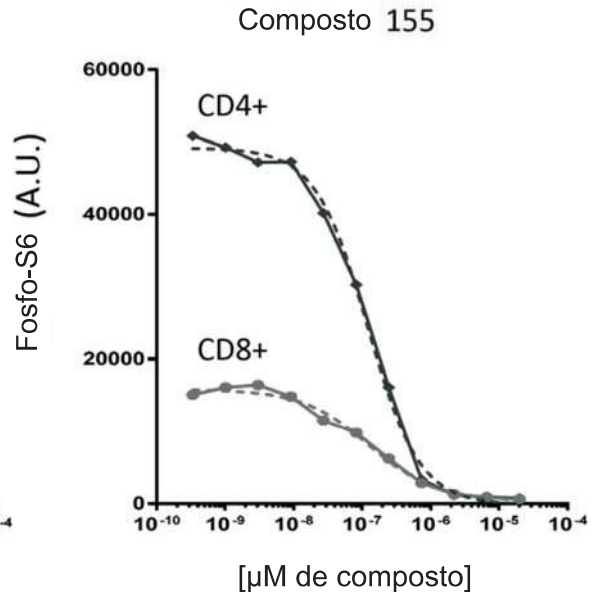


FIG. 1B

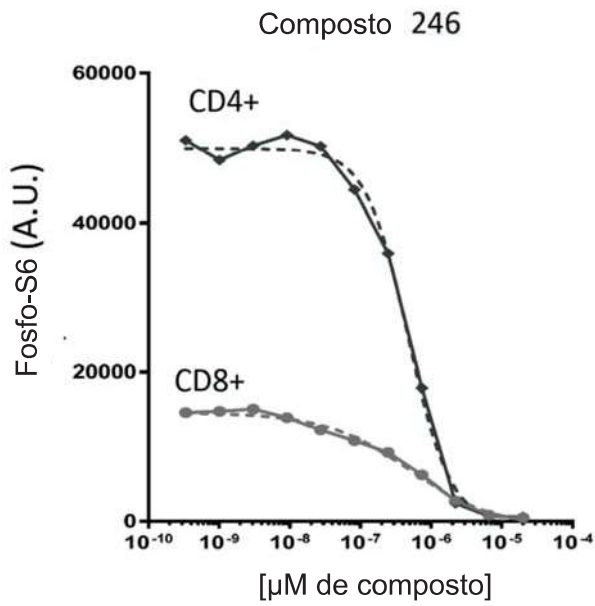


FIG. 1C

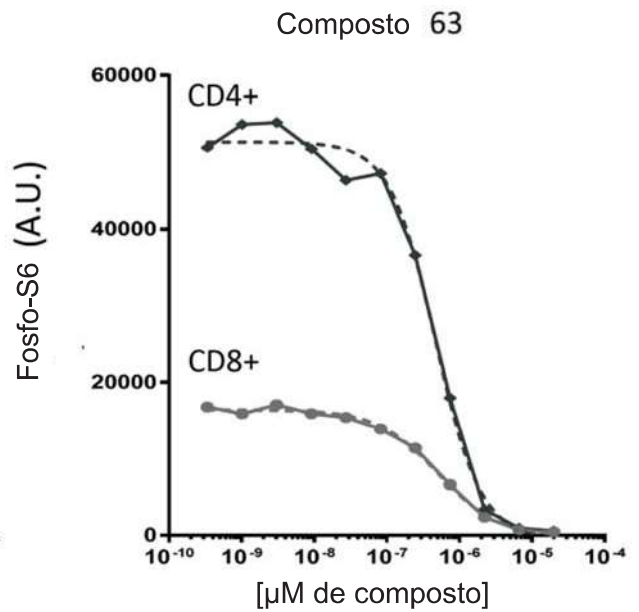


FIG. 1D

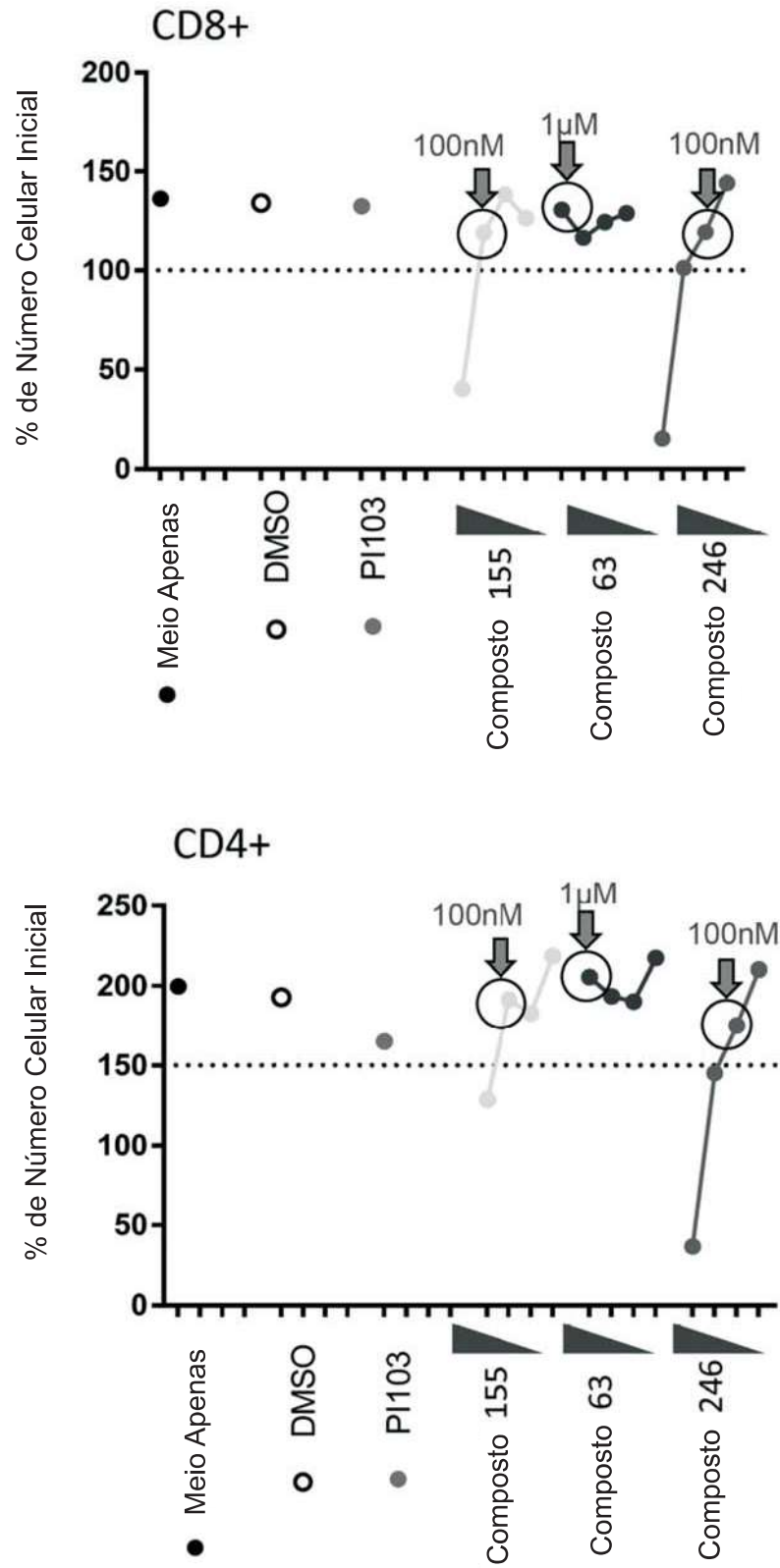


FIG. 2

Mudança de ECAR

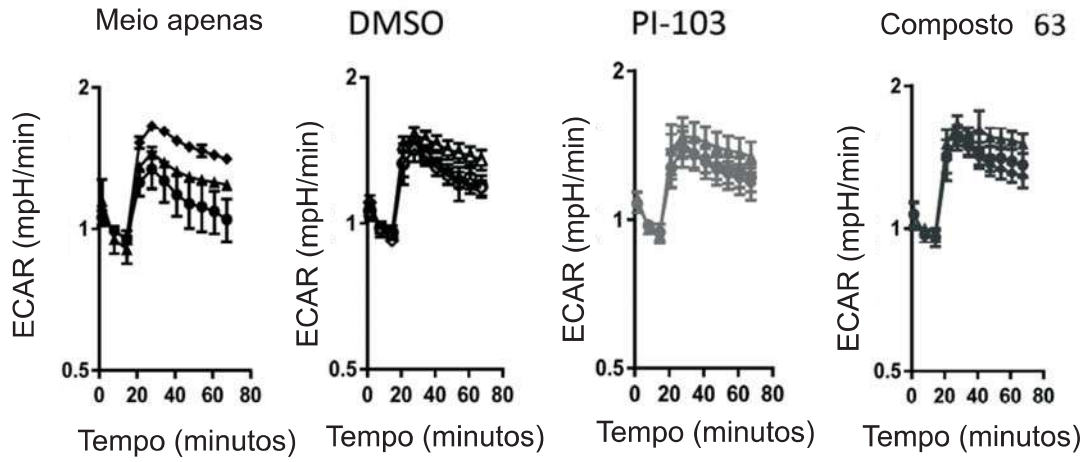


FIG. 3A

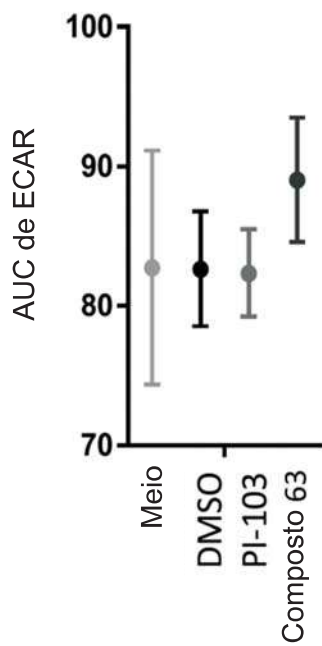


FIG. 3B

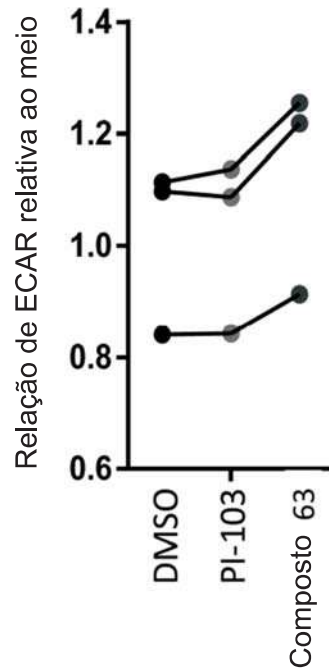


FIG. 3C

