(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 006 158**

(51) Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2016 PCT/US2016/068683**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017 WO17117112**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2016 E 16829368 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3397755**

(54) Título: **Métodos de preparación de células que expresan receptores de antígenos quiméricos**

(30) Prioridad:

28.12.2015 US 201562271695 P
07.12.2016 US 201662431204 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2025

(73) Titular/es:

NOVARTIS AG (50.00%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (50.00%)

(72) Inventor/es:

FACHIN, FABIO;
CAO, LAN;
GREENE, MICHAEL, R. y
GOLOVINA, TATIANA

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de preparación de células que expresan receptores de antígenos quiméricos

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad al documento U. S. Nº de serie 62/271695 presentado el 28 de diciembre de 2015 y al documento U.S. Nº de serie 62/431204 presentado el 7 de diciembre de 2016.

LISTA DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene una Lista de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 27 de diciembre de 2016 se denomina N2067-7100WO_SL.txt tiene 257.808 bytes de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] La presente invención se refiere generalmente a métodos de preparación de células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0004] La terapia de transferencia celular adoptiva (ACT) con células T autólogas, especialmente con células T transducidas con receptores de antígenos quiméricos (CAR), ha demostrado ser prometedora en varios ensayos hematológicos de cáncer.

[0005] La fabricación de células T autólogas modificadas genéticamente es actualmente un complejo proceso que comienza con el material del paciente (por ejemplo obtenido a partir de leucoféresis) del que se derivan las células T terapéuticas modificadas genéticamente que expresan un CAR. El material para la leucoféresis del paciente puede tener un nivel elevado de variabilidad de componentes celulares. Este material de partida puede variar ampliamente en composición celular de un paciente a otro y dentro de un mismo estado de enfermedad. Las impurezas celulares pueden incluir granulocitos, monocitos, glóbulos rojos, blastocitos circulantes y plaquetas. Los procesos de fabricación de productos de terapia celular autóloga también deben enfrentarse a los historiales de tratamiento de diferentes patentes, al estado de la enfermedad, *etc.,* lo que afectará aún más al contenido celular del material de partida (Burger *et al.* 2014, Kaiser *et al.* 2015, Ramos *et al.* 2009). Además, tales impurezas del material de partida pueden afectar negativamente al proceso de fabricación, a la calidad final del producto y a la eficacia terapéutica del producto. WO2015/164745 se refiere a métodos mejorados para la fabricación de terapias celulares adoptivas. Priceman et al. (Curr Opin Oncol. Noviembre de 2015; 27(6): 466-474) se refiere a CAR inteligentes modificados por ingeniería genética para la inmunoterapia contra el cáncer. Zhang et al. (Oncotarget 2015; 6(32): 33961-33971) analiza la eficiencia de células T modificadas con el receptor de antígeno quimérico CD 19 para el tratamiento de neoplasias de células B en ensayos clínicos de fase I. El documento CN105158466 se refiere a un método para la detección de células leucémicas inhibidoras de células T con receptor de antígeno quimérico anti-CD19. Stroncek et al. (Journal of Translational Medicine 2014; 12:241) se refiere a la elutriación a contraflujo de concentrados clínicos de células mononucleares de sangre periférica para la producción de terapias dendríticas y de células T.

[0006] Por lo tanto, existe la necesidad de métodos y procesos para proporcionar una producción más consistente de producto de terapia celular que expresa CAR, agilizando de este modo el proceso de fabricación, mejorando la calidad del producto y maximizando la eficacia terapéutica del producto.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0007] La presente invención proporciona un método de preparación de una población de células efectoras inmunitarias humanas (por ejemplo células T) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), comprendiendo el método:

a) proporcionar una muestra de entrada congelada, por ejemplo una muestra de aféresis plasmática, que comprenda células efectoras inmunitarias, en donde la muestra de entrada procede de un paciente que tiene una enfermedad asociada a un antígeno tumoral, y en la que la enfermedad asociada a un antígeno tumoral es un cáncer o una enfermedad autoinmune,
b) descongelar la muestra de entrada congelada para producir una muestra descongelada, y
c) realizar la elutriación en la muestra descongelada y recoger células inmunitarias efectoras, produciendo así una muestra de salida que comprenda células inmunitarias efectoras que sean adecuadas para la expresión de un CAR, opcionalmente en donde:
    (i) el método comprende un paso de ajuste de la viscosidad de la muestra descongelada, por ejemplo mediante adición de una solución isotónica, por ejemplo PBS, a la muestra descongelada; y/o

(ii) la elutriación se realiza:

1) utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30-82 mL/min o 50-80 mL/min y/o el volumen de recogida es alrededor de 250-1250 mL o 300-1000 mL para cada fracción, por ejemplo la elutriación se realiza utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30, 40, 50, 60, 70, 72 u 82 mL/min, por ejemplo alrededor de 70 o 72 mL/min;
2) utilizando un volumen de recogida de alrededor de 250, 400, 500, 900 o 975 mL, por ejemplo alrededor de 400 o 975 mL; y/o
3) a alrededor de 2400 rpm.

[0008] Esta y otras realizaciones se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0009] En algunos aspectos, la información técnica expuesta a continuación puede ir más allá del alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para ubicar la invención en sí en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

[0010] Además, las referencias incidentales a los métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y los métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal no deben interpretarse como una reivindicación de protección para dicho método como tal, sino que deben interpretarse como una referencia a productos, en particular sustancias o composiciones, para uso en cualquiera de estos métodos.

[0011] La presente divulgación pertenece a métodos de preparación de células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR y a composiciones que comprenden las mismas.

[0012] En consecuencia, la presente invención presenta un método de preparación de una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el método incluye realizar la elutriación. El método incluye proporcionar una muestra de entrada congelada que comprende células efectoras inmunitarias, en donde la muestra de entrada es de un paciente que tiene una enfermedad asociada con un antígeno tumoral, en donde además la enfermedad asociada con un antígeno tumoral es cáncer o una enfermedad autoinmune, descongelar la muestra de entrada congelada para producir una muestra descongelada y realizar la elutriación en la muestra descongelada y recoger células efectoras inmunitarias, produciendo de este modo una muestra de salida que comprende células efectoras inmunitarias que son adecuadas para la expresión de un CAR.

[0013] En una realización, la muestra de entrada congelada es una muestra de aféresis plasmática.

[0014] En una realización, el método comprende además uno, dos, tres o la totalidad de:

i) depleción de células CD19+ en condiciones de flujo;
ii) realizar centrifugación por densidad utilizando un medio que contiene iodixanol, por ejemplo 60 % de iodixanol en agua (por ejemplo medio Optiprep), y/o que tiene una densidad mayor que Ficoll (por ejemplo mayor que 1,077 g/ml, por ejemplo alrededor de 1,32 g/ml));
iii) realizar un paso de lavado (por ejemplo en la muestra descongelada) con un tampón que contiene dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5 1/2 NS (5 % de dextrosa y 0,45 % de cloruro de sodio), por ejemplo en donde el paso de lavado se realiza utilizando un dispositivo de procesamiento celular, por ejemplo un dispositivo de lavado de células o el dispositivo utilizado para la centrifugación por gradiente de densidad, por ejemplo un instrumento CS5 (CellSaver5+); y
iv) realizar una selección positiva de células CD3/CD28+ en condiciones de flujo.

[0015] En una realización, el método comprende además un paso de ajuste de la viscosidad de la muestra descongelada, por ejemplo mediante adición de una solución isotónica, por ejemplo PBS, a la muestra descongelada.

[0016] En una realización, la elutriación se realiza utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30-82 mL/min o 50-80 mL/min y/o el volumen de recogida es alrededor de 250-1250 mL o 300-1000 mL para cada fracción. En una realización, la elutriación se realiza utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30, 40, 50, 60, 70, 72 u 82 mL/min, por ejemplo alrededor de 70 o 72 mL/min. En una realización, la elutriación se realiza utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-72, 70-82, 72-82 mL/min. En una realización, la elutriación se realiza utilizando un volumen de recogida de alrededor de 250, 400, 500, 900 o 975 mL, por ejemplo alrededor de 400 o 975 mL. En una realización, la elutriación se realiza utilizando un volumen de recogida de alrededor de 250-400, 400-500, 500-900, 900-1000 o 1000-1259 mL. En una realización, la elutriación se realiza a alrededor de 2400 rpm. En una realización, la elutriación se realiza a alrededor de 2000-2800, 2200-2600 o 2300-2500 rpm.

[0017] En una realización, la muestra de entrada comprende al menos 10%, 15%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 35% o 40% de monocitos. En una realización, la muestra de entrada comprende menos de 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% o 20% de células T. En una realización, la muestra de entrada

comprende al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células B.

[0018] En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de monocitos. En una realización, la muestra de salida comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células T. En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de células B. En una realización, la muestra de salida comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% o 99,9% de células CD4+CD25+. En una realización, la muestra de salida comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% o 99,9% de células CD8+CD25+.

[0019] En una realización, el método da lugar a una recuperación del rendimiento de células T de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células T.

[0020] En una realización, la muestra de salida se pone en contacto con un ácido nucleico que codifica un CAR. En una realización, después de poner en contacto la muestra de salida con un ácido nucleico que codifica un CAR, la muestra de salida comprende al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de células CAR+. En tales realizaciones, la muestra de salida comprende al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células de memoria central CAR+CD4+. En tales realizaciones, la muestra de salida comprende al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células de memoria central CAR+CD8+.

[0021] En una realización, después de poner en contacto la muestra de salida con un ácido nucleico que codifica un CAR, la muestra de salida produce menos de 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 pg de IFN-gamma (IFN-y) por célula que expresa CAR, por ejemplo, célula transducida. En el presente documento, por ejemplo en los Ejemplos, se describen ensayos de liberación de IFN-gamma (IFN-y). En una realización, después de poner en contacto la muestra de salida con un ácido nucleico que codifica un CAR, la muestra de salida comprende un nivel de citotoxicidad (por ejemplo una EC50rec) de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30. En el presente documento, por ejemplo en los Ejemplos, se describen ensayos de citotoxicidad.

[0022] El método de preparación de una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplos células T) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR puede incluir realizar centrifugación por gradiente de densidad (también denominada centrifugación por densidad en el presente documento). Por lo tanto, el método puede incluir proporcionar una muestra de entrada que comprende células efectoras inmunitarias y realizar un paso de centrifugación por densidad utilizando un medio que comprende iodixanol, por ejemplo 60 % de iodixanol en agua, por ejemplo medio Optiprep), y/o que tiene una densidad mayor que Ficoll (por ejemplo mayor que 1,077 g/ml, por ejemplo alrededor de 1,32 g/ml), produciendo de este modo una muestra de salida que comprende células efectoras inmunitarias que son adecuadas para la expresión de un CAR.

[0023] En una realización, el método comprende además uno, dos, tres o la totalidad de:

i) depleción de células CD19+ en condiciones de flujo;
ii) realizar un paso de lavado (por ejemplo antes de la centrifugación por densidad) con un tampón que contiene dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5 1/2 NS (5 % de dextrosa y 0,45 % de cloruro de sodio), por ejemplo en donde el paso de lavado se realiza utilizando un instrumento CS5 (CellSaver5+); y selección positiva de células CD3/CD28+ bajo condiciones de flujo.

[0024] En una realización, el método de centrifugación por gradiente de densidad no comprende uno o más de: uso de una solución que comprende glicol, por ejemplo una solución de Ficoll; o realizar un paso de lavado en un tampón que comprende dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5 1/2 NS, por ejemplo en donde el paso de lavado se realiza utilizando un instrumento CS5; o realizar un paso de selección positiva.

[0025] En una realización, la centrifugación por densidad se realiza utilizando un dispositivo de separación celular, por ejemplo un dispositivo Sepax2.

[0026] En una realización, la muestra de entrada comprende menos de 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16% o 15% de células T. En una realización, la muestra de entrada comprende al menos 10%, 15%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% o 70% de monocitos. En una realización, la muestra de entrada comprende al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80% de células B.

[0027] En una realización, la muestra de salida comprende al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células T. En una realización, la muestra de salida comprende menos de 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de monocitos. En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05% o 0,01% de células B.

[0028] En una realización, el método de centrifugación por gradiente de densidad da lugar a una recuperación de rendimiento de células T de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células T.

[0029] El método de preparación de una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T) que se puede modificar por ingeniería genética para expresar un CAR puede incluir un paso de selección negativa para eliminar células que expresan antígenos asociadas con cáncer, por ejemplo células que expresan CD19 (CD19+). El método puede incluir proporcionar una muestra de entrada que comprende células efectoras inmunitarias y eliminar células CD19+ de la muestra de entrada en condiciones de flujo, por ejemplo utilizando un dispositivo de flujo continuo, por ejemplo un sistema de procesamiento celular descrito en el presente documento, produciendo de este modo una muestra de salida que comprende células efectoras inmunitarias que son adecuadas para la expresión de un CAR. En una realización, las células CD19+ comprenden células B. En una realización, las células CD19+ comprenden linfoblastos.

[0030] En una realización, el método comprende además uno, dos, tres o la totalidad de:

i) elutriación de la muestra de entrada, en donde la muestra de entrada es opcionalmente una muestra de entrada descongelada;
ii) un paso de centrifugación por densidad utilizando un medio que contiene iodixanol, por ejemplo 60 % de iodixanol en agua (por ejemplo medio Optiprep), y/o que tiene una densidad mayor que Ficoll (por ejemplo mayor que 1,077 g/ml, por ejemplo alrededor de 1,32 g/ml));
iii) realizar un paso de lavado (por ejemplo antes de eliminar células CD19+ y/o después de descongelar la muestra de entrada) con un tampón que contiene dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5 1/2 NS (5 % de dextrosa y 0,45 % de cloruro de sodio), por ejemplo en donde el paso de lavado se realiza utilizando un instrumento CS5 (CellSaver5+); y
iv) selección positiva de células CD3/CD28+ en condiciones de flujo.

[0031] En una realización, el método de selección negativa descrito en el presente documento no comprende realizar la elutriación o centrifugación por densidad.

[0032] En una realización, las células CD19+ se eliminan de la muestra de entrada mediante separación magnética. En una realización, la separación magnética comprende poner en contacto las células con un reactivo de separación. En una realización, el reactivo de separación comprende un miembro magnético o paramagnético y un miembro de unión a CD19. En una realización, la separación magnética comprende citometría de flujo o FACS. En una realización, las células CD19+ se eliminan por FACS. En una realización, la separación magnética comprende el uso de un dispositivo de separación celular magnética, por ejemplo un dispositivo CliniMACs. En una realización, las células CD19+ se eliminan por un dispositivo CliniMACs. En una realización, las células CD19+ se eliminan por un dispositivo de flujo continuo como se describe en el presente documento, por ejemplo un sistema de procesamiento celular como se describe en el presente documento.

[0033] En una realización, la muestra de entrada comprende al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de células CD19+. En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05% o 0,01% de células CD19+. En una realización, la muestra de salida comprende menos de 50%, 45%, 40%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 2%, 2% o 1% de porcentaje de células CD19+ en comparación con la muestra de entrada.

[0034] En una realización, la muestra de entrada comprende al menos 10%, 15%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 35% o 40% de monocitos. En una realización, la muestra de entrada comprende menos de 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% o 20% de células T. En una realización, la muestra de entrada (por ejemplo la muestra de entrada después del lavado) comprende al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80% de células B.

[0035] En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de monocitos. En una realización, la muestra de salida comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células T. En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05% o 0,01% de células B.

[0036] En una realización, el método de selección negativa descrito en el presente documento da lugar a una recuperación del rendimiento de células T de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células T.

[0037] El método de preparación de una población de células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR puede incluir selección positiva. Por lo tanto, el método puede incluir proporcionar una muestra de entrada que comprende células efectoras inmunitarias y seleccionar positivamente células CD3+/CD28+ a partir de la muestra de entrada en condiciones de flujo, produciendo de este

modo una muestra de salida que comprende células efectoras inmunitarias que son adecuadas para la expresión de un CAR, por ejemplo en donde la selección positiva se realiza en condiciones de flujo.

[0038] En una realización, el método de selección positiva comprende además uno, dos, tres o la totalidad de:

i) depleción de células CD19+, por ejemplo en condiciones de flujo;
ii) realizar centrifugación por densidad utilizando un medio que contiene iodixanol, por ejemplo 60 % de iodixanol en agua (por ejemplo medio Optiprep), y/o que tiene una densidad mayor que Ficoll (por ejemplo mayor que 1,077 g/ml, por ejemplo alrededor de 1,32 g/ml)); y
iii) realizar un paso de lavado (por ejemplo antes de eliminar células CD19+ y/o después de descongelar la muestra de entrada) con un tampón que contiene dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5 1/2 NS (5 % de dextrosa y 0,45 % de cloruro de sodio), por ejemplo en donde el paso de lavado se realiza utilizando un instrumento CS5 (CellSaver5+).

[0039] En una realización, el método de selección positiva comprende además la realización de elutriación en la muestra de entrada (por ejemplo en donde la muestra de entrada es una muestra de entrada descongelada). Opcionalmente, la elutriación se realiza junto con un o más de (por ejemplo 1, 2 o la totalidad de) depleción de células CD19+ (por ejemplo como se describe en (i) anteriormente), realización de la centrifugación por densidad (por ejemplo como se describe en (ii) anteriormente) y realizar un paso de lavado (por ejemplo como se describe en (iii) anteriormente).

[0040] En una realización, el método de selección positiva comprende además realizar la elutriación, un paso de lavado (opcionalmente) y la centrifugación por densidad (por ejemplo utilizando medio Ficoll u OptiPrep) antes de realizar la selección positiva. En una realización, el método de selección positiva comprende además realizar un paso de lavado (opcionalmente) y la centrifugación por densidad (por ejemplo utilizando medio Ficoll u OptiPrep) antes de realizar la selección positiva. En una realización, el método de selección positiva no comprende realizar la elutriación. En una realización, el método de selección positiva comprende ademas realizar un lavado con un tampón que comprende dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo tampón D5 1/2 NS, por ejemplo utilizando un instrumento CS5+.

[0041] En una realización, la selección positiva comprende poner en contacto la muestra de entrada con un reactivo de separación, reactivo de separación que comprende un miembro magnético o paramagnético y un miembro de unión a CD3 y/o CD28. En una realización, la selección positiva para células CD3+/CD28+ comprende incubar la muestra de entrada con un reactivo de separación durante alrededor de 10 a 90 minutos, alrededor de 10 a 60 minutos, alrededor de 10 a 45 minutos, alrededor de 12 a 90 minutos, alrededor de 12 a 60 minutos, alrededor de 12 a 45 minutos, alrededor de 15 a 90 minutos, alrededor de 15 a 60 minutos, alrededor de 15 a 45 minutos, por ejemplo, alrededor de 30 minutos o alrededor de 20 minutos. En una realización, el reactivo de separación comprende una perla que está acoplada (por ejemplo acoplada covalentemente o no covalentemente) a un anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28. En una realización, la selección positiva utiliza una relación de alrededor de 3:1 de miembros de separación magnética (por ejemplo perlas) a células T.

[0042] En una realización, la selección positiva comprende el flujo de un fluido que comprende las células efectoras inmunitarias y miembros de separación magnética dentro de un sistema cerrado, por ejemplo una cámara o una bolsa, donde se produce la separación magnética. En una realización, el flujo se realiza a una velocidad tal que se produce la separación magnética de los miembros (opcionalmente unidos a células efectoras inmunitarias). En una realización, la selección positiva para células CD3+/CD28+ comprende un tiempo de separación o permanencia de menos de alrededor de 6, 5, 6, 3, 2 o 1 minuto o menos de alrededor de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 o 1.

[0043] En una realización, la selección positiva se realiza con un dispositivo magnético, por ejemplo Dynamag CTS, un dispositivo flujo continuo que comprende elementos magnéticos como se describe en el presente documento, u otra disposición de elementos magnéticos.

[0044] En una realización, la selección positiva se realiza utilizando un dispositivo que incluye al menos un módulo de suspensión celular; al menos un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo; al menos un módulo de salida no magnética; al menos un módulo de salida magnética; opcionalmente al menos un componente magnético, externo al módulo de separación magnética/eliminación de perlas, que crea fuerzas magnéticas y/o gradientes; y opcionalmente al menos un módulo tampón. En una realización, el dispositivo comprende además al menos un componente magnético externo al módulo de separación magnética/eliminación de perlas, que crea fuerzas magnéticas y/o gradientes. En una realización, el dispositivo comprende además al menos un módulo tampón. En una realización, el módulo de separación magnética/eliminación de perlas comprende una cámara definida por paredes y que tiene una dirección x, una dirección y y una dirección z; una entrada y una salida dispuestas en extremos opuestos de la cámara, por ejemplo en la dirección x, en la dirección y o en la dirección z; al menos dos imanes adyacentes o próximos a una pared de la cámara y dispuestos para establecer una línea de gradiente cero dentro de la cámara entre la entrada y la salida. En una realización, las células efectoras inmunitarias fluyen a través de la cámara, en donde cada punto en la cámara está a menos de 2 cm de los imanes.

[0045] En una realización, el método de selección positiva comprende (por ejemplo entre los pasos a) y b)), poner en contacto las células efectoras inmunitarias con una solución que comprende dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo

medio D5 1/2 NS (5% de dextrosa y 0,45% de cloruro de sodio), opcionalmente en donde la solución está a temperatura ambiente, por ejemplo a alrededor de 20-25°C. En una realización, las células efectoras inmunitarias están presentes en un recipiente flexible, por ejemplo una bolsa, por ejemplo durante los pasos a) y b). En una realización, el método comprende (por ejemplo entre los pasos a) y b), por ejemplo después de poner en contacto las células efectoras inmunitarias con la solución salina), colocar la bolsa en un material aislante térmico, por ejemplo una pluralidad de capas que comprenden papel, por ejemplo toallas de papel o toallitas. En una realización, el método comprende (por ejemplo después del paso b)), incubar las células a alrededor de 37°C durante alrededor de 10 minutos. En una realización, el método comprende (por ejemplo después del paso b)), incubar las células a alrededor de 36-38, 35-39 o 34-40°C, por ejemplo durante alrededor de 10 minutos. En una realización, la elutriación se realiza a alrededor de 8-12, 5-15 o 5-20 rpm. En una realización, la incubación se realiza en un dispositivo Plasmatherm.

[0046] En una realización del método de selección positiva, la muestra de entrada que comprende células efectoras inmunitarias comprende al menos 20 % de monocitos. En una realización, la muestra de entrada que comprende células efectoras inmunitarias comprende al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60% de monocitos.

[0047] En una realización, el método de selección positiva comprende uno o más de (por ejemplo 2, 3, 4 o la totalidad de), por ejemplo, en el orden enumerado:

a) descongelar una muestra de entrada congelada (por ejemplo una muestra de leucoféresis) que comprende células efectoras inmunitarias de un paciente que tiene una neoplasia maligna hematológica, opcionalmente en donde la muestra comprende >20% de linfoblastos;
b) lavar las células efectoras inmunitarias, por ejemplo a temperatura ambiente, por ejemplo 20-25°C, en una solución de lavado, por ejemplo medio X-VIVO15 (Lonza), llamado 'Medio Modificado' (MM).
c) poner en contacto la muestra de entrada con un reactivo de separación, reactivo de separación que comprende un miembro magnético o paramagnético y un miembro de unión a CD3 y/o CD28;
d) rotar la muestra de entrada y el reactivo de separación en un rotador, por ejemplo a 2-6 rpm, por ejemplo a 4 rpm, en donde la rotación dura, por ejemplo, 10-30 minutos, por ejemplo 20 minutos; y
e) realizar la selección positiva para enriquecer las células que se unen al reactivo de separación, por ejemplo durante 30 s a 2 minutos, por ejemplo durante 1 minuto.

[0048] En una realización, el método de selección positiva comprende uno o más de (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o la totalidad de), por ejemplo, en el orden enumerado:

a) descongelar una muestra de entrada congelada (por ejemplo una muestra de leucoféresis) que comprende células efectoras inmunitarias de un paciente que tiene una neoplasia maligna hematológica, opcionalmente en donde la muestra comprende >20% de monocitos;
b) lavar las células efectoras inmunitarias, por ejemplo a temperatura ambiente, por ejemplo 20-25°C, en una solución de lavado, por ejemplo que comprende alrededor de 5% de dextrosa y 0,45% de cloruro de sodio, por ejemplo D5 1/2NS;
c) colocar un recipiente flexible que comprende las células en un material aislante térmico, por ejemplo una pluralidad de capas que comprenden papel, por ejemplo toallas de papel o toallitas;
d) poner en contacto la muestra de entrada con un reactivo de separación, reactivo de separación que comprende un miembro magnético o paramagnético y un miembro de unión a CD3 y/o CD28;
e) incubar la muestra de entrada y reactivo de separación, por ejemplo, a 37°C, por ejemplo durante 5-15 minutos, por ejemplo 10 minutos;
f) rotar la muestra de entrada y el reactivo de separación en un rotador, por ejemplo a 2-6 rpm, por ejemplo a 4 rpm, en donde la rotación dura, por ejemplo, 10-30 minutos, por ejemplo 20 minutos; y
g) realizar la selección positiva para enriquecer las células que se unen al reactivo de separación, por ejemplo durante 30 s a 2 minutos, por ejemplo durante 1 minuto.

[0049] En una realización, la muestra, por ejemplo la muestra de entrada, es de un paciente que tiene una neoplasia hematología, por ejemplo una neoplasia hematológica descrita en el presente documento, por ejemplo ALL o DLBCL.

[0050] En una realización, la muestra de entrada comprende alrededor de 1×10^5 células nucleadas/ml, 2×10^5 células nucleadas/ml, 5×10^5 células nucleadas/ml, 7×10^5 células nucleadas/ml, 1×10^6 células nucleadas/ml, 2×10^6 células nucleadas/ml, 5×10^6 células nucleadas/ml, 7×10^6 células nucleadas/ml, 1×10^7 células nucleadas/ml , 2×10^7 células nucleadas/ml, 5×10^7 células nucleadas/ml, 7×10^7 células nucleadas/ml, 1×10^7 células nucleadas/ml, 2×10^8 células nucleadas/ml, 5×10^8 células nucleadas/ml y 7×10^8 células nucleadas/ml. En una realización, la muestra de entrada comprende alrededor de 1-1.5 $\times10^7$ células T.