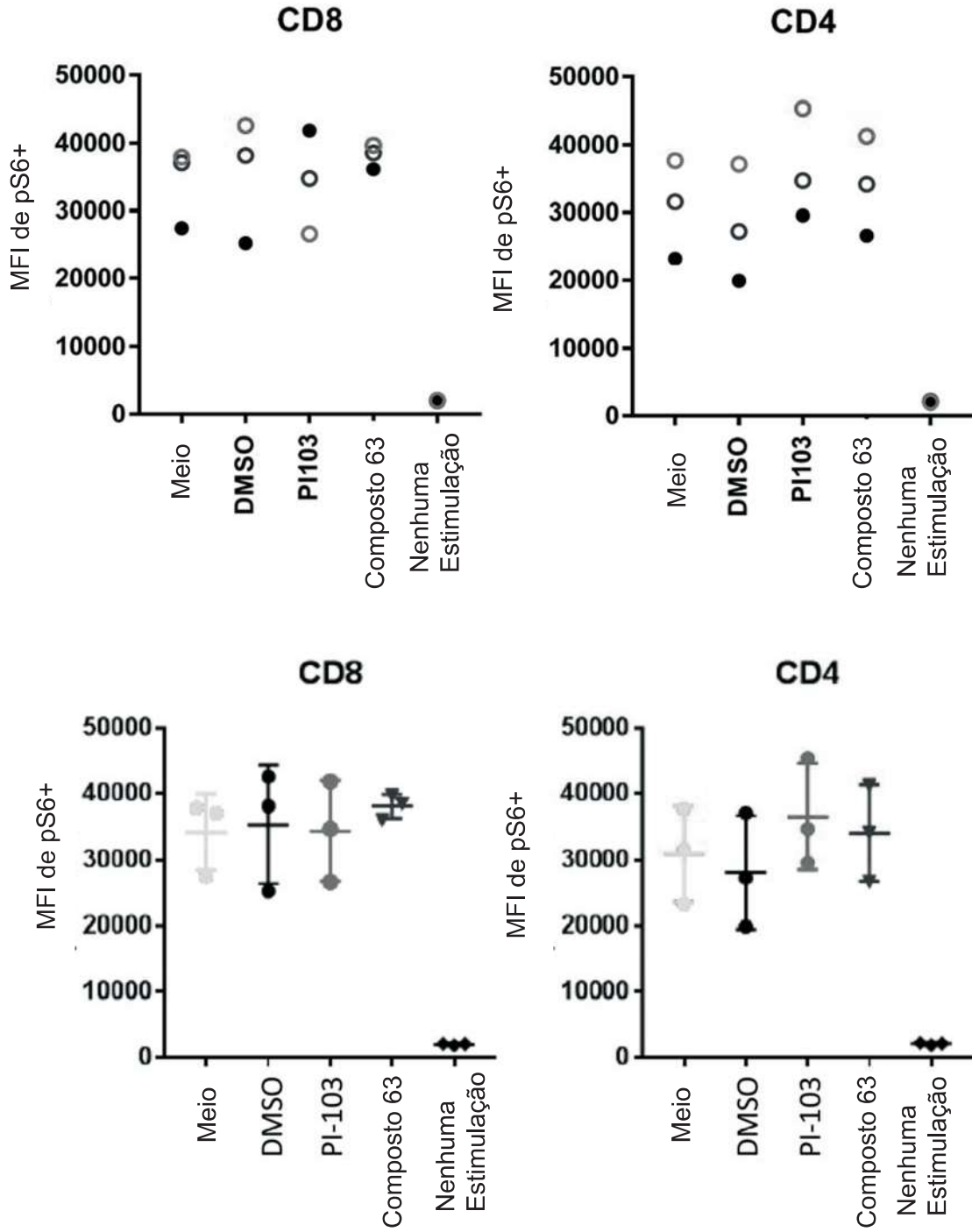


FIG. 4A

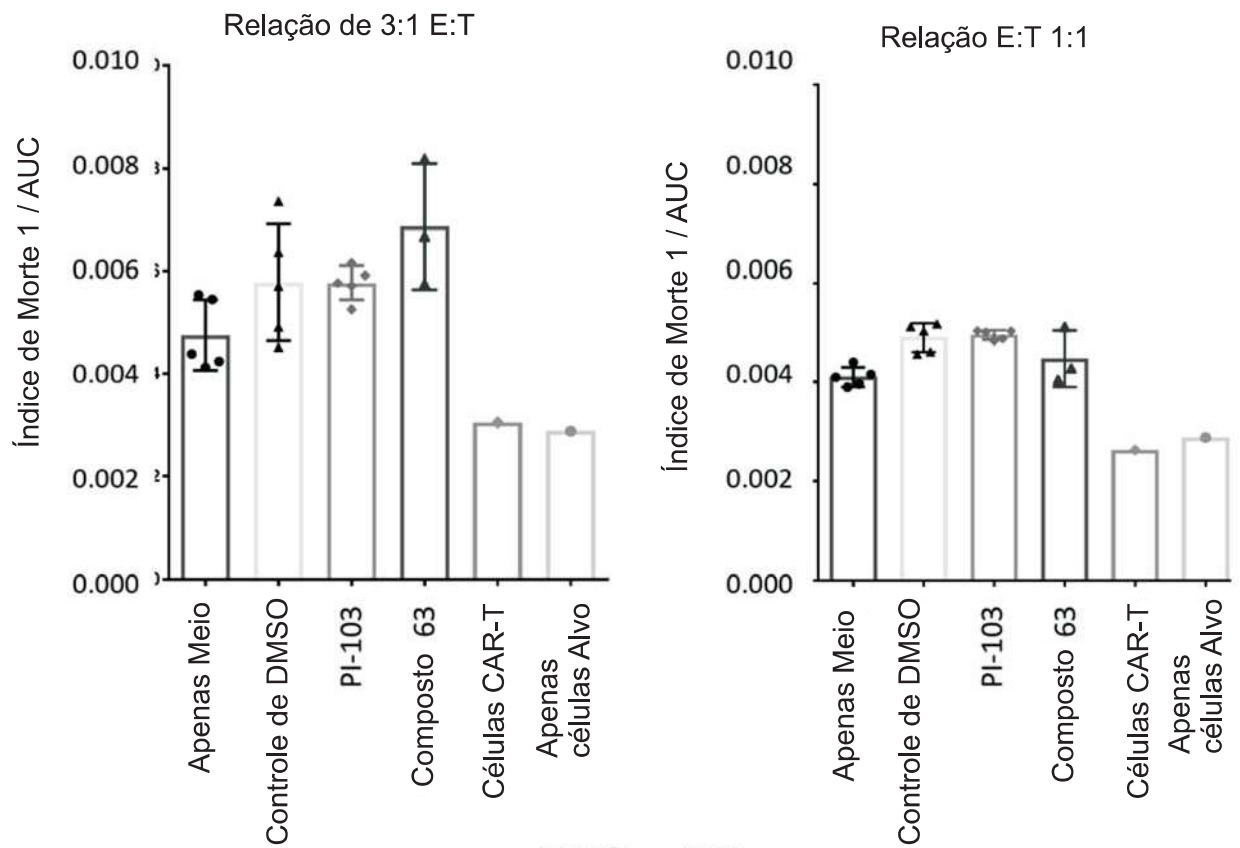


FIG. 4B

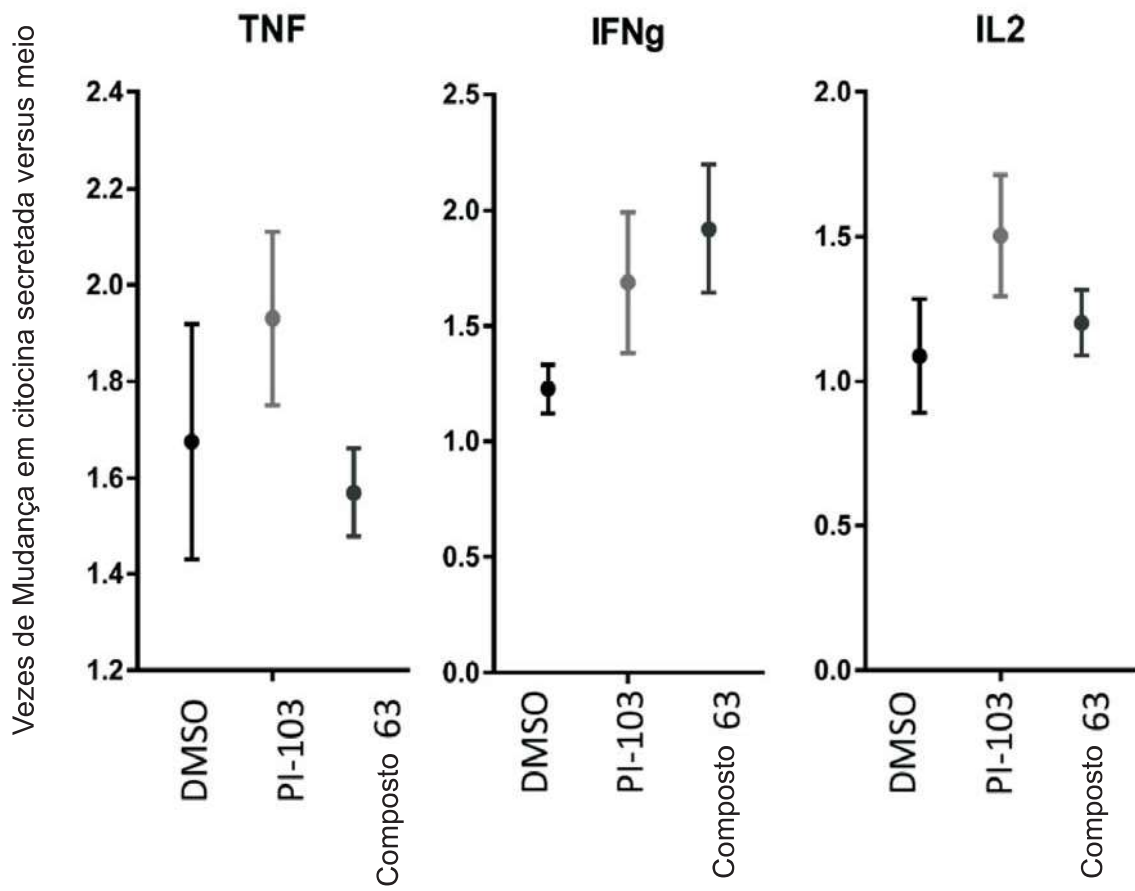
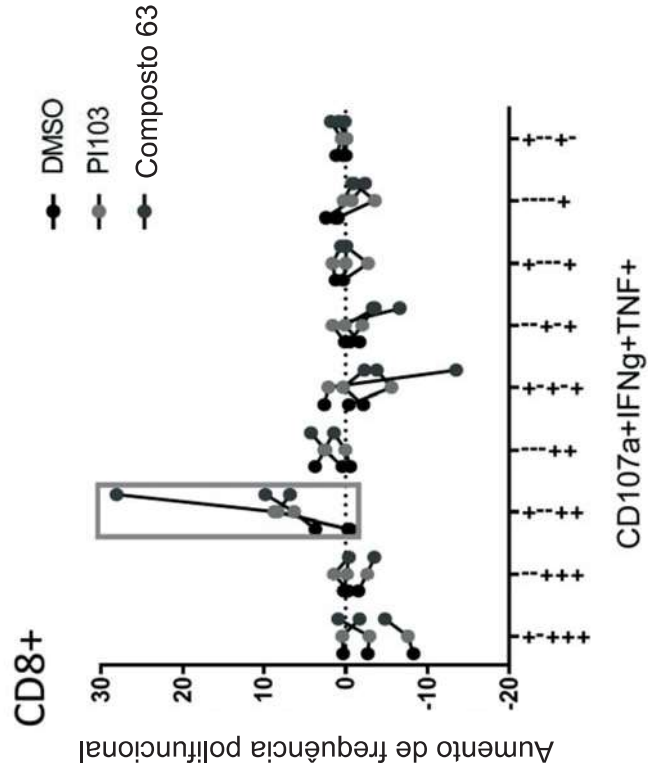


FIG. 5

Combinações:

- + TNF
- + IL17a
- + IL2
- + IFNg
- + CD107a

Estipulação de PI de CD19+



Inibidor Golgi de CD19+

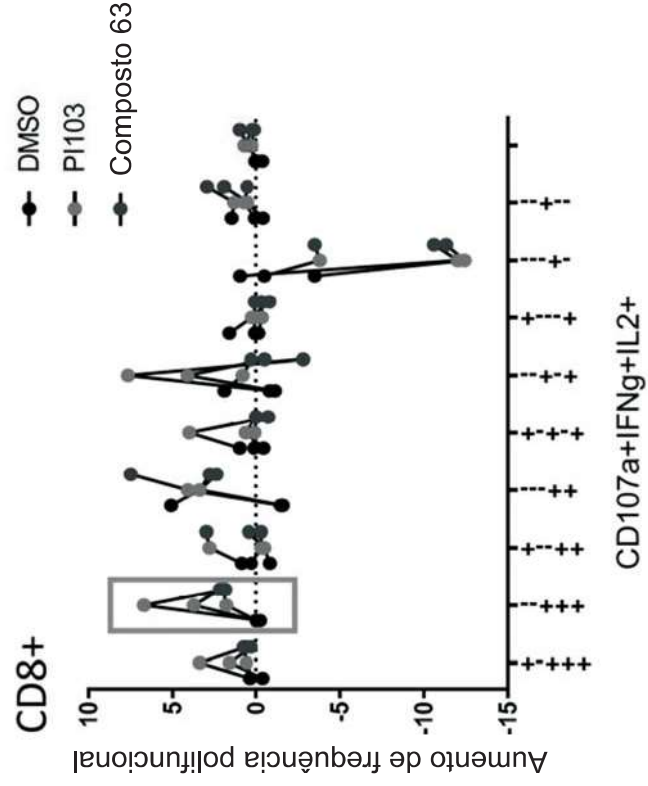


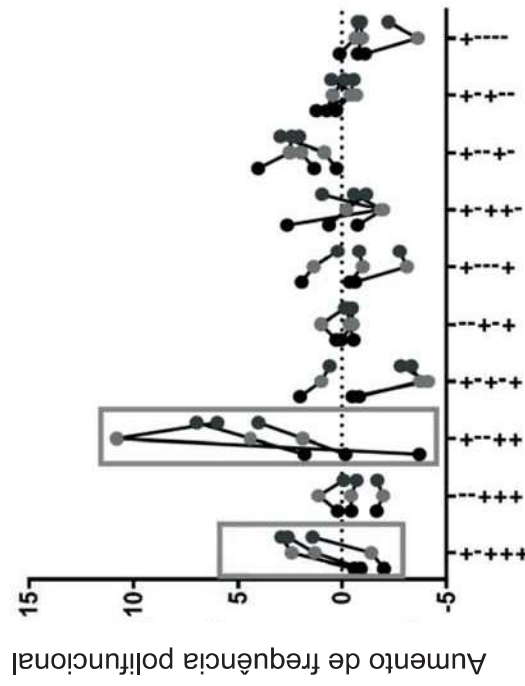
FIG. 6A

Combinaciones:

- + TNF
- + IL17a
- + IL2
- + IFNg
- + CD107a

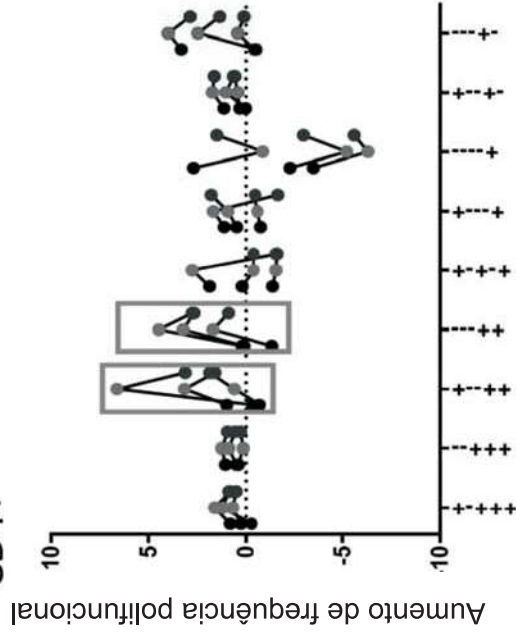
Estipulacion de PI de CD19+

CD4+



Inibidor Golgi de CD19+

CD4+



8/33

- DMSO
- P1103
- Composto 63

CD107a+IFNg+IL2+TNF+ CD107a+IFNg+TNF+ CD107a+IFNg+TNF+ CD107a+IFNg+

FIG. 6B

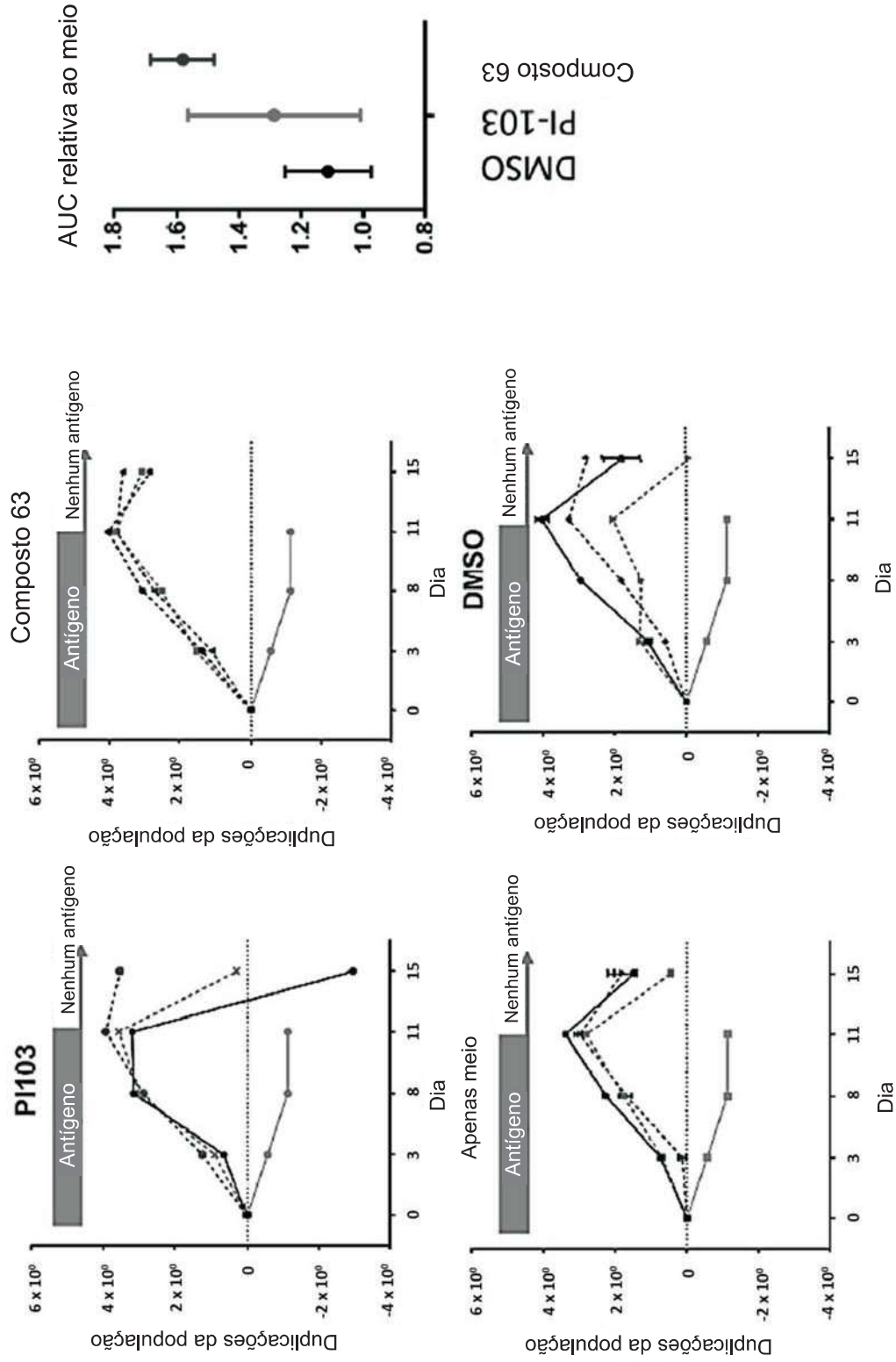


FIG. 7A

FIG. 7B

10/33

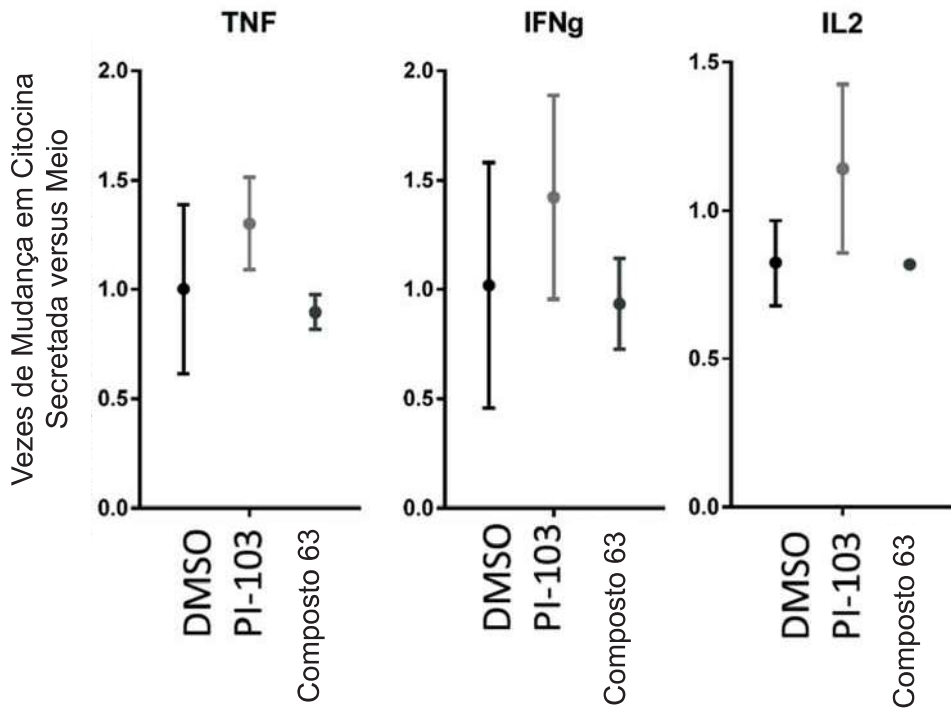


FIG. 7C

Combinações:

- + TNF
- + IL17a
- + IL2
- + IFN γ
- + CD107a

Estimulação serial de CD19-K562 Polifuncional : **CD8 19+K** apenas

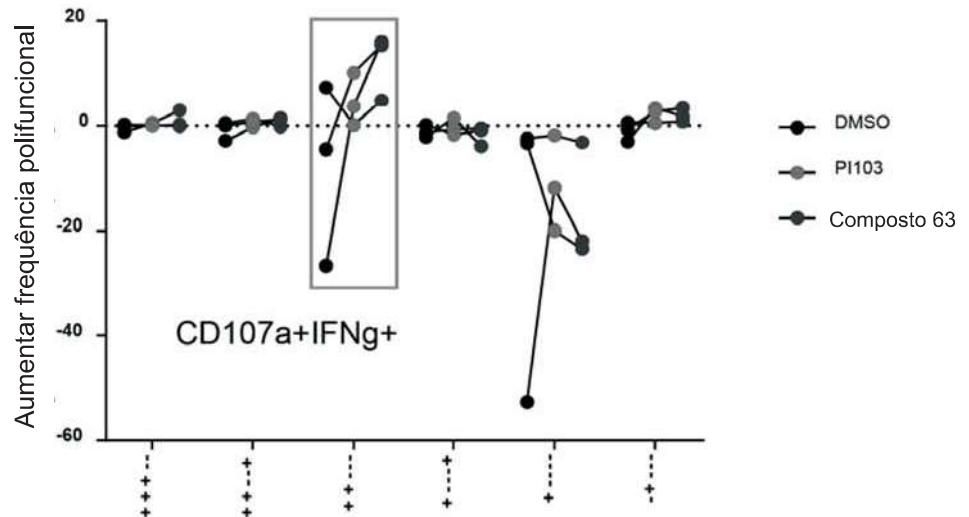


FIG. 7D

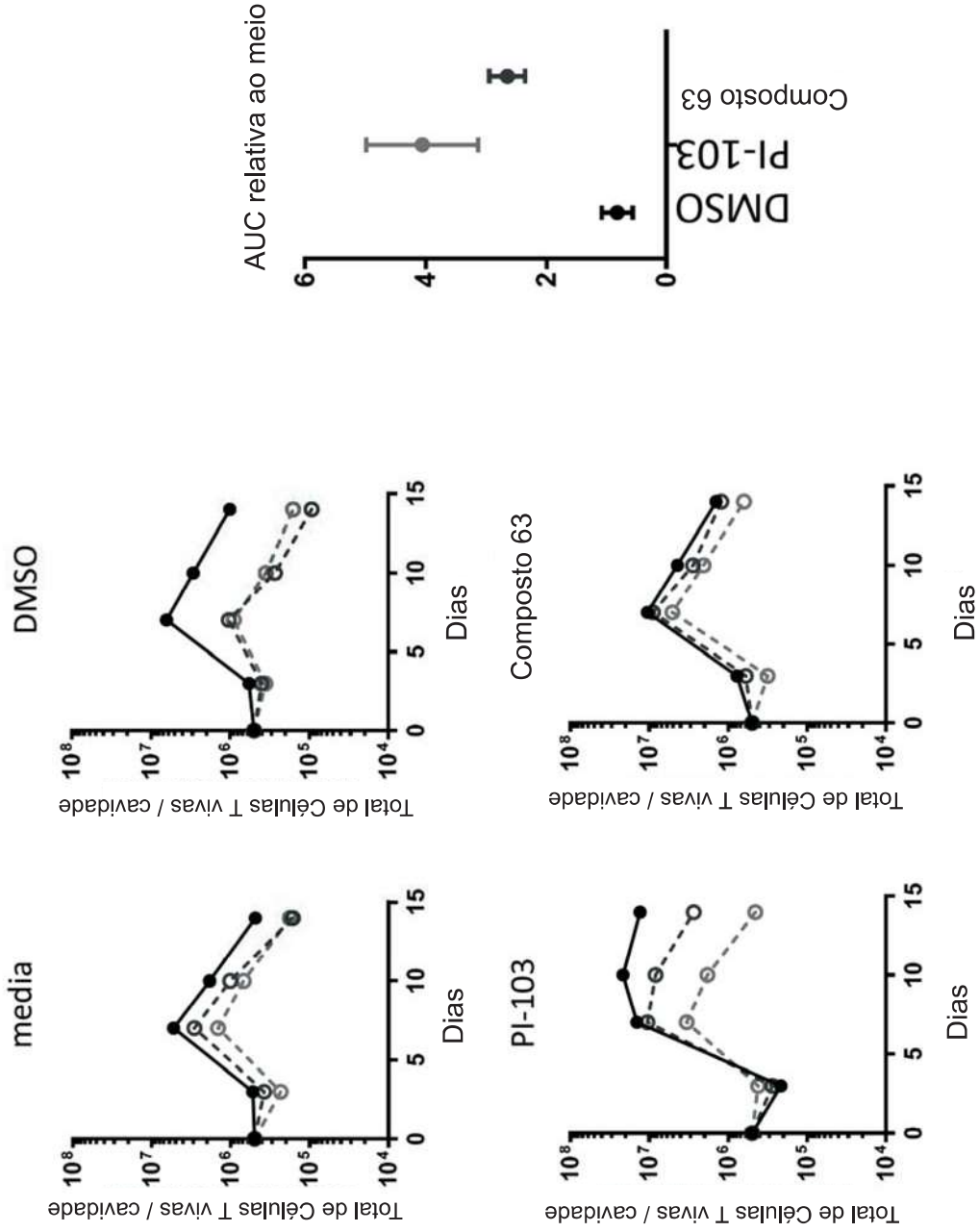


FIG. 8A

FIG. 8B

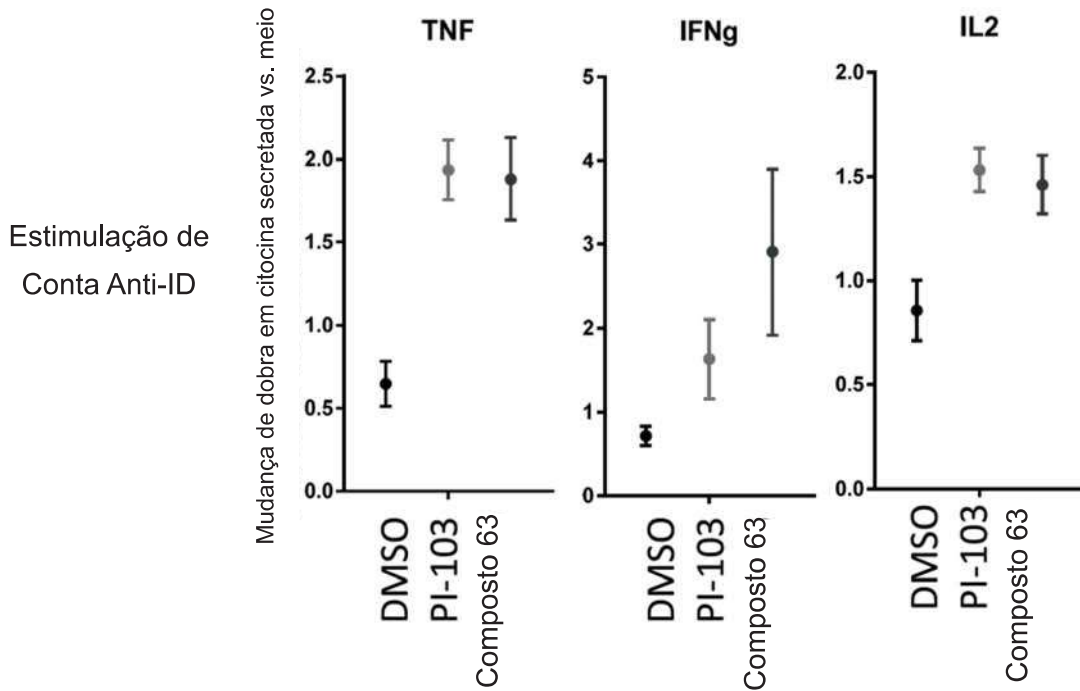


FIG. 8C

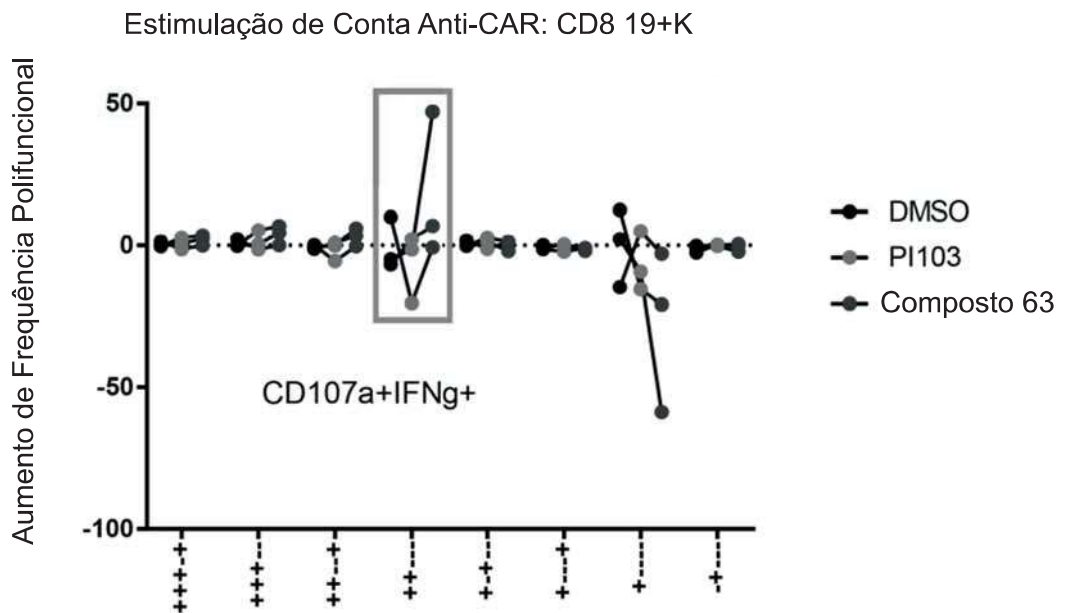


FIG. 8D

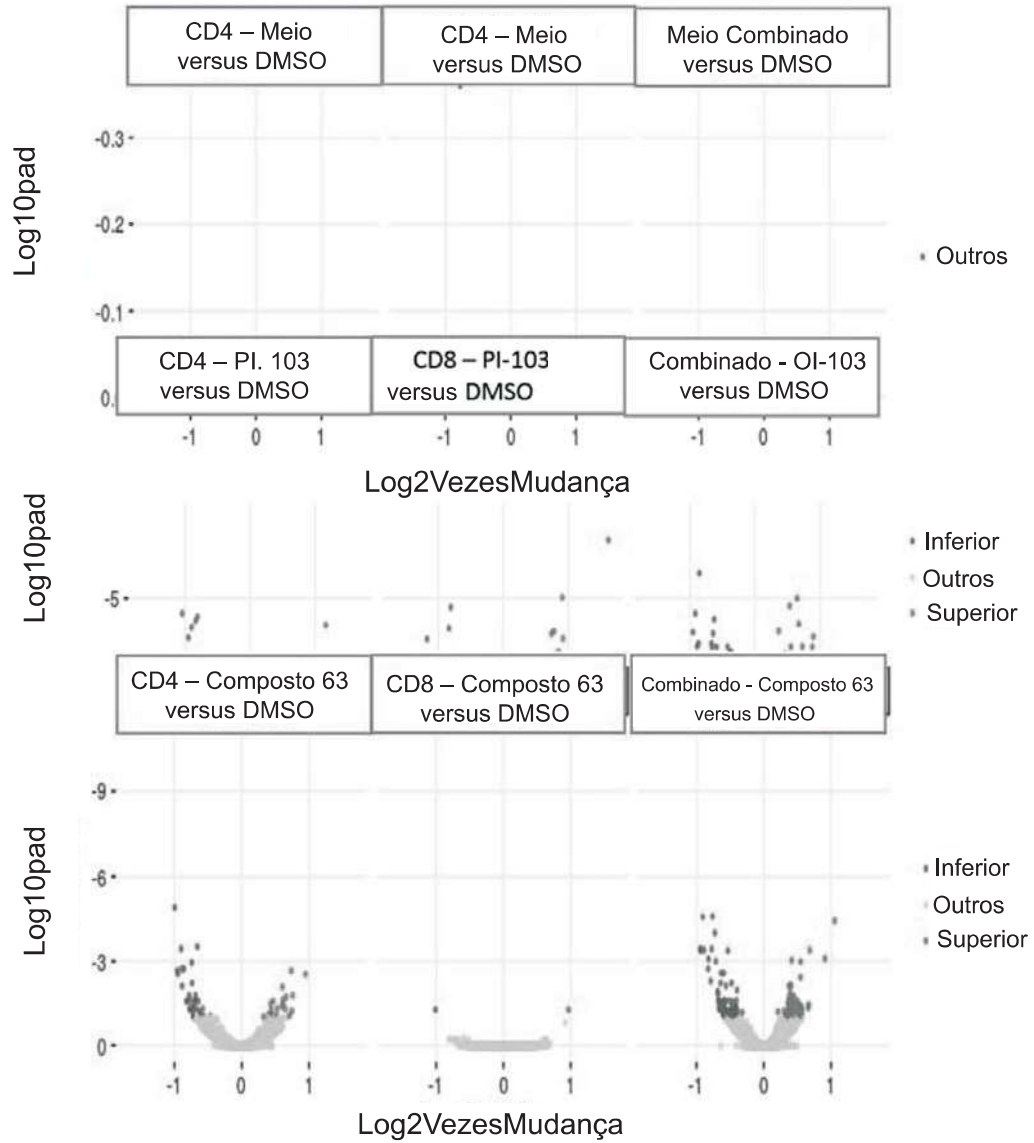


FIG. 9A

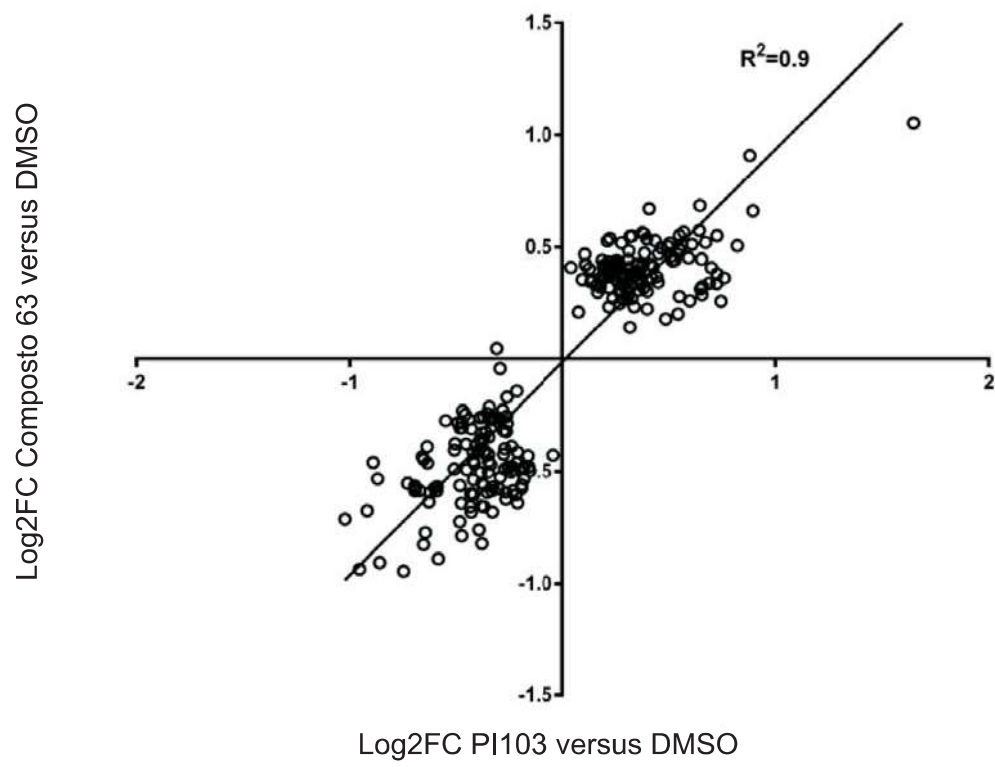


FIG. 9B

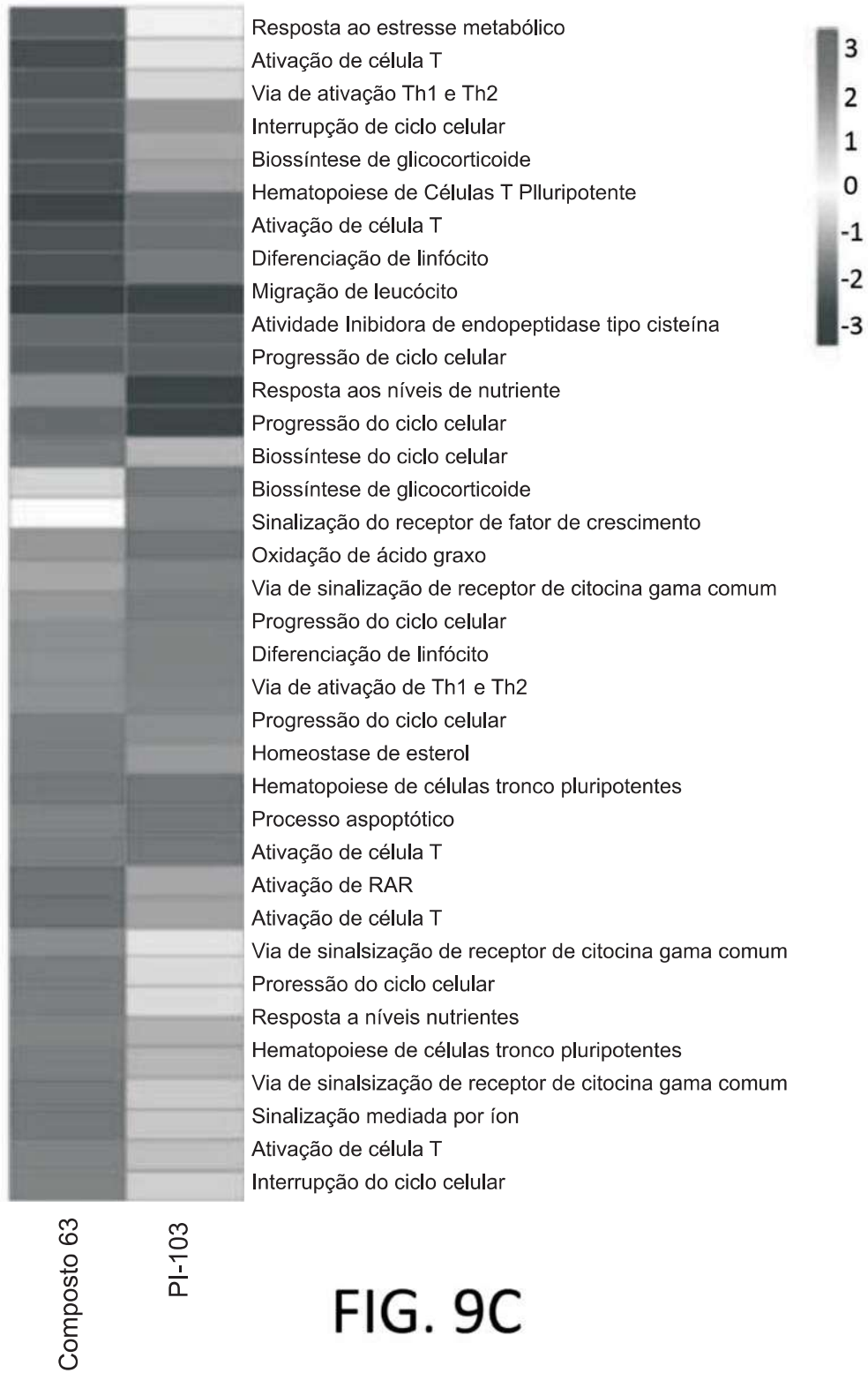


FIG. 9C