[0051] En una realización, la muestra de entrada comprende al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de monocitos. En una realización, la muestra de entrada comprende al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células tumorales, por ejemplo linfoblastos. En una realización, la muestra de entrada comprende menos de 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% o 20% de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T. En una realización, la muestra de entrada comprende al menos alrededor de 5%, 10%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células B, por ejemplo células B CD45+CD19+. En una realización, la muestra de entrada comprende al menos alrededor de 5%, 10%, 15%,

18%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células B, por ejemplo células B CD45-CD19+.

[0052] En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%,0,2% o 0,1% de monocitos. En una realización, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de células tumorales. En una realización, la muestra de salida comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 99,9% de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T. En una realización, la muestra de salida comprende al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de células T, por ejemplo células T CD3+CD45+. En una realización, la muestra de salida comprende menos de alrededor de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de células B, por ejemplo células B CD45+CD19+. En una realización, la muestra de salida comprende menos de alrededor de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de células B, por ejemplo células B CD45-CD19+. En una realización, la muestra de salida comprende al menos 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% o 20% de células T.

[0053] Características o realizaciones adicionales de los métodos de la invención incluyen una o más de las siguientes: Una muestra de entrada en cualquiera de las realizaciones de los métodos de la invención es una muestra biológica de un sujeto que comprende células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T y/o células NK. En una realización, la muestra de entrada es una muestra de sangre, por ejemplo una muestra de sangre completa. En una realización, la muestra de entrada es una muestra de aféresis, por ejemplo una muestra de leucoféresis. En la invención, la muestra de entrada es una muestra congelada o criopreservada, por ejemplo congelada a -20° C o en nitrógeno líquido o congelada a -80°C a una tasa de 1° por minuto y almacenada en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de líquido.

[0054] En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de entrada comprende al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de monocitos (y opcionalmente hasta 40%, 70% o 95% de monocitos). En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de entrada comprende al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células tumorales, por ejemplo linfoblastos (y opcionalmente hasta 50% o 95% de monocitos). En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de entrada comprende menos de 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% o 20% de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T (y opcionalmente más de 20% de células T).

[0055] En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de monocitos (y opcionalmente más de 1% o 0,1% de monocitos). En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 2%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de células tumorales (y opcionalmente más de 1% o 0,1% de células tumorales). En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 99,9% de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T (y opcionalmente hasta 60% o 95% de células T).

[0056] En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende menos de 50%, 45%, 40%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 2%, 2% o 1% de porcentaje de monocitos en comparación con la muestra de entrada. En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende menos de 50%, 45%, 40%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 2%, 2% o 1% de porcentaje de células tumorales en comparación con la muestra de entrada. En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende al menos 50%, 45%, 40%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 2%, 2% o 1% de porcentaje de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T, en comparación con la muestra de entrada.

[0057] En realizaciones de los métodos de la invención, el método comprende además introducir, por ejemplo mediante transducción, un ácido nucleico que codifica un CAR en una o más células efectoras inmunitarias en la muestra de salida. En el presente documento se describen otros métodos para introducir un ácido nucleico que codifica un CAR.

[0058] En realizaciones de los métodos de la invención, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, por ejemplo que comprende un dominio de señalización primario y/o un dominio de señalización coestimulador.

[0059] En realizaciones de los métodos de la invención, los métodos comprenden además un paso de ensayo de la eficiencia de transducción. En realizaciones de los métodos de la invención, la transducción da lugar a una eficiencia de transducción de al menos alrededor de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50%.

[0060] En realizaciones de los métodos de la invención, los métodos comprenden además realizar un paso de lavado en la muestra de entrada con un tampón que comprende dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5, por ejemplo utilizando un instrumento CS5+.

[0061] En realizaciones de los métodos de la invención, las células efectoras inmunitarias son células efectoras inmunitarias humanas.

[0062] En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende células T CD8+. En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de salida comprende células T CD4+.

[0063] En la invención, la muestra de entrada es de un paciente que tiene una enfermedad asociada con un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral descrito en el presente documento, por ejemplo CD19, en donde además la enfermedad asociada con un antígeno tumoral es cáncer o una enfermedad autoinmune. En una realización, la enfermedad es un cáncer descrito en el presente documento, por ejemplo un cáncer descrito en el presente documento como asociado con una diana descrita en el presente documento. En una realización, el cáncer hematológico es leucemia. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo formado por una o más leucemias agudas incluyendo, entre otras, leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, entre otras, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos o afecciones hematológicas adicionales incluyendo, entre otras, la leucemia prolinfocítica de células B, la neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, el linfoma de Burkitt, el linfoma difuso de células B grandes, el linfoma folicular, la leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström y "preleucemia", que son un conjunto diverso de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y a enfermedades asociadas con la expresión de un antígeno tumoral descrito en el presente documento incluyen, entre otros, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan un antígeno tumoral como el descrito en el presente documento; y cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la enfermedad asociada con un antígeno tumoral descrito en el presente documento es un tumor sólido, por ejemplo un tumor sólido descrito en el presente documento, por ejemplo cáncer de próstata, colorrectal, de páncreas, cervical, gástrico, de ovario, cabeza o pulmón.

[0064] En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de entrada es de un paciente que tiene un cáncer seleccionado del grupo formado por una o más leucemias agudas que incluyen, entre otras, leucemia linfoide aguda de células B (BALL), leucemia linfoide aguda de células T (TALL), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, entre otras, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos o afecciones hematológicas adicionales incluyendo, entre otras, la leucemia prolinfocítica de células B, la neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, el linfoma de Burkitt, el linfoma difuso de células B grandes, el linfoma folicular, la leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmablástico, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenström, preleucemia, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas, y cualquier combinación de los mismos.

[0065] En realizaciones de los métodos de la invención, la muestra de entrada es de un paciente que tiene ALL.

[0066] En realizaciones de los métodos de la invención, el método comprende además un paso de ensayo de uno o más marcadores celulares en células en la muestra de salida, por ejemplo CD45, CD19, CD3, CD28, CD25 o CD14.

[0067] En realizaciones de los métodos de la invención, el método comprende además estimular la muestra de salida con un agente que estimula la proliferación de células efectoras inmunitarias, por ejemplo que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y/o un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T, por ejemplo un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28.

[0068] En realizaciones de los métodos de la invención, el método comprende además introducir un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo por transducción, transfección o electroporación.

[0069] Aunque en la práctica o prueba de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Para todas las secuencias de GenBank, Unigene y Entrez a las que se hace referencia en el presente documento, por ejemplo, en cualquier tabla del presente documento, a menos que se especifique lo contrario, los números de acceso de secuencia especificados en el presente documento, incluidos en cualquier tabla del presente documento, se refieren a las entradas de la base de datos actualizadas al 28 de diciembre de 2015. Cuando un gen o proteína hace referencia a una pluralidad de números de referencia de secuencia, se abarcan todas las variantes de secuencia.

[0070] Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Los títulos, subtítulos o elementos numerados o con letras, por ejemplo (a), (b), (i) etc., se presentan simplemente para facilitar la lectura. El uso de títulos o elementos numerados o con letras en este documento no requiere que los pasos o elementos se realicen en orden alfabético o que los pasos o elementos sean necesariamente discretos entre sí. Otras

características, objetos y ventajas de la invención se desprenderán de la descripción y los dibujos, así como de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0071]

La FIG. 1A es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular con un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo;

la FIG. 1B es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular con una pluralidad de módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en paralelo;

la FIG. 1C es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular con una pluralidad de módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en serie;

la FIG. 1D es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular con un bucle de retorno;

la FIG. 1E es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular con módulos de suspensión celular y tampón conectados por separado al módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo;

la FIG. 1F es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular que incluye un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria;

la FIG. 1G es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular que incluye múltiples módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo y múltiples módulos de eliminación de perlas de membrana giratoria;

la FIG. 1H es otro diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular con un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo;

la FIG. 2A es un diagrama esquemático en sección transversal de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en una configuración de imán orientada en x;

la FIG. 2B es un diagrama esquemático tridimensional semitransparente del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo de la FIG. 2A;

la FIG. 3 es un diagrama esquemático en sección transversal longitudinal lateral de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo con puertos de inyección de fluido de membrana y submembrana;

La FIG. 4A es un diagrama esquemático en sección transversal de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en una configuración de gradiente cero;

La FIG. 4B es un diagrama esquemático tridimensional semitransparente del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo de la FIG. 4A;

La FIG. 4C es un diagrama esquemático en sección transversal de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en una configuración de gradiente cero para crear un filtro de gradiente cero;

La FIG. 4D es un diagrama esquemático en sección transversal longitudinal superior de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en una configuración de gradiente cero para crear un filtro de gradiente cero;

La FIG. 5A es un diagrama esquemático en sección transversal longitudinal de un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria;

la FIG. 5B es un diagrama esquemático en sección transversal de un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria con una primera configuración de imán;

la FIG. 5C es un diagrama esquemático en sección transversal de un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria con una segunda configuración de imán;

la FIG. 6 es un diagrama de la fuerza fluídica y la fuerza magnética en una célula;

las FIGs. 7A, 7B y 7C son diagramas del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de la FIG. 2B con células presentes durante la separación magnética;

las FIGs. 8A y 8B son diagramas del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de la FIG. 2B con células presentes durante la eliminación de perlas magnética;

la FIG. 9 es un gráfico que compara los resultados de la eliminación de perlas utilizando el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de las FIGs. 2A y 2B y los resultados de la eliminación de perlas utilizando un módulo de flujo de parada convencional (las cajas representan cuartiles y la mediana);

la FIG. 10A es un diagrama esquemático en sección x-y longitudinal superior de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo con células unidas a partículas paramagnéticas presentes cerca de la entrada del módulo (izquierda) y cerca de la salida del módulo (derecha);

la FIG. 10B es un diagrama esquemático en sección longitudinal lateral de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo con células unidas a partículas paramagnéticas presentes cerca de la entrada del módulo (izquierda) y cerca de la salida del módulo (derecha);

la FIG. 11 es un diagrama del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo similar al de la FIG. 4A durante la separación magnética de células unidas a partículas paramagnéticas y células no unidas;

la FIG. 12 es un diagrama del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo de la FIG. 4C con células presentes durante la separación magnética de células unidas a partículas paramagnéticas y células no unidas;

la FIG. 13 es un diagrama del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo de la FIG. 4C con células presentes durante la separación magnética de partículas paramagnéticas de células sin perlas, no unidas; y

la FIG. 14 es un diagrama del módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria de la FIG. 5 con células presentes durante la eliminación de perlas.

Las FIG. 15A y la FIG. 15B son imágenes que muestran las células después de Sepax SmartWash y resuspensión en Medio Modificado (FIG. 15A) o en solución acuosa D51/2NS (FIG. 15B).

Las FIG. 16A y 16B son gráficos que comparan las recuperaciones de células después de diferentes protocolos de lavado. La FIG. 16A muestra la comparación de las recuperaciones de células después de lavado con CS5+ y procedimientos Sepax SmartWash, donde ambos procedimientos se realizaron en la solución acuosa D51/2NS. La FIG. 16B muestra la comparación de las recuperaciones de células después de lavado con CS5 y después de incubación de 2 horas de células en Medio Modificado en comparación con células en la solución acuosa D51/2NS.

La FIG. 17 es un diagrama que muestra la comparación de pasos en el proceso B en comparación con el nuevo proceso OptiPrep.

La FIG. 18 es un esquema que muestra la configuración de la bolsa y el kit de tuberías Sepax 2 NeatCell.

Las FIG. 19A, 19B, 19C, 19D y 19E son gráficos que muestran la comparación fenotípica de productos generados por el Proceso B (centrifugación en gradiente de densidad utilizando producto Ficoll) o mediante el nuevo método Sepax con OptiPrep (producto OptiPrep). La FIG. 19A muestra el rendimiento de células T. La FIG. 19B muestra el rendimiento de células B. La FIG. 19C muestra el rendimiento de monocitos. La FIG. 19D muestra la composición relativa de los productos finales por fenotipo. La FIG. 19E muestra la composición relativa de los productos finales por fenotipo.

La FIG. 20 es un esquema que muestra la bolsa estéril para selección positiva optimizada (FAST).

La FIG. 21 es un esquema que muestra la tapa modificada para selección positiva optimizada (FAST).

La FIG. 22 es un gráfico que muestra el número de células viables de los lotes clínicos hasta la fecha. Las líneas negras indican lotes procesados mediante el Proceso B. Las líneas coloreadas indican lotes procesados mediante el método FAST.

Las FIG. 23A, 23B y 23C muestran los detalles del Experimento 1 en el Ejemplo 5. La FIG. 23A es una descripción general esquemática y un resumen de resultados. La FIG. 23B es una serie de gráficos de

enriquecimiento pre y post-FAST para el brazo experimental 1. La FIG. 23C es una serie de gráficos de enriquecimiento pre y post-FAST para el brazo experimental 2.

Las FIG. 24A, 24B y 24C muestran los detalles del Experimento 2 en el Ejemplo 5. La FIG. 24A es una descripción general esquemática y un resumen de resultados. La FIG. 24B es una serie de gráficos de enriquecimiento pre y post-FAST para el brazo experimental 1. La FIG. 24C es una serie de gráficos de enriquecimiento pre y post-FAST para el brazo experimental 2.

Las FIG 25A y 25B muestran los detalles del Experimento 3 en el Ejemplo 5. La FIG. 25A es una descripción general esquemática y un resumen de resultados. La FIG. 25B es una serie de gráficos de enriquecimiento pre y post-FAST.

Las FIG. 26A y 26B son tablas que muestran los resultados de la realización de la selección negativa de CD19. La FIG. 26A muestra la viabilidad de la depleción de células CD19+ en muestras de aféresis de un donante sano y un paciente con ALL. La FIG. 26B muestra la distribución de diferentes tipos de células, células T, monocitos y células B CD19, antes y después de realizar diferentes protocolos de enriquecimiento (TR149, TR150 y TR151).

La FIG. 27 es un esquema que muestra los pasos para el Proceso B. "muestra APH" representa la muestra de aféresis de entrada, que puede ser fresca o congelada. "CS5" representa un paso de lavado, por ejemplo utilizando un sistema de lavado o procesamiento celular como el instrumento CS5+. "Sepax" representa separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll. "Selección Positiva" representa separación "estática" basada en Dynabeads, por ejemplo utilizando Dynabeads CD3/CD28.

La FIG. 28 es un esquema que muestra la separación magnética "estática" actual (izquierda) y la separación magnética "dinámica", por ejemplo en condiciones de flujo (derecha). El esquema de "Selección" (centro) demuestra la separación de un agente de separación magnética asociado con su molécula diana, atraído por el elemento magnético, separando de este modo la molécula diana de moléculas no deseadas.

Las FIG. 29A, 29B y 29C muestran los resultados de un ensayo de liberación de IFNy después de estimulación con CD19 (FIG. 29A), PMA (FIG. 29B) y mesotelina (FIG. 29C). Las muestras de células efectoras inmunitarias probadas se prepararon utilizando los diferentes protocolos enumerados a lo largo del eje X.

Las FIG. 30A, 30B y 30C muestran los resultados de un ensayo de citotoxicidad. Las FIG. 30A y 30B muestran el porcentaje de lisis específica para cada muestra de efector inmune preparada utilizando los diferentes protocolos enumerados a lo largo del eje X. La FIG. 30C muestra los resultados de citotoxicidad obtenidos a partir de la FIG. 30A y 30B, expresados como unidades de EC50 recíprocas.

La FIG. 31 es un gráfico de los rendimientos de cosecha para un proceso de eliminación de perlas de flujo no continuo y un proceso de eliminación de perlas de flujo continuo en función del número de células de entrada; y

La FIG. 32 es un gráfico agrupado de los rendimientos de cosecha para un proceso de eliminación de perlas de flujo no continuo y un proceso de eliminación de perlas de flujo continuo en función del número de células de entrada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0072] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece la invención.

[0073] El término "un" y "una" se refieren a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

[0074] El término "alrededor de" cuando se refiere a un valor mensurable como una cantidad, una duración temporal y similares, está destinado a abarcar variaciones de ±20% o en algunos casos ±10%, o en algunos casos ±5%, o en algunos casos ±1%, o en algunos casos ±0,1% del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

[0075] El término "Receptor de Antígeno Quimérico" o alternativamente un "CAR" se refiere a un conjunto de polipéptidos, normalmente dos en las realizaciones más simples que, cuando se encuentran en una célula efectora inmune, proporcionan a la célula especificidad para una célula diana, normalmente una célula cancerosa, y con generación de señales intracelulares. En algunas realizaciones, un CAR comprende al menos un dominio de unión al

antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmático (también denominado en el presente documento "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora y/o una molécula coestimuladora como se define más adelante. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos están en la misma cadena polipeptídica (por ejemplo, comprenden una proteína de fusión quimérica). En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos no son contiguos entre sí, por ejemplo, están en diferentes cadenas polipeptídicas. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, por ejemplo, puede acoplar un dominio de unión al antígeno a un dominio de señalización intracelular. En una realización, la molécula estimuladora del CAR es la cadena zeta asociada con el complejo receptor de células T. En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmática comprende un dominio de señalización primario (por ejemplo un dominio de señalización primario de CD3-zeta). En una realización, el dominio de señalización citoplasmático comprende uno o más dominios de señalización funcionales de al menos una molécula coestimuladora como se define a continuación. En una realización, la molécula coestimuladora es una molécula coestimuladora descrita en el presente documento, por ejemplo 4-1BB (es decir, CD137), CD27, ICOS y/o CD28. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional de una molécula estimuladora. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional de una molécula estimuladora. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcional de una o más molécula(s) coestimuladora(s) y un dominio de señalización funcional de una molécula estimuladora. En una realización, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcional de una o dos molécula(s) coestimuladora(s) y un dominio de señalización funcional de una molécula estimuladora. En una realización, el CAR comprende una secuencia líder opcional en el término amino (término N) de la proteína de fusión del CAR. En una realización, el CAR comprende una secuencia líder en el término N del dominio de unión a antígeno extracelular, donde la secuencia líder está opcionalmente escindida del dominio de unión a antígeno (por ejemplo un scFv) durante el procesamiento celular y la localicación del CAR en la membrana celular.

[0076] Un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno (por ejemplo un scFv o TCR) que se dirige a un antígeno tumoral X específico, como los que se describen en el presente documento, también se denomina XCAR. Por ejemplo, un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno que tiene como diana CD19 se denomina CARCD19.

[0077] El término "dominio de señalización" se refiere a la porción funcional de una proteína que actúa transmitiendo información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de vías de señalización definidas mediante la generación de segundos mensajeros o funcionando como efectores en la respuesta a tales mensajeros.

[0078] El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena múltiple o simple, o inmunoglobulinas intactas, y se pueden derivar de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

[0079] El término "fragmento de anticuerpo" se refiere al menos a una porción de un anticuerpo que conserva la capacidad de interaccionar específicamente (por ejemplo mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epítopo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', $F(ab')_2$, fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpo scFv, Fv con enlaces disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único, tales como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, tales como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un enlace disulfuro en la región bisagra, y una CDR aislada u otros fragmentos de unión a epítopo de un anticuerpo. Un fragmento de unión a antígeno también se puede incorporar a anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden injertar en armazones basados en polipéptidos como una fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU Nº: 6,703,199, que describe minicuerpos de polipéptidos de fibronectina).

[0080] El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de cadena ligera y pesada están enlazadas de manera contigua, por ejemplo a través de un engarce sintético, por ejemplo un engarce polipeptídico flexible corto, y son capaces de expresarse como un polipéptido de cadena simple y en donde el scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del que se deriva. A menos que se especifique, tal como se utiliza en el presente documento, un

scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, por ejemplo con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-engarce-VH o puede comprender VH-engarce-VL.

[0081] La porción de un CAR que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una variedad de formas donde el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena simple (scFv) y un anticuerpo humanizado (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). En una realización, el dominio de unión al antígeno de un CAR comprende un fragmento de anticuerpo. En una realización adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

[0082] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína, por ejemplo una cadena o fragmento de inmunoglobulina de la misma, que comprende al menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. El término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En una realización, una molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica, por ejemplo, comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en donde una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión a un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión por un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífica es una molécula de anticuerpo biespecífica. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífica está caracterizada por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un segundo epítopo.

[0083] La porción de un CAR de uso en la invención que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una variedad de formas donde el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena simple (scFv), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo biespecífico (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). En un aspecto, el dominio de unión al antígeno de una composición de CAR utilizada en la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

[0084] El término "cadena pesada de anticuerpo" se refiere a la mayor de dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en moléculas de anticuerpos en sus conformaciones presentes naturalmente, y que determina normalmente la clase a la que pertenece el anticuerpo.

[0085] El término "cadena ligera de anticuerpo" se refiere a la más pequeña de dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en moléculas de anticuerpos en sus conformaciones presentes naturalmente. Cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) se refieren a los dos principales isotipos de cadenas ligeras de anticuerpos.

[0086] El término "región determinante de complementariedad" o "CDR", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a las secuencias de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpos que confieren especificidad de antígenos y afinidad de unión. Por ejemplo, en general, hay tres CDR en cada región de variable de cadena pesada (por ejemplo HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar utilizando cualquiera de una serie de esquemas bien conocidos, incluyendo los 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 numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia") o una combinación de los mismos. Bajo el esquema de numeración Kabat, en algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos CDR en el dominio variable de cadena pesada (VH) se numeran 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácido CDR en el dominio variable de cadena ligera (VL) se numeran 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Bajo el esquema de numeración Chotia, en algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos CDR en el in the VH se numeran 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos CDR en el VL se numeran 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3). En un esquema denumeración Kabat y Chothia combinado, en algunas realizaciones, las CDR corresponden a los residuos de aminoácidos que son parte de una CDR Kabat, una CDR Chothia o ambas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las CDR corresponden a residuos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en un VH, por ejemplo un VH de mamífero, por ejemplo un VH humano; y residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en un VL, por ejemplo VL de mamífero, por ejemplo un VL humano.

[0087] El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago o un sistema de expresión de levadura.

El término también debe interpretarse como un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y expresando la molécula de ADN una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde el ADN o la secuencia de aminoácidos se ha obtenido utilizando ADN recombinante o tecnología de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

[0088] El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes o ambas. El artesano experto entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos, pueden servir como un antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Un artesano experto entenderá que cualquier ADN que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia parcial de nucleótidos que codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, por lo tanto, codifica un "antígeno" tal como se utiliza ese término en el presente documento. Además, un experto en la materia entenderá que un antígeno no tiene que ser codificado solamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente invención incluye, entre otros, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en diversas combinaciones para codificar polipéptidos que provocan la respuesta inmunitaria deseada. Además, un artesano experto entenderá que un antígeno no tiene que ser codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno se puede generar, sintetizar o derivar de una muestra biológica o puede ser una macromolécula además de un polipéptido. Una muestra biológica de este tipo puede incluir, entre otros, una muestra tisular, una muestra tumoral, una célula o un líquido con otros componentes biológicos.

[0089] El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo en el que posteriormente se va a reintroducir en el individuo.

[0090] El término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo en el que se introduce el material Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente desde el punto de vista genético para interaccionar de forma antigénica. El término "xenogénico" se refiere a cualquier material procedente de un animal de una especie diferente.

[0091] El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas se pueden diseminar localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. En el presente documento se describen ejemplos de varios tipos de cáncer que incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares. Los términos "tumor" y "cáncer" se utilizan indistintamente en el presente documento, por ejemplo ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, por ejemplo difusos o circulantes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" o "tumor" incluye cánceres y tumores premalignos, así como malignos.

[0092] "Derivado de" tal como se utiliza ese término en el presente documento indica una relación entre una primera y una segunda molécula. Se refiere de manera general a la similitud estructural entre la primera molécula y una segunda molécula, y no connota ni incluye una limitación, en cuanto a la fuente o el proceso, de una primera molécula que procede de una segunda molécula. Por ejemplo, en el caso de un dominio de señalización intracelular que se deriva de una molécula CD3zeta, el dominio de señalización intracelular conserva suficiente estructura de CD3zeta, de modo que tiene la función requerida, es decir, la capacidad de generar una señal en las condiciones apropiadas. No connota ni incluye una limitación a un proceso particular para producir el dominio de señalización intracelular, por ejemplo, no significa que, para proporcionar el dominio de señalización intracelular, se deba comenzar con una secuencia de CD3zeta y eliminar la secuencia no deseada, o imponer mutaciones, para conseguir el dominio de señalización intracelular.

[0093] La frase "enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral como el descrito en el presente documento" incluye, entre otras, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral como el descrito en el presente documento o una afección asociada con el cáncer asociada a células que expresan células que expresan un antígeno tumoral como el descrito en el presente documento, incluidas, por ejemplo enfermedades proliferativas como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada a células que expresan un antígeno tumoral como el descrito en el presente documento. En una realización, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento es un cáncer hematológico. En una realización, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral tal como se describe en el presente documento es un cáncer sólido. Las enfermedades adicionales asociadas con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento incluyen, entre otros, por ejemplo cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento incluyen, entre otras, por ejemplo enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes. En algunas realizaciones, las células que expresan el antígeno tumoral expresan, o han expresado en cualquier momento, el

ARNm que codifica el antígeno tumoral. En una realización, las células que expresan el antígeno tumoral producen la proteína del antígeno tumoral (por ejemplo de tipo salvaje o mutante), y la proteína del antígeno tumoral puede estar presente en niveles normales o niveles reducidos. En una realización, las células que expresan el antígeno tumoral produjeron niveles detectables de una proteína antigénica tumoral en un punto y posteriormente no produjeron sustancialmente ninguna proteína antigénica tumoral detectable.