Células CAR-T geradas por PI-103

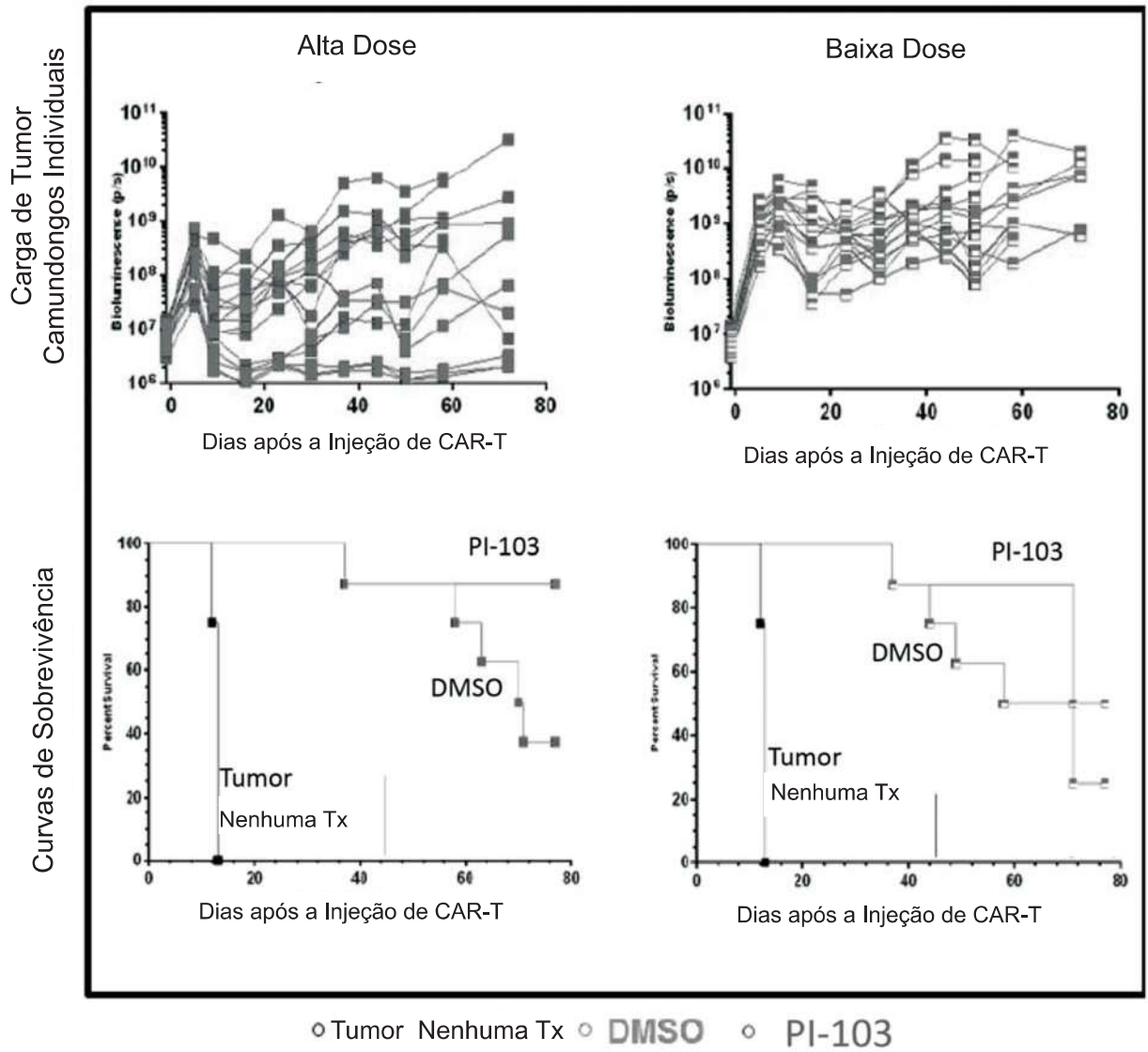


FIG. 10A

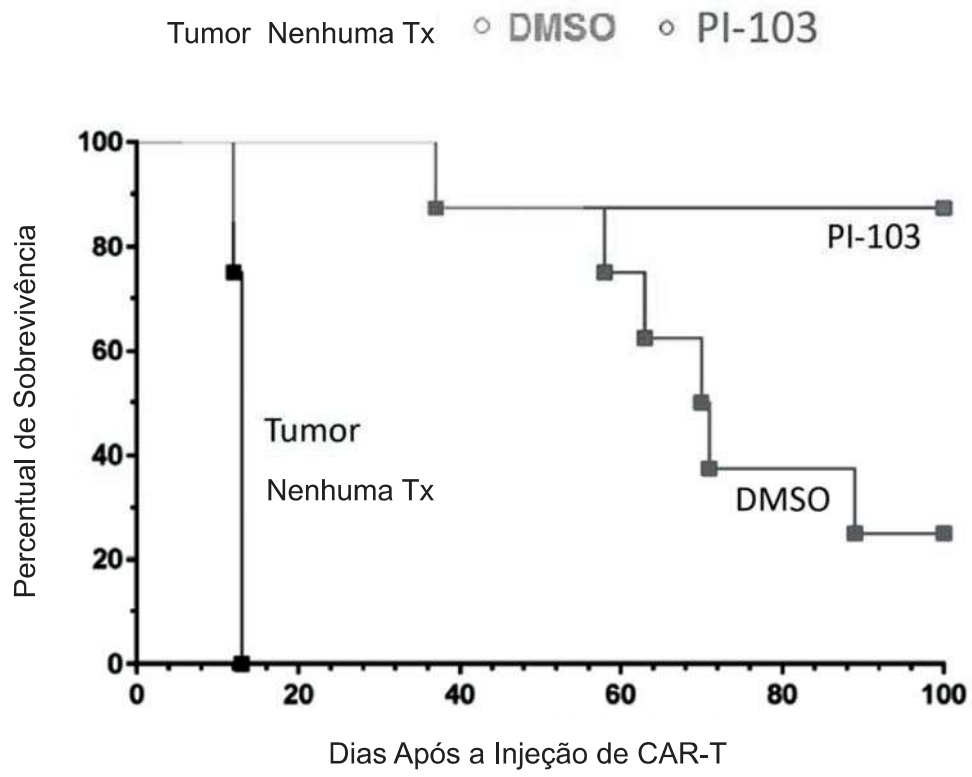


FIG. 10B

Composto 63 Células CAR-T geradas

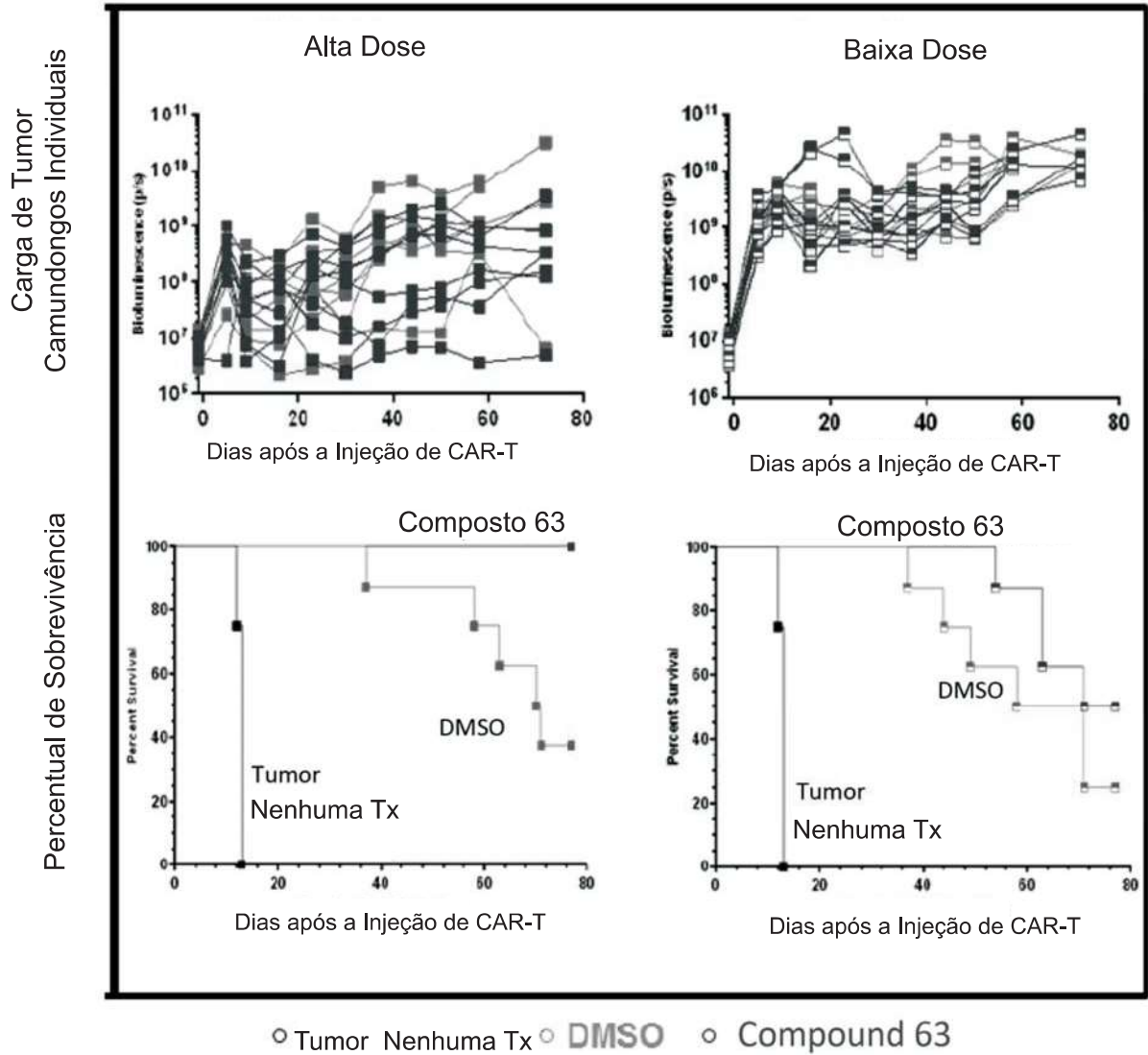


FIG. 11A

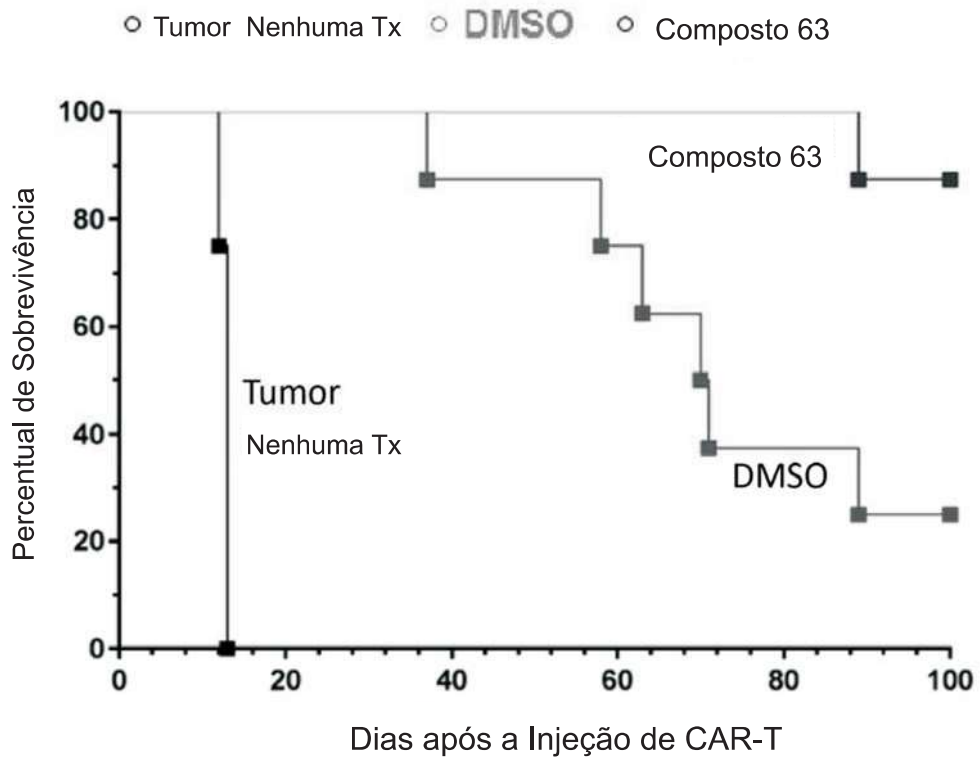


FIG. 11B

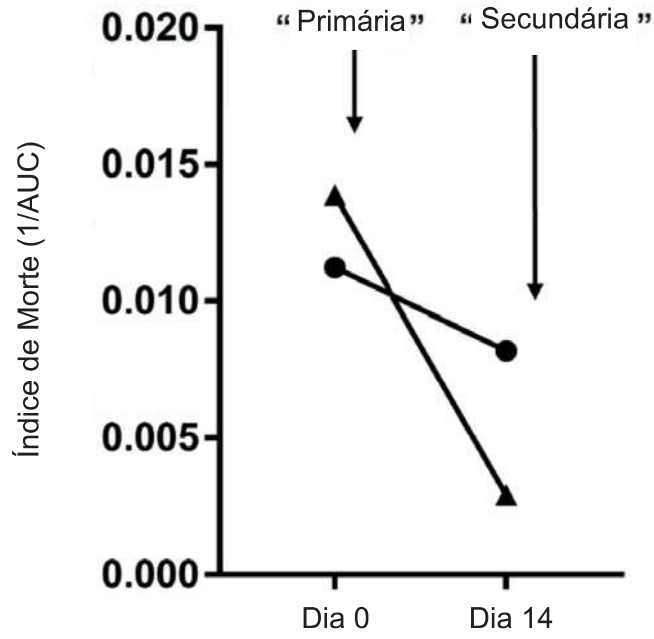


FIG. 12A

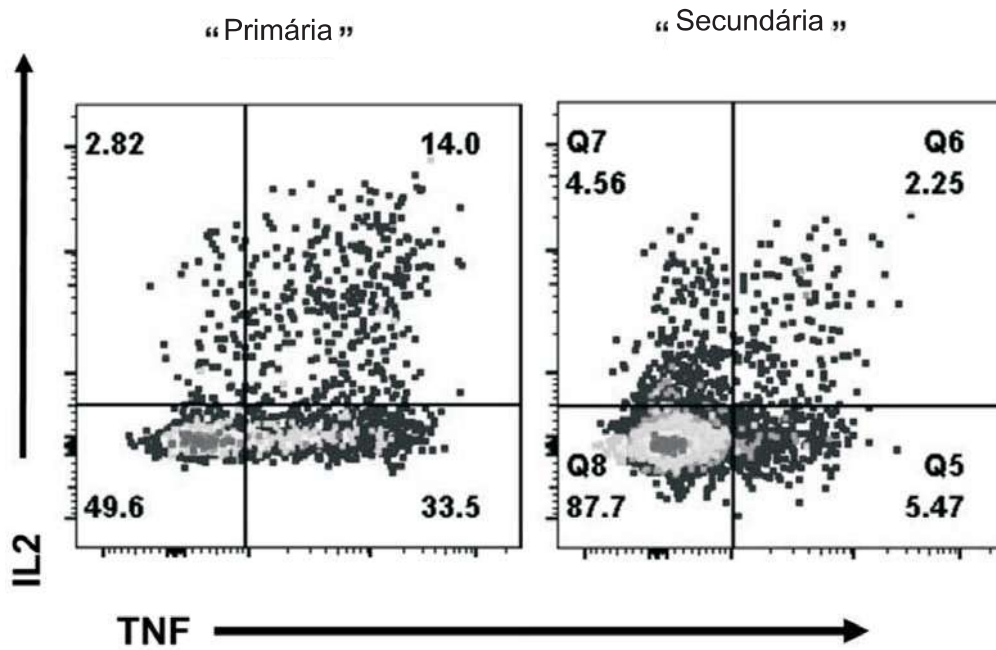


FIG. 12B

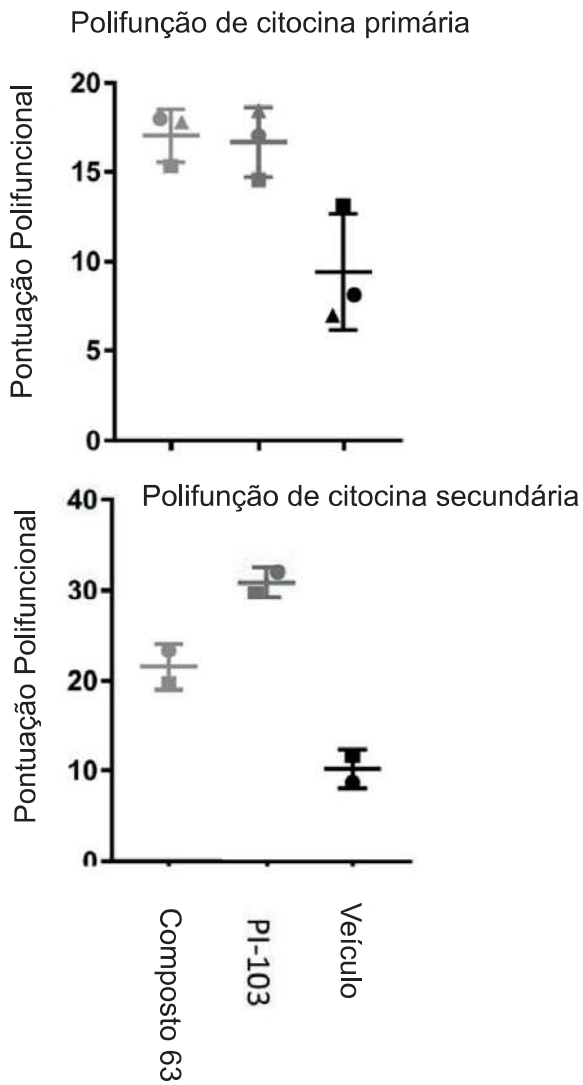


FIG. 13A

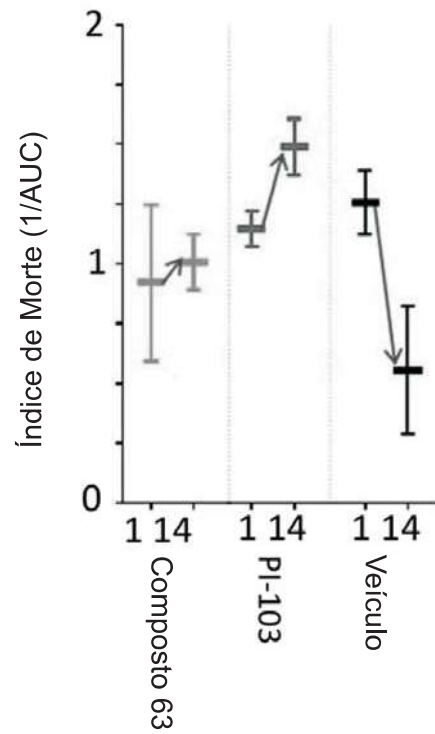


FIG. 13B

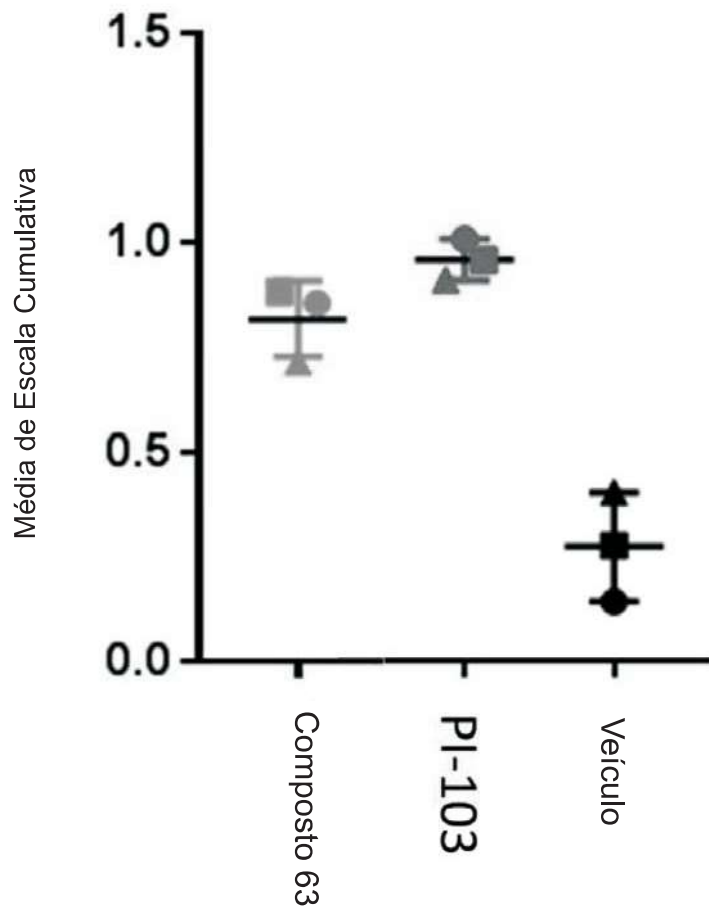