[0094] La frase "enfermedad asociada con la expresión de CD19" incluye, entre otras, una enfermedad asociada a la expresión de CD19 o una afección asociada con células que expresan CD19 incluyendo, por ejemplo, enfermedades proliferativas como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada a células que expresan CD19. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 incluye cánceres y neoplasias incluyendo, entre otras, una o más leucemias agudas que incluyen, entre otras, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide aguda de células B (BALL), leucemia linfoide aguda de células T (TALL), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas, incluyendo, entre otras, leucemia mielogénica crónica (CML), leucemia linfoide crónica (CLL). Cánceres o afecciones hematológicas adicionales asociadas con la expresión de CD19 comprenden, entre otros, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástica, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macrolobulinemia de Waldenström, neoplasia mieloproliferativa; un trastorno histiocítico (por ejemplo un trastorno de mastocitos o una neoplasia de células dendríticas plasmocitoide plásticas); un trastorno de mastocitos, por ejemplo mastocitosis sistémica o leucemia de mastocitos; leucemia prolinfocítica de células B, mieloma de células plasmáticas y "preleucemia", que son un conjunto diverso de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y similares. Las enfermedades adicionales asociadas con la expresión de CD19 incluyen, entre otros, por ejemplo, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, entre otras, por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes. En algunas realizaciones, las células que expresan el antígeno tumoral expresan, o han expresado en cualquier momento, el ARNm que codifica el antígeno tumoral. En una realización, las células que expresan el antígeno tumoral producen la proteína del antígeno tumoral (por ejemplo de tipo salvaje o mutante), y la proteína del antígeno tumoral puede estar presente en niveles normales o niveles reducidos. En una realización, las células que expresan el antígeno tumoral produjeron niveles detectables de una proteína antigénica tumoral en un punto y posteriormente no produjeron sustancialmente ninguna proteína antigénica tumoral detectable. En otras realizaciones, la enfermedad es un cáncer Cd19-negativo, por ejemplo un cáncer recidivante CD19-negativo. En algunas realizaciones, la célula que expresa el antígeno tumoral (por ejemplo CD19) expresa, o expresó en cualquier momento,ARNm que codifica el antígeno tumoral. En una realización, la célula que expresa el antígeno tumoral (por ejemplo CD19) produce la proteína del antígeno tumoral (por ejemplo de tipo salvaje o mutante), y la proteína del antígeno tumoral puede estar presente en niveles normales o niveles reducidos. En una realización, la célula que expresa el antígeno tumoral (por ejemplo CD19) produjo niveles detectables de una proteína de antígeno tumoral en un momento dado y posteriormente no produjo de manera sustancial ninguna proteína de antígeno tumoral detectable.

[0095] La frase "enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de célula B" incluye, entre otras, una enfermedad asociada a la expresión de una o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1, o una afección asociada con células que expresan, o expresaron en cualquier momento, una o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1, incluyendo, por ejemplo, enfermedades proliferativas como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada a células que expresan una o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1. Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B puede incluir una afección asociada con células que actualmente no expresan el antígeno de células B, por ejemplo porque la expresión del antígeno se ha regulado a la baja, por ejemplo, debido al tratamiento con una molécula que fija como objetivo el antígeno de células B, por ejemplo un CAR que fija como objetivo células B, pero que en un momento expresó el antígeno. La frase "enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B" incluye una enfermedad asociada con la expresión de CD19, tal como se describe en el presente documento. Las células que expresan CAR se pueden utilizar para tratar una enfermedad asociada con un antígeno de células B. En realizaciones, un CAR producido mediante un método en el presente documento comprende un dominio de unión a antígeno que se dirige a un antígeno de células B.

[0096] El término "recaída", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la reaparición de una enfermedad (por ejemplo cáncer) después de un periodo de receptividad inicial, por ejemplo después de un tratamiento previo con una terapia, por ejemplo terapia contra el cáncer (por ejemplo respuesta completa o respuesta parcial). El periodo inicial de receptividad puede implicar que el nivel de las células cancerosas caiga por debajo de un cierto umbral, por ejemplo por debajo de 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. La reaparición puede implicar que el nivel de células cancerosas se eleve por encima de un cierto umbral, por ejemplo por encima de 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. Por ejemplo, en el contexto de B-ALL, la reaparición puede implicar, por ejemplo, una reaparición de blastos en

la sangre, la médula ósea (> 5%) o cualquier sitio extramedular, después de una respuesta completa. En este contexto, una respuesta completa puede implicar < 5% de blastos de BM. Más generalmente, en una realización, una respuesta (por ejemplo respuesta completa o respuesta parcial) puede implicar la ausencia de MRD detectable (enfermedad residual mínima). En una realización, el periodo inicial de respuesta dura al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días; al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 meses; o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años.

[0097] "Refractario", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad, por ejemplo cáncer, que no responde a un tratamiento. En realizaciones, un cáncer refractario puede ser resistente a un tratamiento antes del tratamiento o al comienzo del mismo. En otras realizaciones, el cáncer refractario se puede volver resistente durante un tratamiento. Un cáncer refractario también se denomina cáncer resistente.

[0098] El término "modificaciones de secuencia conservadoras" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de uso en la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Los familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acídicas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de un CAR descrito en el presente documento pueden ser reemplazados por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el CAR alterado se puede estudiar usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

[0099] El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida mediante unión de una molécula estimuladora (por ejemplo un complejo TCR/CD3 o CAR) con su ligando afín (o antígeno tumoral en el caso de un CAR), mediando de este modo un evento de transducción como, entre otros, transducción de señales a través del complejo TCR/CD3 o transducción de señales a través del receptor NK apropiado o dominios de señalización del CAR. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de ciertas moléculas.

[0100] El término "molécula estimuladora" se refiere a una molécula expresada por una célula inmunitaria (por ejemplo célula T, célula NK, célula B), que proporciona la(s) secuencia(s) de señalización citoplasmática que regulan la activación de la célula inmunitaria de la forma estimuladora para al menos algún aspecto de la vía de señalización de la célula inmunitaria. En un aspecto, la señal es una señal primaria que se inicia, por ejemplo, mediante la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, y que da lugar a la mediación de una respuesta de células T, que incluye, entre otros, proliferación, activación, diferenciación y similares. Una secuencia de señalización citoplasmática primaria (también denominada "dominio de señalización primario") que actúa de manera estimuladora puede contener un motivo de señalización que es conocido como motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora o ITAM. Ejemplos de una secuencia de señalización citoplasmática que contiene ITAM, que es de uso particular en la invención, incluyen, entre otros, aquellos derivados de CD3 zeta, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc Épsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD79a, CD79b, DAP10 y DAP12. En un CAR específico de uso en la invención, el dominio de señalización intracelular de cualquiera de uno o más CAR de uso en la invención comprende una secuencia de señalización intracelular, por ejemplo una secuencia de señalización primario de CD3-zeta. En un CAR específico de uso en la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:9 (CD3 zeta mutante) o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo ratón, roedor, mono, simio y similares. En un CAR específico de uso en la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 10 (CD3 zeta humano de tipo salvaje), o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo ratón, roedor, mono, simio y similares.

[0101] El término "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a una célula del sistema inmunitario, como una célula accesoria (por ejemplo una célula B, una célula dendrítica y similares) que muestra un antígeno extraño complejado con complejos de histocompatibilidad principales (MHC) en su superficie. Las células T pueden reconocer estos complejos utilizando sus receptores de células T (TCR). Las APC procesan antígenos y los presentan a las células T.

[0102] Un "dominio de señalización intracelular", tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a una porción intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular puede generar una señal que fomenta una función efectora inmunitaria de la célula que contiene el CAR, por ejemplo una célula CART. Los ejemplos de función efectora inmunitaria, por ejemplo en un linfocito CART, incluyen actividad citolítica y actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citoquinas. En realizaciones, el dominio de señalización intracelular es la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada.

Aunque se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar la cadena completa. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta, siempre que transduce la señal de la función efectora. Por lo tanto, la expresión dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

[0103] En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario. Dominios de señalización intracelular primarios ejemplares incluyen aquellos derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria o la estimulación dependiente de antígeno. En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Dominios de señalización intracelular coestimuladores ejemplares incluyen aquellos derivados de las moléculas responsables de señales coestimuladoras o la estimulación dependiente de antígeno. Por ejemplo, en el caso de un CART, un dominio de señalización intracelular primario puede comprender una secuencia citoplasmática de un receptor de células T y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender una secuencia citoplasmática de una molécula correceptora o coestimuladora.

[0104] Un dominio de señalización intracelular puede comprender un motivo de señalización que es conocido como motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmática primaria incluyen, entre otros, los derivados de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"), FcεRI y CD66d, CD32, DAP10 y DAP12.

[0105] El término "zeta" o alternativamente "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como GenBank Nº Acc. BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulador zeta" o alternativamente un "dominio estimulador CD3-zeta" o un "dominio estimulador TCR-zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplasmático de la cadena zeta que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de células T. En un aspecto, el dominio citoplasmático de zeta comprende los residuos 52 a 164 de GenBank Nº Acc. BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo ratón, roedor, mono, simio y similares, que son ortólogos funcionales de los mismos. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o un "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:9. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o un "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como la SEQ ID NO: 10.

[0106] El término "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en una célula T que se une específicamente a un ligando coestimulador, mediando de este modo una respuesta coestimuladora por la célula T, como, entre otras, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que son necesarias para una respuesta inmunitaria eficiente. Moléculas coestimuladoras incluyen, entre otras, la molécula MHC clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas similares a inmunoglobulinas, receptores de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de células NK activadoras, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly 108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, y un ligando que se une específicamente a CD83.

[0107] Un dominio de señalización intracelular coestimulador se refiere a una porción intracelular de una molécula coestimuladora. El dominio de señalización intracelular puede comprender la porción intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativo completo, de la molécula de la que procede, o un fragmento funcional de este.

[0108] El dominio de señalización intracelular puede comprender toda la porción intracelular o todo el dominio de señalización intracelular nativo de la molécula de la que se deriva o un fragmento funcional de la misma.

[0109] El término "4-1BB" se refiere a un miembro de la superfamilia TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como GenBank Nº Acc. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo ratón, roedor, mono, simio y similares; y un "dominio coestimulador 4-1BB" se define como los residuos de aminoácidos 214-255 de GenBank Nº Acc. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo ratón, roedor, mono, simio y similares. En un aspecto, el "dominio coestimulador 4-1BB" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:7 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo ratón, roedor, mono, simio y similares.

[0110] "Célula efectora inmune", tal como se utiliza ese término en el presente documento, se refiere a una célula que está implicada en una respuesta inmunitaria, por ejemplo en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de células efectoras inmunitarias incluyen células T, por ejemplo células T alfa/beta y células T gamma/delta, células B, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), mastocitos y fagocitos derivados de mieloides.

[0111] "Función efectora inmunitaria o respuesta efectora inmunitaria", tal como se utiliza ese término en el presente documento, se refiere a una función o respuesta, por ejemplo de una célula efectora inmunitaria, que potencia o promueve un ataque inmunitario de una célula diana. Por ejemplo, una función o respuesta efectora inmunitaria se refiere a una propiedad de una célula T o NK que promueve la muerte o la inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula diana. En el caso de una célula T, estimulación primaria y coestimulación son ejemplos de función o respuesta efectora inmunitaria.

[0112] El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T puede ser, por ejemplo, la actividad citolítica o la actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citoquinas.

[0113] El término "depleción" o "depletar", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al descenso o la reducción del nivel o la cantidad de una célula, una proteína, una macromolécula en una muestra después de que se realice un proceso, por ejemplo un paso de selección, por ejemplo una selección negativa. La depleción puede ser una depleción parcial de la célula, proteína o macromolécula. En una realización, la depleción es al menos una disminución o reducción del 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% del nivel o de la cantidad de una célula, una proteína, una macromolécula en comparación con el nivel o la cantidad de la célula, proteína o macromolécula en la muestra antes de que se realice el proceso.

[0114] El término "codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de ellos. Por lo tanto, un gen, ADNc o ARN codifica una proteína si transcripción y la traducción de ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona generalmente en listas de secuencias y la cadena no codificante utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, se pueden denominar codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

[0115] A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener intrón(intrones) en alguna versión.

[0116] El término "endógeno" se refiere a cualquier material procedente de un organismo, célula, tejido o sistema o producido dentro del mismo.

[0117] El término "exógenos" se refiere a cualquier material introducido a partir de un organismo, célula, tejido o sistema o producido fuera del mismo.

[0118] El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por un promotor.

[0119] El término "vector de transferencia" se refiere a una composición en cuestión que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede utilizar para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica, incluyendo, entre otros, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfílicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector de transferencia" incluye un plásmido que se replica de manera autónoma o un virus. El término también se debe interpretar para incluir compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, liposoma y similares. Ejemplos de vectores de transferencia virales incluyen, entre otros, vectores adenovirales, vectores adenoasociados a virus, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

[0120] El término "vector de expresión" se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión vinculadas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción cis para la expresión; otros elementos para la expresión se pueden suministrar por la célula hospedante o en un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, incluyendo cósmidos, plásmidos (por ejemplo desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

[0121] El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus que son capaces de infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula hospedante, por lo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de suministro de genes. VIH, VIS y VIF son ejemplos de lentivirus.

[0122] El término "vector lentiviral" se refiere a un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, incluyendo especialmente un vector lentiviral autoinactivador como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores lentivirales que pueden utilizarse en la clínica incluyen, entre otros, por ejemplo, la tecnología de suministro de genes LENTIVECTOR® de Oxford BioMedica, el sistema de vectores LENTIMAX™ de Lentigen y similares. También están disponibles tipos no clínicos de vectores lentivirales y el experto en la técnica estará familiarizado con ellos.

[0123] El término "homólogo" o "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo entre dos moléculas de ácido nucleico, como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas en 50%; si 90% de las posiciones (por ejemplo 9 de 10) son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son homólogas en 90%.

[0124] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados y los fragmentos de anticuerpos de los mismos son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o fragmento de anticuerpo) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor son reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, un anticuerpo/fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. Estas modificaciones pueden refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo del mismo comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o una parte significativa de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

[0125] "Completamente humano" se refiere a una inmunoglobulina, como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, donde toda la molécula es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o inmunoglobulina.

[0126] El término "aislado" significa alterado o retirado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente naturalmente en un animal vivo no está "aislado", sino que el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislada puede existir en forma sustancialmente purificada o puede existir en un entorno no nativo, por ejemplo, como una célula hospedante.

[0127] En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que se producen comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.

[0128] El término "enlazado de manera operable" o "control transcriptional" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que resulta de la expresión de este último. Por ejemplo, una primera secuencia de ácidos nucleicos está enlazada de manera operable con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está ubicada en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor está vinculado de manera operable a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de ADN enlazadas de manera operable pueden ser contiguas entre sí y, por ejemplo cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

[0129] El término administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, técnicas de inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, intratumoral o de infusión.

[0130] El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o una combinación de ADN o ARN del mismo y a polímeros del mismo en forma monocatenaria o bicatenaria. El término «ácido nucleico» incluye un gen, ADNc o un ARNm. En una realización, la molécula de ácido nucleico es sintética (por ejemplo sintetizada químicamente) o recombinante. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos o derivados de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales. A no ser que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes del mismo modificadas de manera conservadora (por ejemplo sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0131] Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto formado por residuos de aminoácidos enlazados covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establece ninguna limitación en el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que se denominan comúnmente péptidos, oligopéptidos y oligómeros en la técnica, por ejemplo, como a cadenas largas, que se denominan generalmente proteínas en la técnica, de las que hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de estos.

[0132] El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula o maquinaria sintética introducida requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

[0133] El término "secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se requiere para la expresión de un producto génico enlazado de manera operable a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de una manera específica para cada tejido.

[0134] El término promotor "constitutivo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se enlaza de manera operable con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula bajo la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

[0135] El término promotor "inducible" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se enlaza de manera operable con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando en la célula está presente un inductor que corresponde al promotor.

[0136] El término promotor "específico del tejido" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando está enlazada de manera operable con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

[0137] Los términos "antígeno asociado al cáncer" o "antígeno tumoral" se refieren indistintamente a una molécula (normalmente proteína, carbohidrato o lípido) que se expresa preferentemente en la superficie de una célula cancerosa, ya sea totalmente o como un fragmento (por ejemplo MHC/péptido), en comparación con una célula normal, y que es útil para la dirección preferente de un agente farmacológico a la célula cancerosa. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral es un marcador expresado tanto por células normales como por células cancerosas, por ejemplo un marcador de linaje, por ejemplo CD19 en células B. En ciertos aspectos, los antígenos tumorales de uso en la presente invención se derivan de cánceres que incluyen, entre otros, melanoma primario o metastático, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas, como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares. En algunas realizaciones, un antígeno asociado con el cáncer es una molécula de la superficie celular que se sobreexpresa en una célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo con una sobreexpresión de 1 vez, sobreexpresión de 2 veces, sobreexpresión de 3 veces o más en comparación con una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno asociado con el cáncer es una molécula de la superficie celular que se sintetiza de forma inapropiada en la célula cancerosa, por ejemplo una molécula que contiene deleciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno asociado con el cáncer se expresará exclusivamente en la superficie celular de una célula cancerosa, en su totalidad o como un fragmento (por ejemplo

MHC/péptido), y no se sintetizará ni expresará en la superficie de una célula normal. En algunas realizaciones, los CAR de uso en la presente invención incluyen CAR que comprenden un dominio de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un péptido presentado por MHC. Normalmente, los péptidos derivados de proteínas endógenas llenan los bolsillos de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y son reconocidos por receptores de células T (TCR) en linfocitos T CD8 +. Los complejos MHC de clase I se expresan constitutivamente por todas las células nucleadas. En cáncer, los complejos péptidos/MHC específicos de tumores representan una clase única de dianas de superficie celular para inmunoterapia. Se han descrito anticuerpos similares a TCR dirigidos a péptidos derivados de antígenos virales o tumorales en el contexto del antígeno leucocitario humano (HLA)-A1 o HLA-A2 (véase, por ejemplo, Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21) :1601-1608 ; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176) :176ra33 ; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100). Por ejemplo, los anticuerpos similares a TCR se pueden identificar a partir de cribado de una biblioteca, como una biblioteca de fagos scFv humanos.

[0138] El término "engarce polipeptídico flexible" o "engarce", tal como se utiliza en el contexto de un scFv, se refiere a un engarce peptídico que está formado por aminoácidos como residuos de glicina y/o serina utilizados por separado o en combinación para enlazar regiones de cadena pesada variable y de cadena ligera variable entre sí. En una realización, el engarce polipeptídico flexible es un engarce Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos $(Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ (SEQ ID NO: 15), donde n es un número entero positivo igual o superior a 1. Por ejemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10. En una realización, los engarces polipeptídicos flexibles incluyen, entre otros, $(Gly_4\ Ser)_4$ (SEQ ID NO:27) o $(Gly_4\ Ser)_3$ (SEQ ID NO:28). En otra realización, los engarces incluyen múltiples repeticiones de (Gly_2Ser), (GlySer) o (Gly_3Ser) (SEQ ID NO:29). Dentro del alcance de la invención también se incluyen los engarces descritos en el documento WO2012/138475.

[0139] Tal como se utiliza en el presente documento, una caperuza 5' (también denominada caperuza de ARN, caperuza de ARN 7-metilguanosina o caperuza de ARN m^7G) es un nucleótido de guanina modificado que se ha añadido al "frente" o extremo 5' de un ARN mensajero eucariota poco después del inicio de la transcripción. La caperuza 5' consiste en un grupo terminal que está enlazado al primer nucleótido transcrito. Su presencia es crítica para el reconocimiento por parte del ribosoma y la protección de RNasas. La adición de la caperuza está acoplada a la transcripción, y se produce cotranscripcionalmente, de modo que cada una influye en la otra. Poco después del inicio de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que se sintetiza está unido por un complejo de síntesis de caperuza asociado con ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas que se requieren para la cubierta de ARNm. La síntesis procede como una reacción bioquímica de varios pasos. La fracción de cubierta se puede modificar para modular la funcionalidad de ARNm, como su estabilidad o eficiencia de traducción.

[0140] Tal como se utiliza en el presente documento, "ARN transcrito in vitro" se refiere a ARN, por ejemplo ARNm que se ha sintetizado in vitro. Generalmente, el ARN transcrito in vitro se genera a partir de un vector de transcripción in vitro. El vector de transcripción in vitro comprende una plantilla que se utiliza para generar el ARN transcrito in vitro.

[0141] Tal como se utiliza en el presente documento, un "poli(A)" es una serie de adenosinas unidas mediante poliadenilación al ARNm. En algunas realizaciones de una construcción para la expresión transitoria, el poliA está entre 50 y 5000 (SEQ ID NO: 30), por ejemplo es mayor que 64, por ejemplo mayor que 100, por ejemplo mayor que 300 o 400 secuencias de poli(A), se pueden modificar química o enzimáticamente para modular la funcionalidad de mARN como la localización, la estabilidad o la eficiencia de traducción.

[0142] Tal como se utiliza en el presente documento, "poliadenilación" se refiere al enlace covalente de una fracción de poliadenililo o su variante modificada a una molécula de ARN mensajero. En organismos eucariotas, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) están poliadeniladas en el extremo 3'. La cola 3' de poli(A) es una larga secuencia de nucleótidos de adenina (frecuentemente varios cientos) añadidos al pre-ARNm a través de la acción de una enzima, poliadenilato polimerasa. En eucariotas superiores, la cola de poli(A) se añade a transcritos que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli(A) y la proteína unida a ella ayudan a proteger el ARNm de la degradación por exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación de ARNm desde el núcleo y la traducción. La poliadenilación se produce en el núcleo inmediatamente después de la transcripción de ADN en ARN, pero adicionalmente también se puede producir más tarde en el citoplasma. Una vez finalizada la transcripción, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasa asociado con ARN polimerasa. El sitio de escisión se caracteriza generalmente por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Después de que el ARNm se ha escindido, los residuos de adenosina se añaden al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

[0143] Tal como se utiliza en el presente documento, "transitorio" se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un periodo de horas, días o semanas, en donde el periodo de tiempo de expresión es menor que el periodo de tiempo para la expresión del gen si está integrado en el genoma o contenido dentro de un replicón de plásmido estable en la célula hospedante.

[0144] La aféresis es el proceso en el que se extrae sangre de un individuo, se separa en componentes seleccionados y el resto vuelve a la circulación. Por lo generar, hay dos métodos para separar los componentes sanguíneos, el

centrífugo y el no centrífugo. La leucoféresis da como resultado la selección activa y separación de los glóbulos blancos del paciente.

[0145] Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratante" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno proliferativo o a la mejora de uno o más síntomas (por ejemplo uno o más síntomas discernibles) de un trastorno proliferativo resultante de la administración de una o más terapias (por ejemplo uno o más agente terapéuticos como un CAR de uso en la invención). Los términos "tratar", "tratamiento" y "tratante" se pueden referir a la mejora de al menos un parámetro físico mensurable de un trastorno proliferativo, como el crecimiento de un tumor, no necesariamente discernible por el paciente. Los términos "tratar", "tratamiento" y "tratante" se pueden referir también a la inhibición de la progresión de un desorden proliferativo, ya sea físicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico o ambos. Los términos "tratar", "tratamiento" y "tratante" se pueden referir a también a la reducción o la estabilización del tamaño del tumor o del recuento de células cancerosas.

[0146] El término "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que desempeñan un papel en la transmisión de una señal de una parte de una célula o tra parte de una célula. La frase "receptor de la superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir la señal a través de la membrana de una célula.

[0147] El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo mamíferos, humanos).

[0148] El término, una célula "sustancialmente purificada" se refiere a que una célula está esencialmente exenta de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos celulares con los que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a las células que se han separado de las células que las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunos aspectos, las células se cultivan in vitro. En otros aspectos, las células no se cultivan in vitro.

[0149] En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En ciertas realizaciones, el antígeno tumoral se deriva de un cáncer que incluye, entre otros, melanoma primario o metastático, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas, como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares.

[0150] El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refiere a un proceso en el que el ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce en la célula hospedante. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula objeto principal y su descendencia.

[0151] El término "se une específicamente" se refiere a un anticuerpo o un ligando que reconoce y se une a una proteína asociada de unión afín presente en una muestra, pero que un anticuerpo o ligando no reconoce o une sustancialmente a otras moléculas en la muestra.

[0152] Intervalos: a lo largo de esta divulgación se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de intervalo. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no se debe interpretar como una limitación inflexible en el alcance de la invención. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha revelado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo como de 1 a 6 ha divulgado específicamente subintervalos como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Como otro ejemplo, un intervalo como 95-99% de identidad incluye algo con 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad e incluye subintervalos como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% y 98-99% de identidad. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción adicional

[0153] En el presente documento se divulgan métodos de fabricación de células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) que se pueden modificar por ingeniería genética con un CAR, por ejemplo un CAR descrito en el presente documento, y mezclas de reacción y composiciones que comprenden tales células. Los métodos divulgados en el presente documento mejoran el rendimiento y la calidad, por ejemplo la pureza de células adecuadas para la expresión de un CAR. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que el rendimiento y la calidad mejorados de las células que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR mejoran la eficiencia de introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR y mejoran la expansión de la célula que expresa CAR resultante. En

consecuencia, los métodos y composiciones descritos en el presente documento mejoran productos celulares que expresan CAR para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto.

[0154] En un aspecto, la presente divulgación presenta métodos que eliminan materiales no deseados, células no objetivo o células que pueden afectar negativamente a la expresión de un CAR o la eficacia terapéutica de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los métodos presentados en el presente documento se pueden utilizar para eliminar o depletar uno o más de los siguientes: monocitos, granulocitos, glóbulos rojos, plaquetas, células B, células cancerosas, por ejemplo linfoblastos, crioprotector (de muestras congeladas), hemoglobina o desechos celulares. Por ejemplo, los métodos presentados en el presente documento se pueden utilizar para enriquecer o aumentar el número de uno o más de cualquiera de los siguientes: células T (células T CD4+ y/o CD8+), células NK, células dendríticas. La implementación de cada método descrito en el presente documento por separado o en combinación con cada uno o la totalidad de los métodos descritos en el presente documento da lugar a un material de partida mejorado adecuado para modificación por ingeniería genética para expresar un CAR.

[0155] Los materiales de aféresis frescos se utilizan comúnmente en la fabricación de células adecuadas para la expresión de un CAR. El uso de materiales de aféresis congelados, por ejemplo criopreservados, proporciona la ventaja de ser fácilmente transportables, eliminando así cualquier restricción en la proximidad de la ubicación del paciente a una instalación de fabricación de productos de células que expresan CAR, y permitiendo la industrialización del proceso de fabricación de células que expresan CAR y una mayor accesibilidad del producto terapéutico a pacientes que lo necesitan. Los métodos utilizados actualmente para la fabricación de células que expresan CAR están optimizados para el procesamiento de materiales de aféresis frescos y no se pueden utilizar para obtener una calidad o un rendimiento similares de células adecuadas para la expresión de CAR a partir de muestras de aféresis congeladas. Por el contrario, los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para procesar y fabricar células adecuadas para la expresión de CAR a partir de una muestra de aféresis congelada, por ejemplo criopreservada. En consecuencia, la presente invención proporciona un método de preparación de una población de células efectoras inmunitarias humanas (por ejemplo células T) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) según las reivindicaciones. En la invención, el material de partida está congelado, por ejemplo criopreservado, y el método incluye un paso de descongelación en el que se permite que las células congeladas se descongelen, por ejemplo, sin interferencia de un operario o un dispositivo para acelerar el proceso de descongelación, o las células congeladas se someten a un dispositivo o proceso que acelera el proceso de descongelación, por ejemplo mediante el uso de un dispositivo de descongelación, por ejemplo PlasmaTherm. El material descongelado tiene la misma temperatura que el entorno circundante, por ejemplo la misma temperatura que la temperatura ambiente de la habitación o la misma temperatura del tampón en el que se añade, se lava o se incuba el material descongelado. Los métodos son particularmente útiles para generar o enriquecer una población de células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR a partir de una muestra de entrada congelada o descongelada, por ejemplo una muestra de aféresis congelada o descongelada.