FIG. 13C

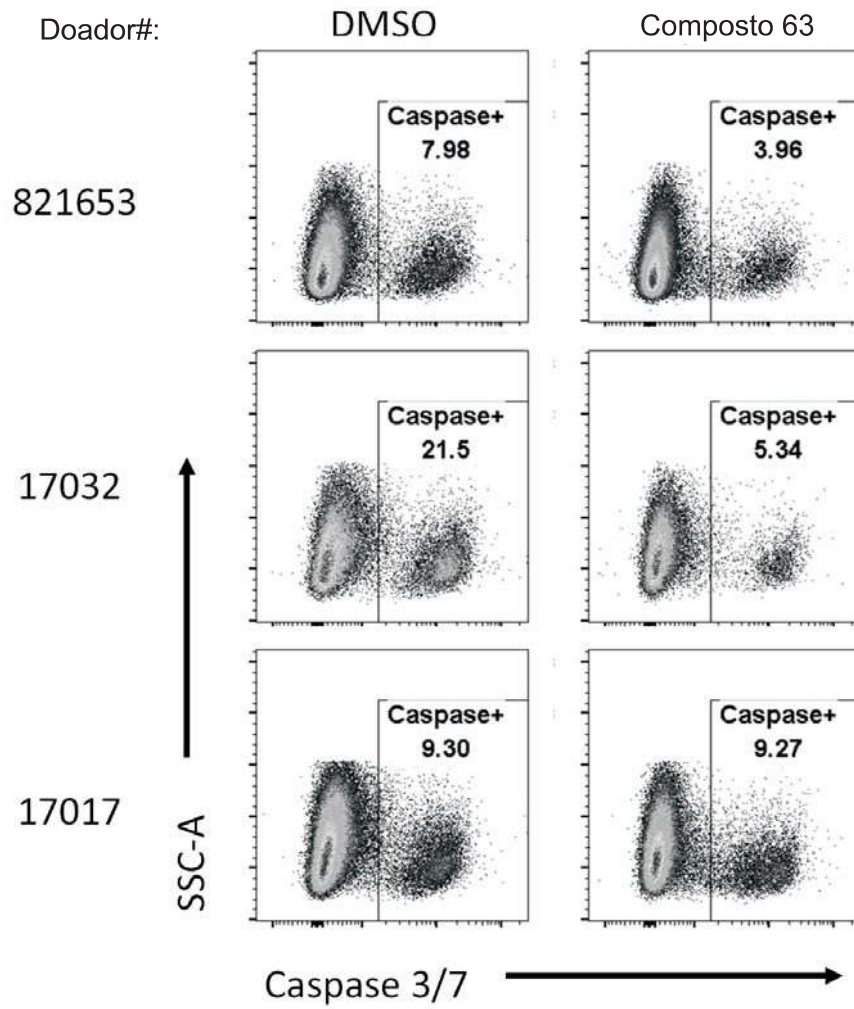


FIG. 14

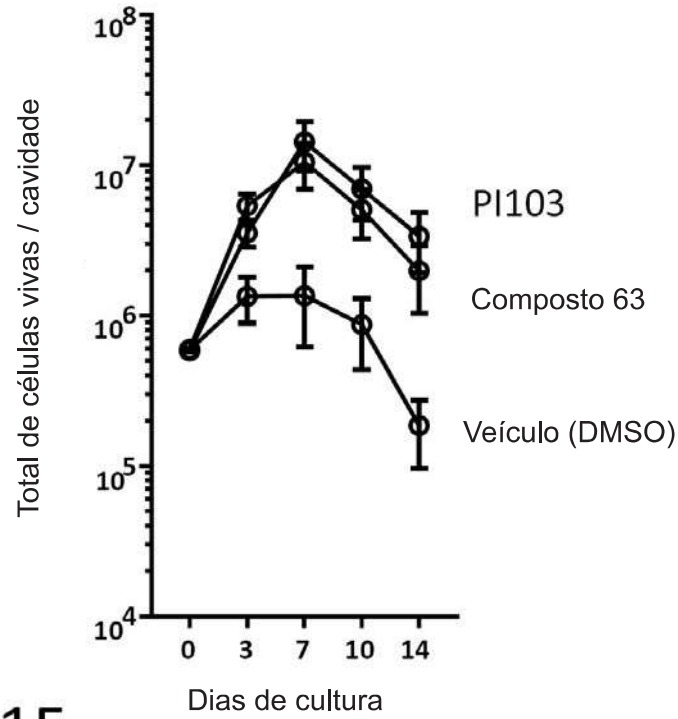


FIG. 15

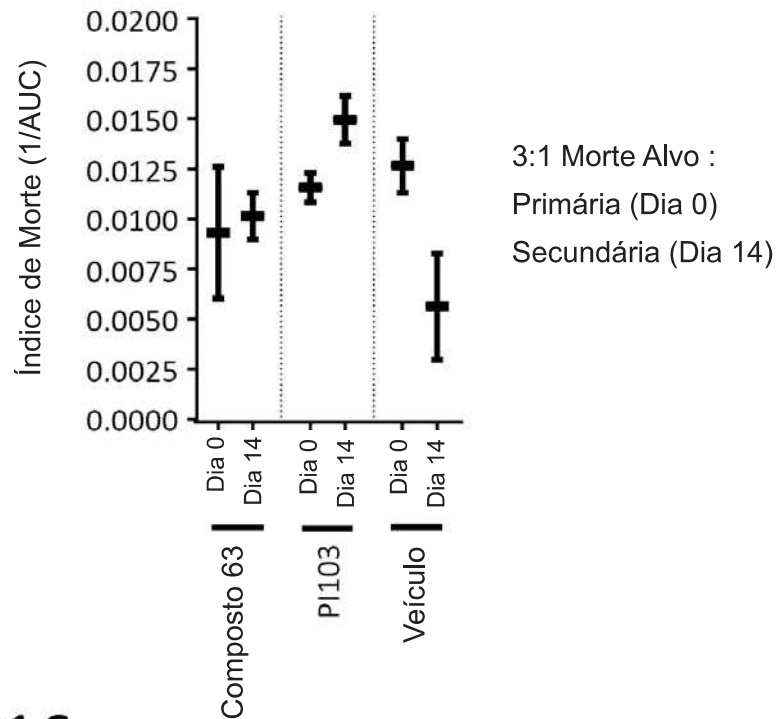


FIG. 16

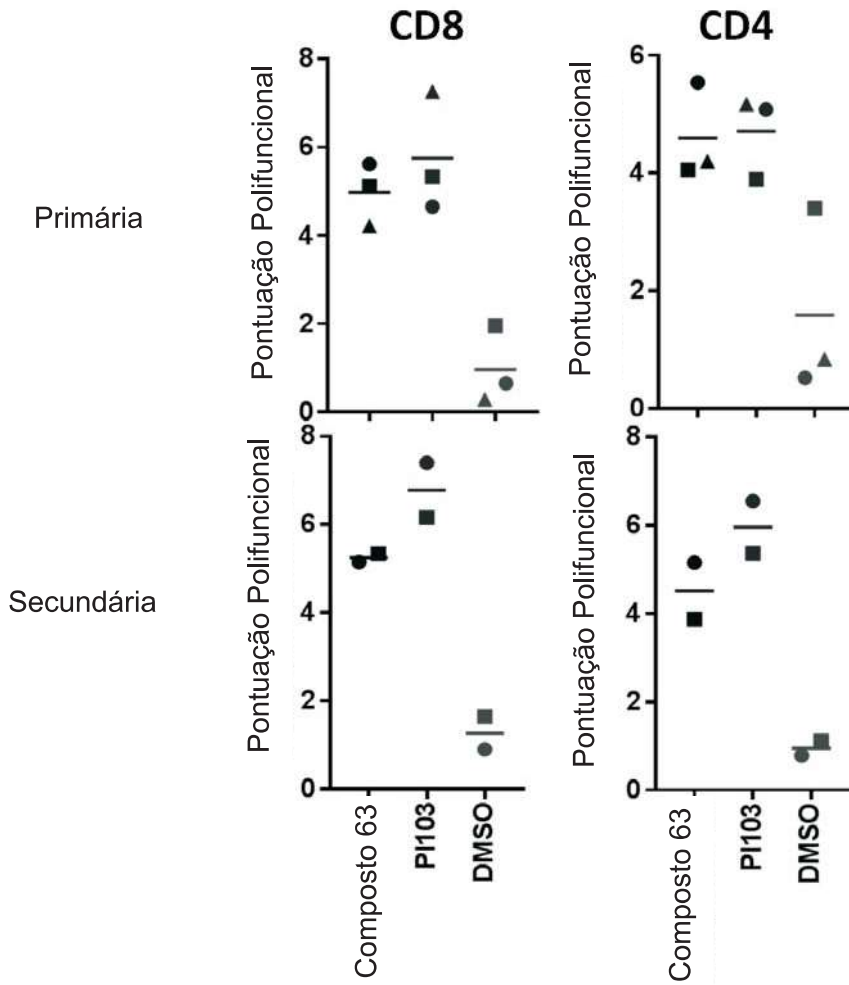
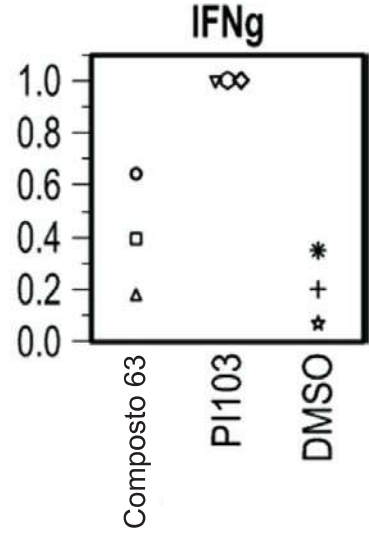
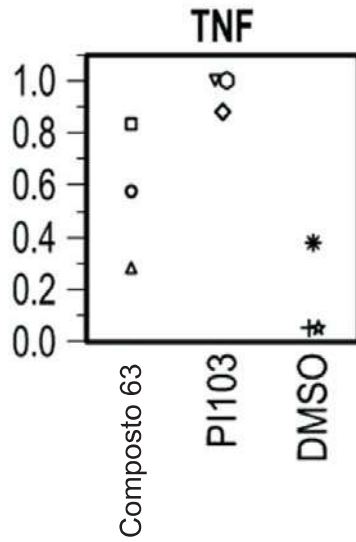
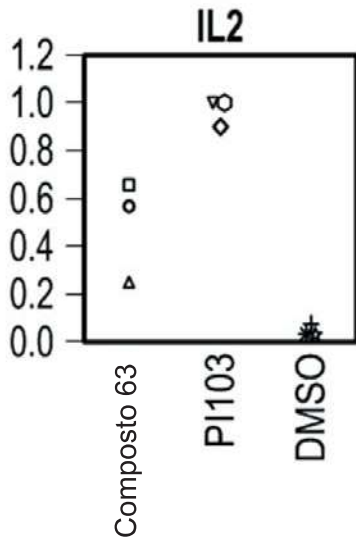


FIG. 17A

Primária



Secundária

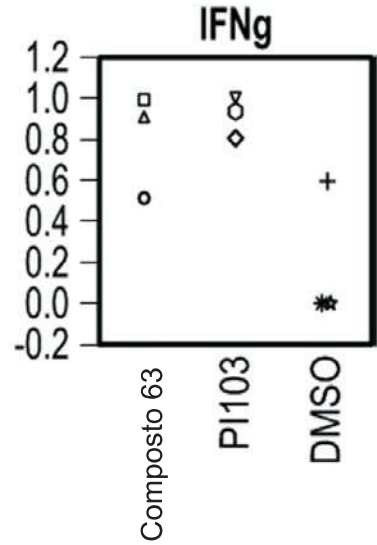
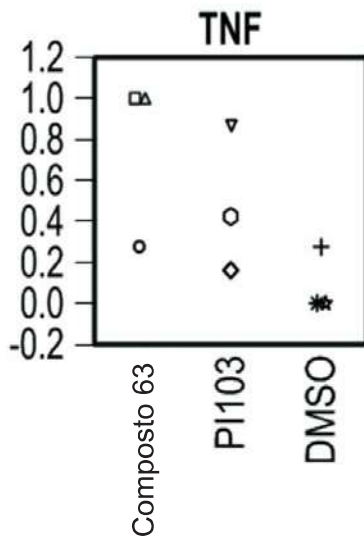
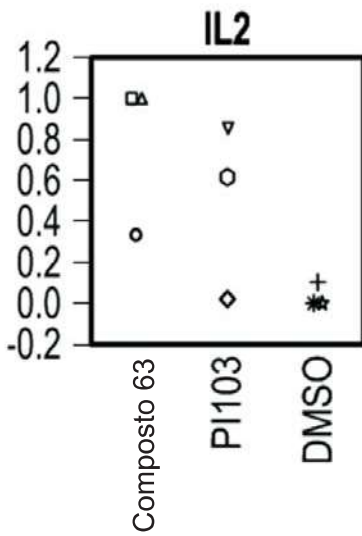