[0156] El proceso B, tal como se denomina en el presente documento, es un protocolo estándar para enriquecer células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR que se utiliza actualmente. El proceso B comprende la realización de una purificación por gradiente de densidad con Ficoll y una selección positiva utilizando Dynabeads CD3/CD28, en donde la muestra de entrada es material de aféresis fresco. Los métodos descritos en el presente documento proporcionan un mayor enriquecimiento, una calidad y un rendimiento mejorados de las células efectoras inmunitarias deseadas adecuadas para la expresión de un CAR.

[0157] Una célula efectora inmunitaria (por ejemplo célula T, célula NK), por ejemplo producida mediante cualquiera de los métodos de fabricación descritos en el presente documento, se puede modificar por ingeniería genética para expresar un CAR, en donde la célula efectora inmunitaria modificada por ingeniería genética exhibe una propiedad antitumoral. El CAR puede comprender un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. Un antígeno ejemplar es un antígeno asociado con el cáncer (por ejemplo antígeno tumoral) descrito en el presente documento. En un aspecto, una célula se transforma con el CAR y el CAR se expresa en la superficie celular. La célula (por ejemplo célula T, célula NK) se puede transducir con un vector viral que codifica un CAR. El vector viral puede ser un vector retroviral. El vector viral puede ser un vector lentiviral. La célula puede expresar establemente el CAR. La célula (por ejemplo célula T, célula NK) se puede transfectar con un ácido nucleico, por ejemplo ARNm, ADNc, ADN que codifica un CAR. En algunos de estos casos, la célula puede expresar el CAR transitoriamente.

[0158] Además, las composiciones de células que expresan CAR se pueden utilizar en medicamentos o métodos de tratamiento, entre otras enfermedades, de cáncer o cualquier neoplasia maligna o enfermedades autoinmunitarias que involucren células o tejidos que expresen un antígeno tumoral como se describe en el presente documento.

Elutriación

[0159] Los métodos de la invención presentan un método de elutriación que elimina las células no deseadas, por ejemplo monocitos y blastos, lo que da lugar a un enriquecimiento mejorado de células efectoras inmunitarias deseadas adecuadas para la expresión de CAR. En una realización, el método de elutriación de la invención se optimiza para el enriquecimiento de células efectoras inmunitarias deseadas adecuadas para la expresión de CAR de

una muestra previamente congelada, por ejemplo una muestra descongelada. En una realización, el método de elutriación descrito en el presente documento proporciona una preparación de células con pureza mejorada en comparación con una preparación de células recogidas a partir de los protocolos de elutriación conocidos en la técnica.

[0160] Con el fin de facilitar la logística de fabricación (recogida remota de muestras, envío, almacenamiento y programación de unidades de producción), la materia prima celular suele ser sangre entera criopreservada o materiales de aféresis que deben descongelarse antes del inicio de la fabricación. Sin embargo, la densidad y el tamaño de células de materiales congelados previamente descongelados son bastante diferentes de los de los materiales frescos. Como tal, el protocolo de elutriación estándar comúnmente utilizado para aislar células para diseñar la expresión de CAR falla en gran medida en la eliminación de monocitos, granulocitos o cualquier célula de mayor tamaño en la sangre entera criopreservada y descongelada o de los materiales de aféresis. Esta situación afecta negativamente al resultado de los siguientes pasos de fabricación de CART, lo que conduce a rendimientos deficientes, problemas de calidad del producto y desviaciones del proceso fuera de las especificaciones. Si bien la elutriación puede eliminar monocitos, no es eficiente para eliminar blastocitos, ya que los blastocitos tienen densidades y tamaños similares a los linfocitos T.

[0161] En una realización, el método de elutriación de la invención incluye el uso de una viscosidad optimizada de la muestra de partida mediante dilución con ciertas soluciones isotónicas (por ejemplo PBS) y el uso de una combinación optimizada de tasas de flujo y el volumen de recogida para cada fracción recogida mediante un dispositivo de elutriación.. En el Ejemplo 1 se describe un ejemplo del programa de elutriación modificada.

[0162] Los intervalos ejemplares de ajustes de elutriación para la separación de linfocitos, por ejemplo células T, de monocitos se proporcionan en la **Tabla** 4. Los ajustes para tasa de flujo, centrifugación y volumen para un programa de elutriación ejemplar se proporcionan también en la Tabla 4 en las columnas designadas "Ej.".

Tabla 4. Intervalo de ajustes de elutriación

Fracción	**Tasa de Flujo (mL/min)**		**Centrifugación (rpm)**		**Volumen (ml)**	
	Intervalo	Ej.	Intervalo	Ej.	Intervalo	Ej.
F1	30,0-50,0	30,0	1800-2400	2400	100-1000	900
F2	0,0-50,0	30,0	0-2400	2400	0-500	500
F3	50,0-80,0	70,0	1800-2400	2400	500-1000	975
F4	50,0-80,0	72,0	1800-2400	2400	500-1000	400
F5	80,0-150,0	82,0	0	0	0-500	250

[0163] En una realización se recogen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más fracciones del paso de elutriación. En una realización, se recogen cinco fracciones del paso de elutriación. En una realización en la que se recogen cinco fracciones, la tercera fracción (F3) o la cuarta fracción (F4), o una combinación de la tercera y la cuarta fracción, contiene la población de linfocitos deseada con la cantidad mínima de monocitos, granulocitos y otras células no linfocíticas. En una realización, cada fracción se recoge utilizando una diferente tasa de flujo. En una realización, para cada fracción, la tasa de flujo se aumenta a partir de la tasa de flujo utilizada para recoger la fracción previa. En una realización, se recogen una o más de las fracciones utilizando una diferente tasa de flujo.

[0164] En una realización, la elutriación se realiza utilizando una tasa de flujo de alrededor de 20-90 mL/min, de alrededor de 30-90 mL/min, de alrededor de 40-90 mL/min, de alrededor de 50-90 mL/min, de alrededor de 60-90 mL/min, de alrededor de 70-90 mL/min, de alrededor de 40-85 mL/min, de alrededor de 50-82 mL/min, de alrededor de 60-82 mL/min, de alrededor de 70-82 mL/min, de alrededor de 50-80 mL/min, de alrededor de 60-80 mL/min, de alrededor de 70-80 mL/min. En una realización, la elutriación se realiza utilizando un volumen de recogida de alrededor de 30-82 mL/min o alrededor de 50-80 mL/min. En una realización, la elutriación se realiza utilizando una tasa de flujo de alrededor de alrededor de 30, 40, 50, 60, 70, 72, 80 u 82 mL/min. En una realización, la elutriación se realiza utilizando un volumen de recogida de alrededor de 70 mL/min o alrededor de 72 mL/min.

[0165] En una realización, la tasa de flujo para la una o más fracciones que contienen la población de linfocitos deseada con la cantidad mínima de monocitos, granulocitos, otras células no linfocíticas y otros componentes no deseados es de alrededor de 20-90 mL/min, de alrededor de 30-90 mL/min, de alrededor de 40-90 mL/min, de alrededor de 50-90 mL/min, de alrededor de 60-90 mL/min, de alrededor de 70-90 mL/min, de alrededor de 40-85 mL/min, de alrededor de 50-82 mL/min, de alrededor de 60-82 mL/min, de alrededor de 70-82 mL/min, de alrededor de 50-80 mL/min, de alrededor de 60-80 mL/min, de alrededor de 70-80 mL/min. En una realización, la tasa de flujo para la una o más fracciones que contienen la población de linfocitos deseada es de alrededor de 50-82 mL/min, de alrededor de 50-80 mL/min, de alrededor de 60-82 mL/min, de alrededor de 60-80 mL/min, de alrededor de 70-82 mL/min, de alrededor de 70-80 mL/min, de alrededor de 70-75 mL/min, de alrededor de 70-72 mL/min. En una

realización, la tasa de flujo para la una o más fracciones que contienen la población de linfocitos deseada es alrededor de 70 mL/min o 72 mL/min.

[0166] En una realización, la elutriación se realiza utilizando un volumen de recogida de alrededor de 250-1250 mL, alrededor de 250-1000 mL, alrededor de 300-1000 mL, alrededor de 400-1000 mL, alrededor de 500-1000 mL, alrededor de 600-1000 mL, alrededor de 700-1000 mL, alrededor de 800-1000 mL, alrededor de 900-1000 mL, alrededor de 250-975 mL, alrededor de 300-975 mL, alrededor de 400-975 mL, alrededor de 500-975 mL, alrededor de 600-975 mL, alrededor de 700-975 mL, alrededor de 800-975 ml, alrededor de 300-900 mL, alrededor de 300-800 mL, alrededor de 300-700 mL, alrededor de 300-600 mL, alrededor de 300-500 mL o alrededor de 300-400 mL. En una realización, la elutriación se realiza utilizando un volumen de recogida de alrededor de 250, 400, 500, 900 o 975 mL. En una realización, la elutriación se realiza utilizando un volumen de recogida de alrededor de 400 mL o alrededor de 975 mL.

[0167] En una realización, el volumen de recogida para la una o más fracciones que contienen la población de linfocitos deseada con la cantidad mínima de monocitos, granulocitos, otras células no linfocíticas y otros componentes no deseados es de alrededor de 250-1250 mL, alrededor de 250-1000 mL, alrededor de 300-1000 mL, alrededor de 400-1000 mL, alrededor de 500-1000 mL, alrededor de 600-1000 mL, alrededor de 700-1000 mL, alrededor de 800-1000 mL, alrededor de 900-1000 mL, alrededor de 250-975 mL, alrededor de 300-975 mL, alrededor de 400-975 mL, alrededor de 500-975 mL, alrededor de 600-975 mL, alrededor de 700-975 mL, alrededor de 800-975 ml, alrededor de 300-900 mL, alrededor de 300-800 mL, alrededor de 300-700 mL, alrededor de 300-600 mL, alrededor de 300-500 mL o alrededor de 300-400 mL. En una realización, el volumen de recogida para la una o más fracciones que contienen la población de linfocitos deseada es alrededor de 250, 400, 500, 900 o 975 mL. En una realización, el volumen de recogida para la una o más fracciones que contienen la población de linfocitos deseada es alrededor de 400 mL o alrededor de 975 mL.

[0168] En una realización, el método de elutriación descrito en el presente documento se realiza mediante un dispositivo de elutriación. Por ejemplo, el dispositivo de elutriación es el Sistema de Separación Celular Caridian BCT ElutraTM (Terumo BCT Model 71800). El Sistema de Separación Celular Caridian BCT ElutraTM (Terumo BCT Model 71800) es un sistema cerrado que utiliza tecnología de elutriación de flujo continuo para realizar la separación celular basada principalmente en el tamaño y en segundo lugar en la gravedad específica. Las fuerzas opuestas generadas por el flujo de medios hacia la cámara de separación y la velocidad de sedimentación creada por la fuerza centrífuga hacen que las células se organicen por tamaño y densidad dentro de la cámara de separación, donde se sifonan automáticamente a las bolsas de recogida. Los ajustes de Elutra personalizados están diseñados para permitir la distribución de linfocitos y monocitos combinados con granulocitos en diferentes fracciones. El Elutra puede funcionar según las instrucciones del fabricante.

Centrifugación por Gradiente de Densidad

[0169] La fabricación de células adoptivas requiere el procesamiento de las células deseadas, por ejemplo las células efectoras inmunitarias, lejos de una mezcla compleja de células sanguíneas y elementos sanguíneos presentes en los materiales de partida de la aféresis de sangre periférica. Las muestras de linfocitos derivados de sangre periférica se han aislado con éxito utilizando centrifugación por gradiente de densidad a través de solución de Ficoll. Sin embargo, Ficoll no es un reactivo preferente para aislar células para uso terapéutico, ya que Ficoll no está cualificado para uso clínico. Además, Ficoll contiene glicol, que tiene un potencial tóxico para las células. Además, la centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll de productos de aféresis descongelados tras criopreservación proporciona un producto de células T subóptimo, por ejemplo como se describe en los Ejemplos del presente documento. Por ejemplo, en preparaciones celulares aisladas mediante centrifugación por gradiente de densidad a través de solución de Ficoll se observó una pérdida de células T en el producto final con una ganancia relativa de células no T, especialmente células B, blastocitos y monocitos.

[0170] Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que las células efectoras inmunitarias, por ejemplo las células T, se deshidratan durante la criopreservación para volverse más densas que las células frescas. Sin desear ceñirse a la teoría, también se cree que las células efectoras inmunitarias, por ejemplo las células T, permanecen más densas que las otras células sanguíneas y, por lo tanto, se pierden más fácilmente durante la separación por gradiente de densidad de Ficoll en comparación con otras células. En consecuencia, sin desear ceñirse a la teoría, se cree que un medio con una densidad mayor que Ficoll proporciona un aislamiento mejorado de células efectoras inmunitarias deseadas en comparación con Ficoll u otros medios con la misma densidad que Ficoll, por ejemplo 1,077 g/mL.