FIG. 17B

- ◊ P-adj<0.1 para PI103 e Composto 63 (Sobreposição)
- ◻ P-adj<0.1 para PI103 e Não Composto 63 (Não sobreposição de PI103)
- P-adj<0.1 para Composto 63 e Não PI103 (não sobreposição de Composto 63)

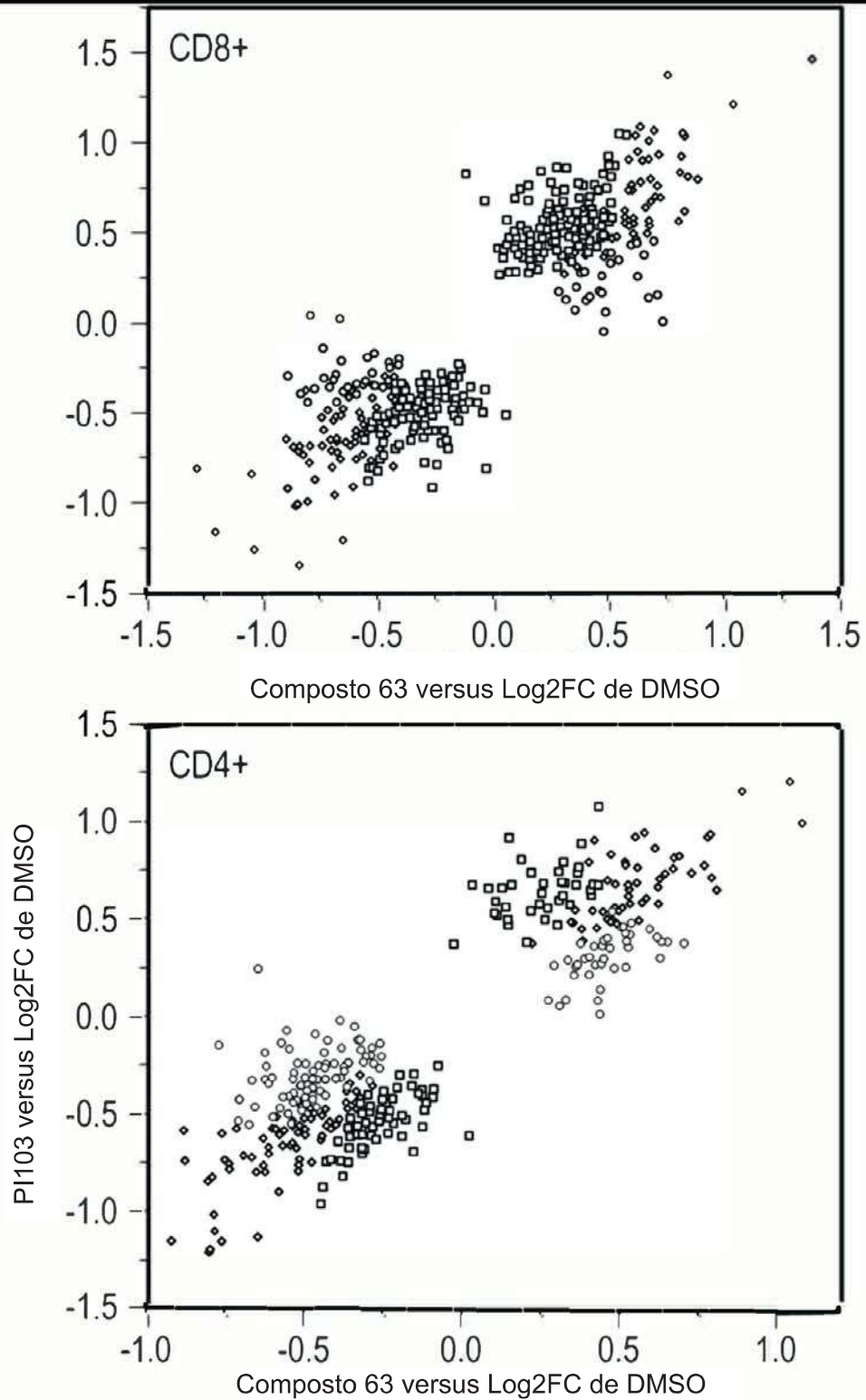


FIG. 18

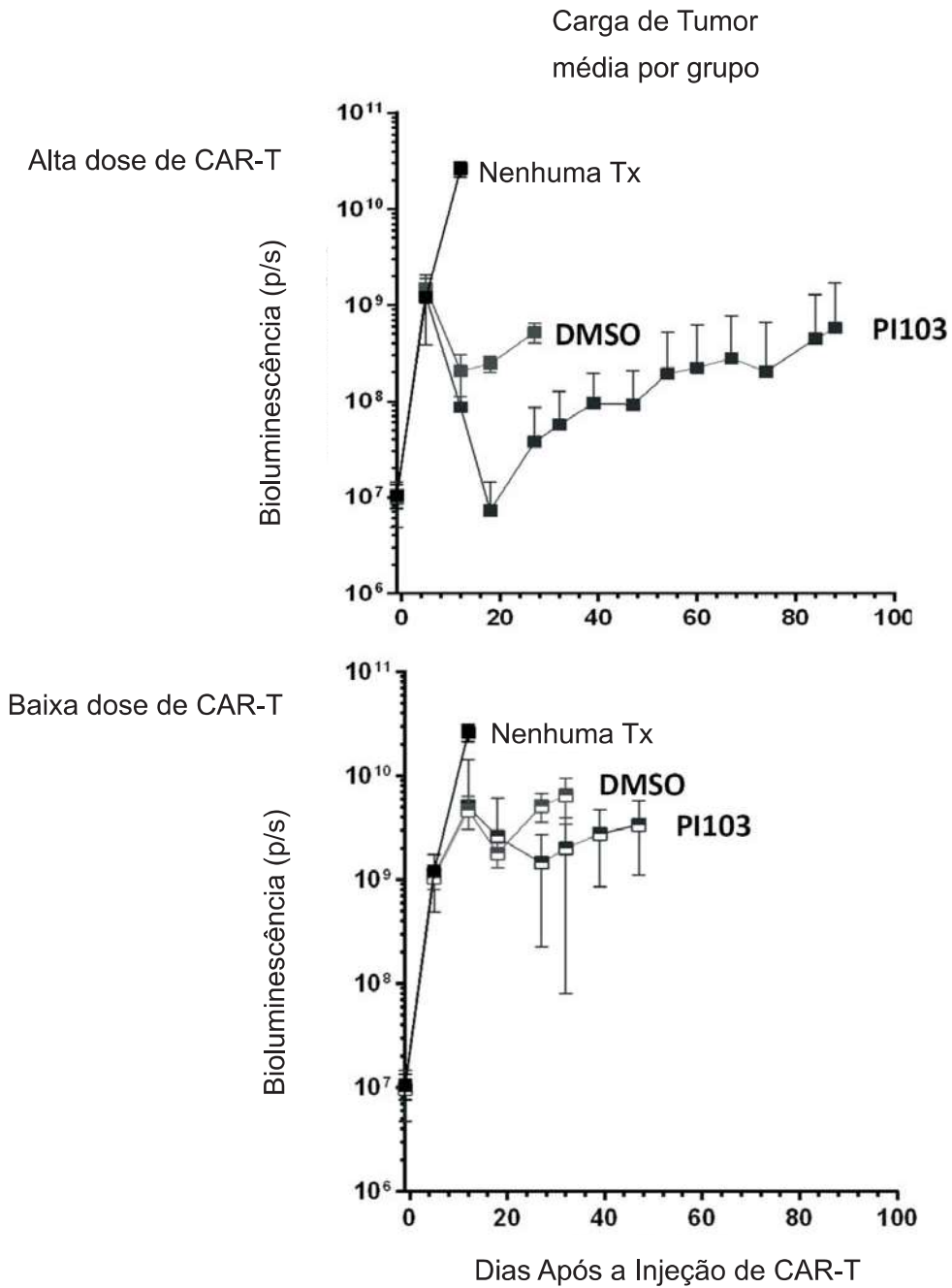


FIG. 19A

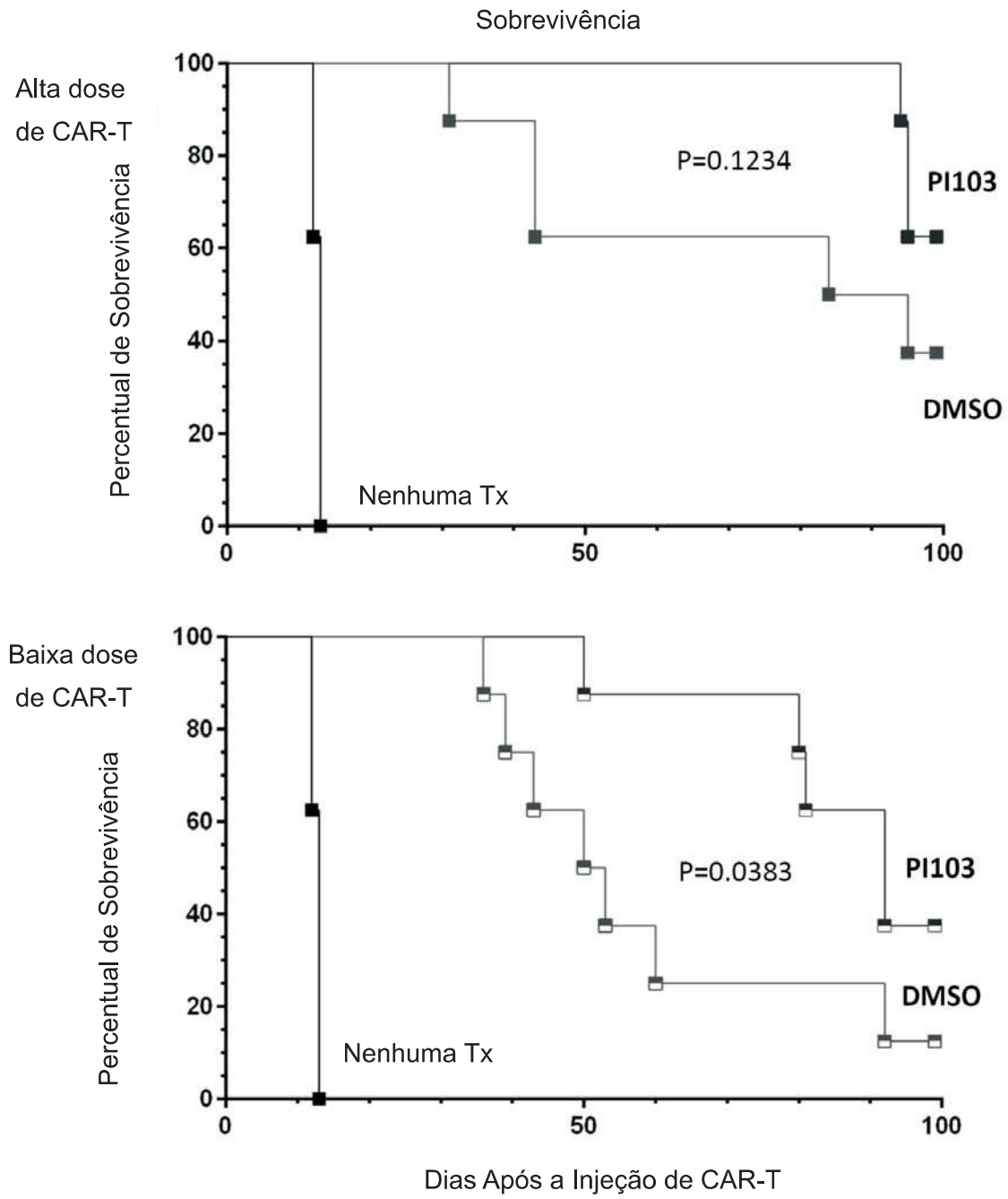


FIG. 19B

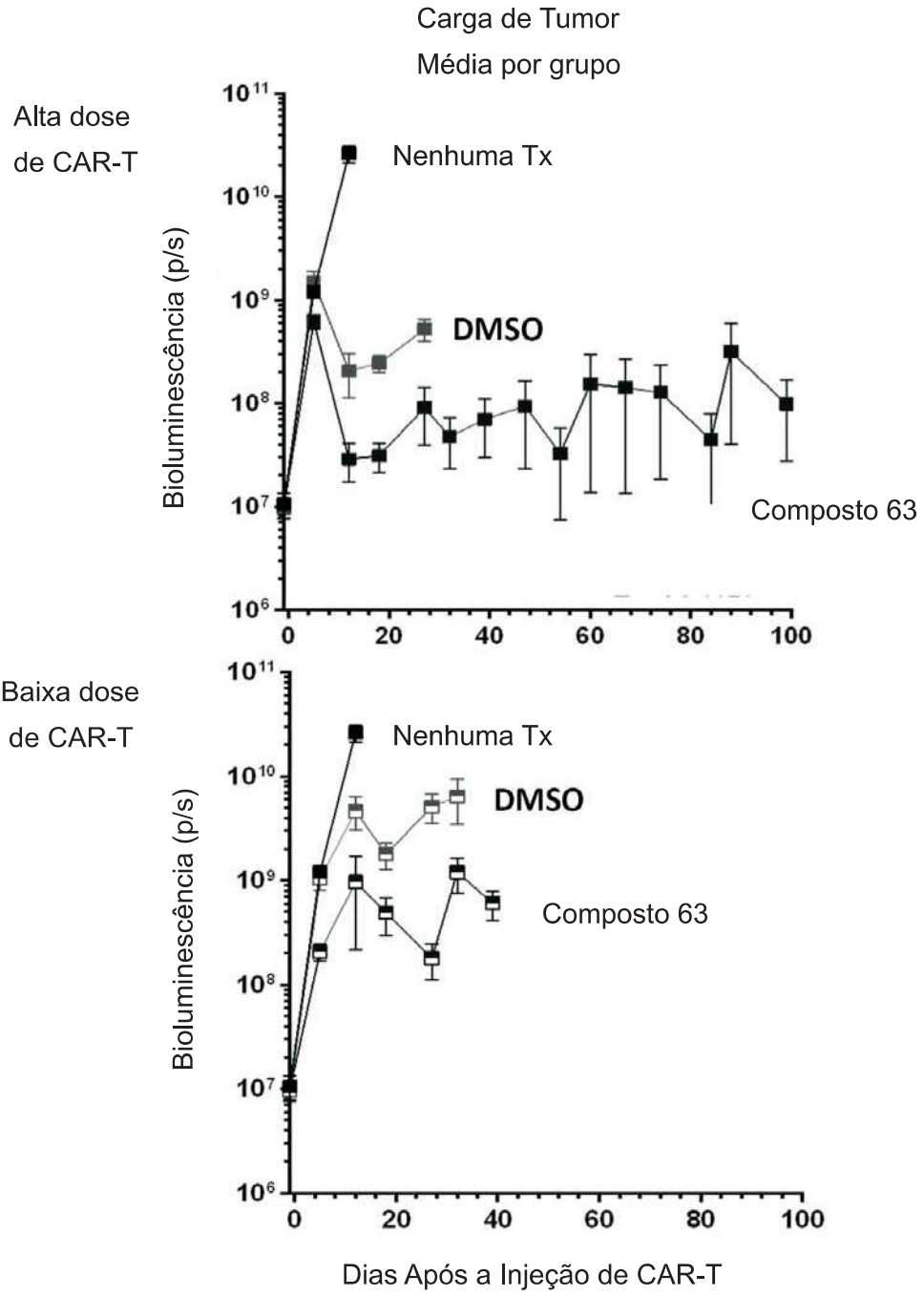


FIG. 20A

31/33

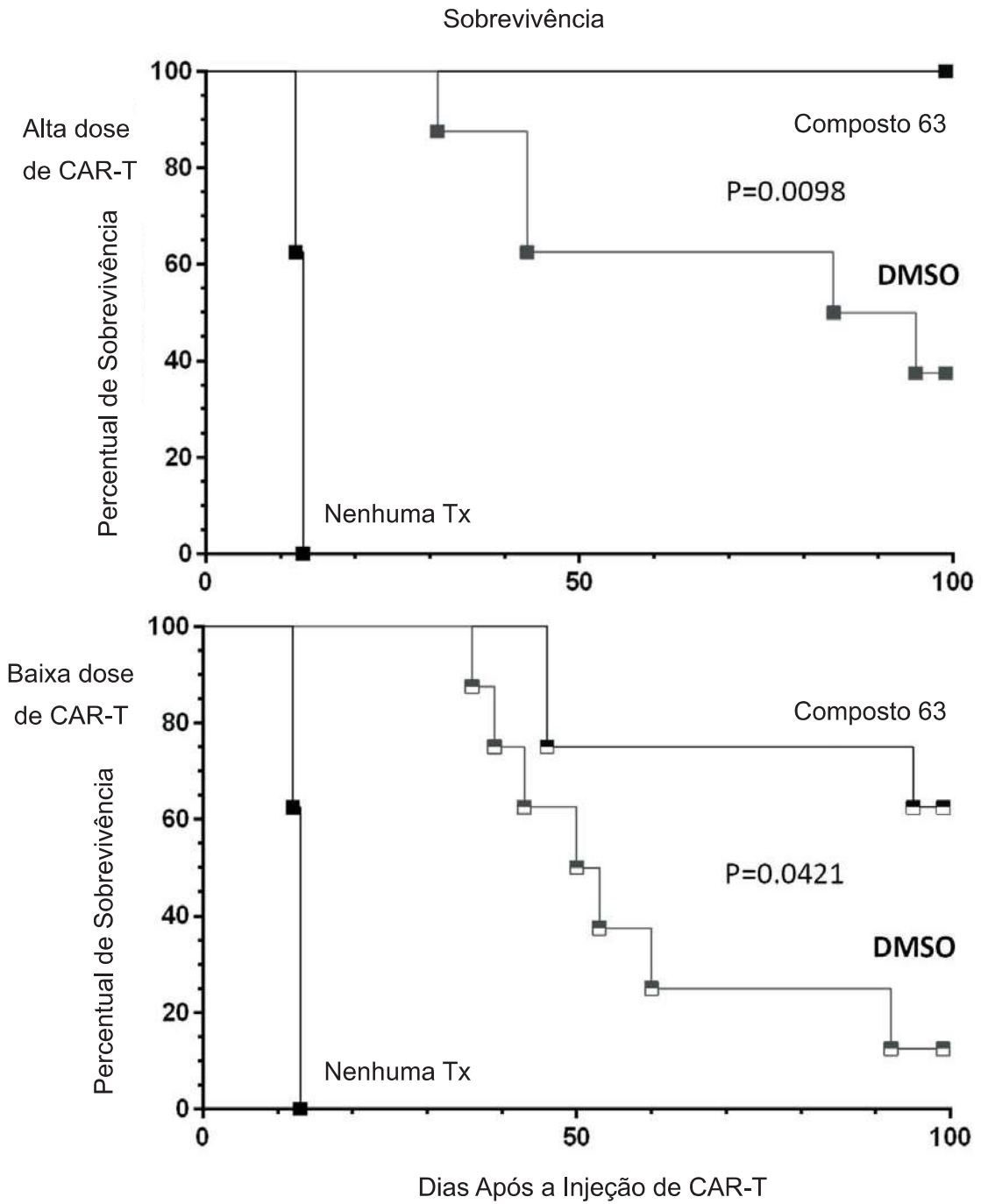


FIG. 20B

Alta dose
de CAR-T

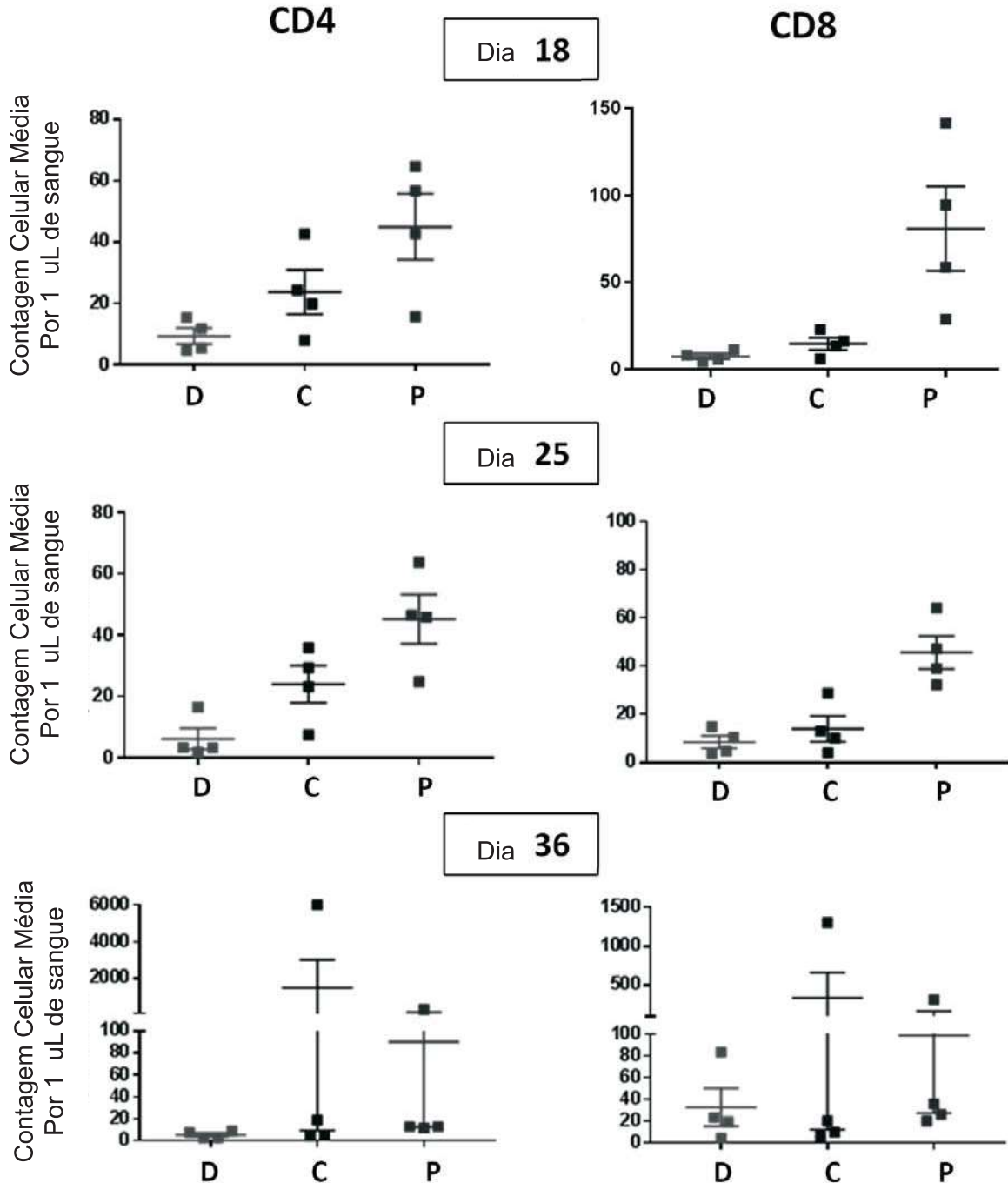


FIG. 21A

Baixa dose
de CAR-T

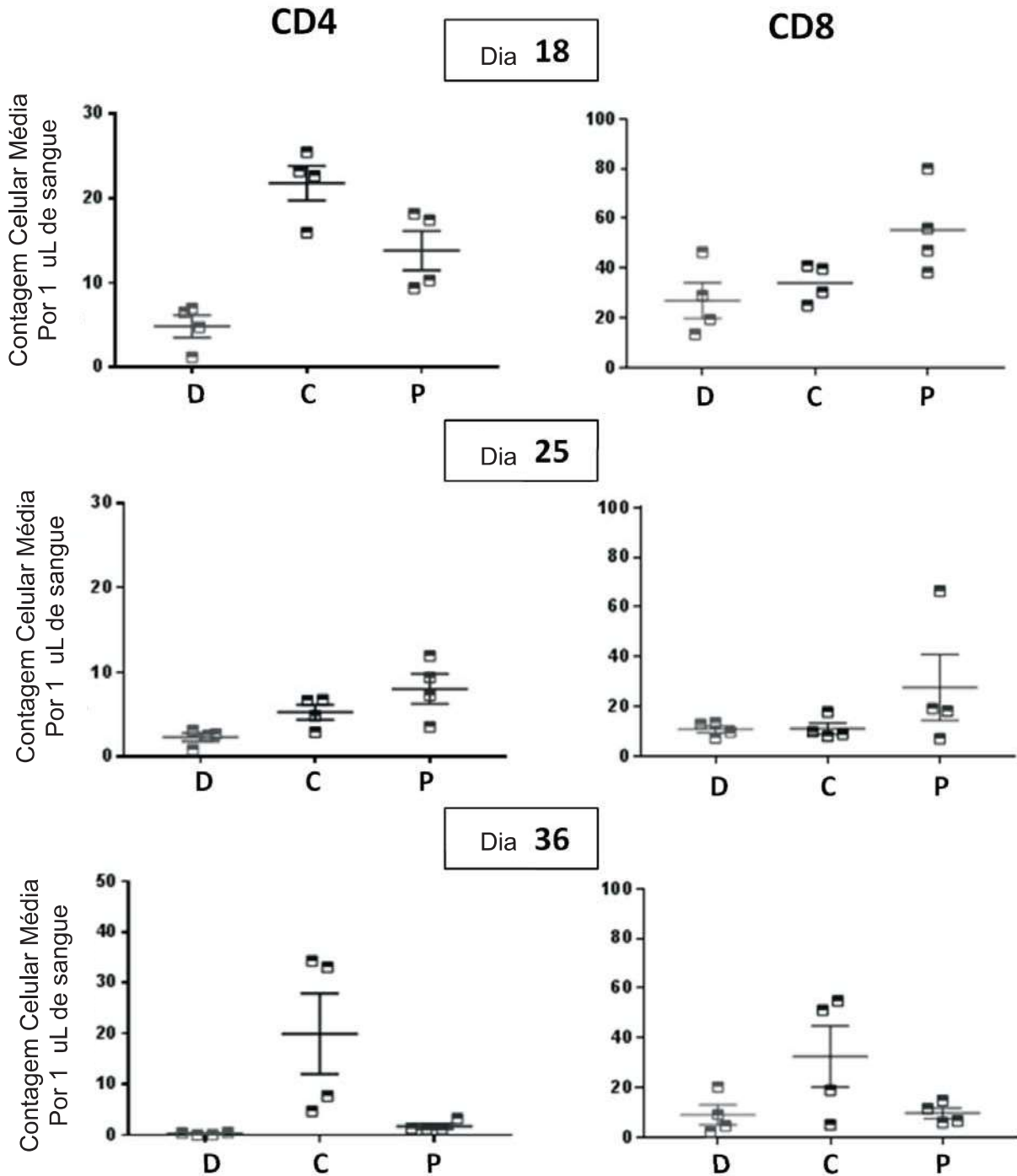


FIG. 21B

RESUMO

Patente de Invenção: **“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULA T”**.

A presente invenção refere-se a métodos para a produção de células T modificadas que expressam um receptor recombinante, tal como para uso em terapia celular. Em alguns aspectos, os métodos fornecidos incluem uma ou mais etapas para a incubação das células sob condições de estimulação, introduzindo um polipeptídeo recombinante nas células por meio de transdução ou transfecção, e/ou cultivando as células sob condições que promovam a proliferação e/ou expansão, em que uma ou mais etapas são realizadas na presença de um agente que inibe alvo mamífero de atividade de rapamicina (mTOR). Em alguns aspectos, o cultivo é realizado na presença de um agente que inibe alvo mamífero de atividade de rapamicina (mTOR). Em alguns aspectos, os métodos fornecidos produzem células T geneticamente modificadas com persistência melhorada e/ou atividade antitumor *in vivo*.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P 246682.TXT
- Data de Geração do Código: 29/04/2020
- Hora de Geração do Código: 15:32:37
- Código de Controle:
 - Campo 1: 940D1872EDF76A80
 - Campo 2: 665E6D5A1FB4AB1A