[0171] En una realización, el método de la invención comprende además realizar la centrifugación por gradiente de densidad utilizando un medio que comprende iodixanol. En una realización, el medio de gradiente de densidad comprende alrededor de 60% de iodixanol en agua.

[0172] En una realización, el método de centrifugación por gradiente de densidad incluye el uso de un medio de gradiente de densidad que tiene una densidad mayor que Ficoll. En una realización, el método de centrifugación por gradiente de densidad incluye el uso de un medio de gradiente de densidad que tiene una densidad mayor que 1,077 g/mL, por ejemplo mayor que 1,077 g/mL, mayor que 1,1 g/mL, mayor que 1,15 g/mL, mayor que 1,2 g/mL, mayor que

1,25 g/mL, mayor que 1,3 g/mL, mayor que 1,31 g/mL. En una realización, el medio de gradiente de densidad tiene una densidad de alrededor de 1,32 g/mL.

[0173] En una realización, el método de centrifugación por gradiente de densidad incluye el uso de un medio de gradiente de densidad que comprende iodixanol, por ejemplo alrededor de 60% de iodixanol en agua, y tiene un densidad mayor que Ficoll, por ejemplo mayor que 1,077 g/mL, por ejemplo alrededor de 1,32 g/mL. En una realización, el método de centrifugación por gradiente de densidad incluye el uso de un medio de gradiente de densidad OptiPrep™ (Sigma). OptiPrep™ es una solución preparada para usar, estéril y probada de 60% (p/v) de iodixanol, con una densidad de 1,320 ± 0,001 g/ml. Por el contrario, la solución de gradiente de densidad de Ficoll tiene una densidad de solo 1,077 g/ml. Otra ventaja de OptiPrep™ sobre Ficoll es que OptiPrep™ está disponible en grado GMP y, por lo tanto, está calificado para uso terapéutico.

[0174] Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la utilización del paso de centrifugación por gradiente de densidad de OptiPrep, por ejemplo con material de aféresis descongelado, tiene menos probabilidades de retener células B y monocitos indeseables, por lo que se cree que mejora aún más la recogida de células efectoras inmunitarias diana deseadas, por ejemplo células T, para los posteriores pasos de activación y transducción. En consecuencia, sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la mayor densidad de OptiPrep en comparación con Ficoll permite tanto una purificación y recuperación potenciadas de células efectoras inmunitarias deseadas, por ejemplo células T, como la eliminación concomitante de tipos de células de T indeseables que, de otro modo, pueden interferir en los resultados consistentemente exitosos en la fabricación de productos de células efectoras inmunitarias que expresan CAR, por ejemplo células T.

[0175] En una realización, la centrifugación por gradiente de densidad se realiza utilizando un dispositivo de separación celular. Ejemplos de dispositivos de separación celular incluyen el Sepax2 (Biosafe). En realizaciones donde se realiza un paso de lavado, por ejemplo un paso de lavado mejorado como se describe en el presente documento, por ejemplo antes o después del paso de centrifugación por gradiente de densidad, el paso de lavado se puede realizar utilizando el mismo dispositivo utilizado en el paso de centrifugación por gradiente de densidad.

Enriquecimiento por Selección

[0176] En el presente documento también se divulgan métodos para la selección de células específicas para mejorar el enriquecimiento de las células efectoras inmunitarias deseada adecuadas para la expresión de CAR. La selección puede comprender una selección positiva, por ejemplo selección de las células efectoras inmunitarias deseadas. La selección puede comprender una selección negativa, por ejemplo selección de células no deseadas, por ejemplo eliminación de células no deseadas. Los métodos de selección positiva o negativa descritos en el presente documento se pueden realizar en condiciones de flujo, por ejemplo mediante uso de un dispositivo de flujo continuo, por ejemplo un dispositivo de flujo continuo descrito en el presente documento.

[0177] Los actuales métodos de selección, por ejemplo selección positiva, por ejemplo utilizando Dynabeads® CD3/CD28 CTS™, se pueden optimizar adicionalmente para el enriquecimiento. En primer lugar, la cantidad de Dynabeads utilizada durante la selección no se basa normalmente en el porcentaje de células CD45+/3+, por ejemplo células CD45+/3+, presentes en la centrifugación por gradientes de post-densidad, por ejemplo en la muestra de Sepax Ficoll, sino que se basa en el porcentaje de células, por ejemplo células CD45+/3+, presentes en el material del paciente original. Dado el cambio significativo en la composición causado por el paso de centrifugación por gradiente de densidad, por ejemplo el procedimiento de separación Sepax Ficoll, este cálculo da como resultado normalmente una disminución en el porcentaje de células T y un aumento en el contenido de monocitos. En segundo lugar, el tiempo de incubación de dos horas ofrece amplias oportunidades tanto para la unión inespecífica de Dynabeads® a células no diana (es decir, células no CD3 y/o no CD28) como para la absorción de perlas por células no objetivo a través de endocitosis (por ejemplo monocitos), cuestiones que pueden comprometer el rendimiento y la pureza de las células T en el producto de selección positiva. Finalmente, el aparato magnético y la operación utilizados para la selección pueden ser subóptimos. Actualmente, la separación magnética se produce dentro de un gran volumen de fluido (200 ml), que a su vez da como resultado una gran distancia entre células marcadas magnéticamente y superficies magnéticas. Esto limita la fuerza magnética disponible para la separación, lo que reduce la sensibilidad de separación y requiere tiempos de separación mucho más largos. Además, la separación magnética se realiza actualmente de manera estadística, con la muestra colocada sobre la superficie magnética durante 5 minutos antes de la eliminación de la fracción negativa. Un tiempo de separación tan prolongado es perjudicial para las células, cuya viabilidad se ve afectada negativamente con frecuencia durante el procedimiento debido a efectos de "acumulación" y proporciona oportunidades adicionales para que las células no diana no unan o internalicen las perlas.

[0178] En contraste con los actuales métodos de selección, los métodos de selección descritos en el presente documento incluyen una separación que se produce "dinámicamente", por ejemplo en condiciones de flujo, en oposición al actual procedimiento de separación "estático". En una realización, la separación en condiciones de flujo comprende un reactivo de separación magnética, por ejemplo perlas magnéticas que se unen selectivamente a un antígeno diana, una muestra de salida y un imán, en donde el reactivo de separación magnética y la muestra de entrada pasan, por ejemplo fluyen sobre un imán. En ciertas realizaciones, el reactivo de separación magnética y la

muestra de entrada pasa, por ejemplo fluye sobre el imán continuamente. Sin ceñirse a la teoría, esta técnica dinámica permite la reducción del tiempo de incubación (es decir, la puesta en contacto de la muestra con el reactivo de separación) y del tiempo de separación, minimizando así los impactos negativos en las células diana y reduciendo significativamente la probabilidad de unión no específica y/o la absorción de perlas por parte de poblaciones no diana. Además, los métodos de selección descritos en el presente documento no requieren ninguna modificación en los reactivos de selección (Dynabeads® CD3/CD28 CTS™) o en la cantidad de reactivos utilizados para la selección (relación perla a célula T de 3 a 1).

[0179] En una realización, la separación o la selección en condiciones de flujo, como se describe en el presente documento, comprende el protocolo de Técnica de Selección basada en Anticuerpos de Flujo Continuo (FAST). La **Tabla 12** exhibe una descripción general de los parámetros que difieren entre la actual técnica de selección y el protocolo FAST.

Tabla 12: Comparación entre la actual selección positiva y la selección positiva FAST

Parámetros sin cambios	**Parámetros modificados**
Reactivos (CD3/28 Dynabeads CTS)	Tiempo de incubación (de 2 h a 20 min)
Relación perla a célula T (3:1)	Kit de enriquecimiento de flujo continuo en lugar de configuración estática (Figura 20)
Placa magnética (DynaMag CTS, imán plano)	Tapa de plástico para placa magnética (véase la Figura 21)

[0180] En una realización, el método de selección comprende un periodo de incubación más corto que los actuales protocolos estándar del reactivo de separación y la muestra de entrada, seguido de separación magnética. En una realización, el periodo de incubación es menos de 2 horas, por ejemplo menos de 110 minutos, menos de 100 minutos, menos de 90 minutos, menos de 80 minutos, menos de 70 minutos, menos de 60 minutos, menos de 50 minutos, menos de 40 minutos, menos de 30 minutos, menos de 25 minutos, menos de 20 minutos, menos de 15 minutos, menos de 10 minutos o menos de 5 minutos. En una realización, la incubación se realiza bajo rotación suave.

[0181] En la **Figura 20** se muestra un kit ejemplar para el método de selección descrito en el presente documento. En una realización, el kit comprende un conjunto de tres bolsas que se pueden conectar a bolsas de muestra/tampón adicionales a través de púas o través de soldadura estéril. Además, en la separación se emplea una tapa DynaMag modificada, que se muestra en la **Figura 21,** que limita el volumen máximo durante la separación a un volumen bajo, por ejemplo menos de 100 mL, menos de 90 mL menos de 80 mL, menos de 70 mL, menos de 60 mL, menos de 50 mL, menos de 40 ml, por ejemplo alrededor de 50 ml. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que el bajo volumen utilizado durante la separación optimiza las fuerzas magnéticas que actúan durante el procedimiento de separación y minimiza los tiempos de separación. La tapa DynaMag modificada también limita la distancia máxima a la que los conjugados perla:célula se desplazan del imán y estandariza el imán para la experiencia durante la selección de posición.

[0182] En una realización, una o más de las bolsas del kit descrito en el presente documento es una bolsa triangular. En una realización, la bolsa de selección es una bolsa triangular y permite la separación magnética en modo de "flujo continuo", ya que la bolsa proporciona puertos en extremos opuestos de la bolsa de selección. En tales realizaciones, las células pueden fluir sobre un elemento magnético (por ejemplo una placa magnética como la DynaMag), permitiendo de este modo la separación en tiempo real de partículas marcadas magnéticamente, mientras que las células no marcadas no serán atraídas por el campo magnético y fluirán hacia fuera. Esta configuración de flujo continuo hace que el sistema sea especialmente susceptible de automatización. La bolsa de separación modificada requiere la tapa modificada de la **Figura 21** para acomodar los puertos adicionales.

[0183] En una realización, la bolsa de selección no es una bolsa triangular. En la realización en la que la bolsa de selección no es una bolsa triangular, el periodo de incubación es menos de 2 horas, por ejemplo menos de 110 minutos, menos de 100 minutos, menos de 90 minutos, menos de 80 minutos, menos de 70 minutos, menos de 60 minutos, menos de 50 minutos, menos de 40 minutos, menos de 30 minutos, menos de 25 minutos, menos de 20 minutos, menos de 15 minutos, menos de 10 minutos o menos de 5 minutos.

Selección Positiva

[0184] Los métodos de selección positiva descritos en el presente documento pueden comprender la selección, por ejemplo para enriquecimiento de las células efectoras inmunitarias deseadas. En una realización, los métodos de selección positiva comprenden la selección de células CD3+/CD28+. Los métodos de selección positiva descritos en el presente documento pueden comprender además la selección de una o más de las siguientes: células CD3+, células CD28+, células CD4+, células CD8+ o células CD45+.

[0185] Los reactivos de separación utilizados en los métodos de selección descritos en el presente documento comprenden un miembro magnético o paramagnético y un miembro de unión a antígeno. En una realización, el reactivo de separación comprende una perla, por ejemplo que tiene propiedades magnéticas o paramagnéticas, que está acoplada (por ejemplo covalentemente o no covalentemente) a un miembro de unión a antígeno. En una realización, el miembro de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo. En una realización, el reactivo de separación utilizado en la selección positiva para células CD3+/CD28+ comprende una perla que está acoplada (por ejemplo covalentemente o no covalentemente) a un miembro de unión a CD3 y/o CD28, por ejemplo un anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 o un fragmento de anticuerpo.

Selección Negativa

[0186] En el presente documento también se divulgan métodos de selección negativa para la selección negativa o la depleción de muestra de entrada de células no deseadas, por ejemplo monocitos, granulocitos, glóbulos rojos, plaquetas y células B, enriqueciendo de este modo la muestra de salida resultante con las células efectores inmunitarias deseadas, por ejemplo células T. Los métodos de selección negativa descritos en el presente documento se pueden realizar en condiciones de flujo, por ejemplo mediante uso de un dispositivo de flujo continuo, por ejemplo un dispositivo de flujo continuo descrito en el presente documento.

[0187] Los métodos de selección negativa descritos en el presente documento pueden comprender la selección negativa de uno o más monocitos, granulocitos, glóbulos rojos, plaquetas, células B o células cancerosas, por ejemplo linfoblastos.

[0188] Cuando se desea la depleción o la eliminación de uno o más monocitos, granulocitos, glóbulos rojos, plaquetas o células B, el método de selección negativa selecciona una célula que expresa una o más de los siguientes: CD19, CD25, CD14 u otro marcador de superficie o proteína expresada por un monocito, granulocito, glóbulo rojo, plaqueta o célula B.

[0189] Cuando el sujeto tiene un cáncer hematológico, las células cancerosas pueden estar presentes en las muestras de aféresis y puede ser deseable la eliminación de células cancerosas. El método de selección negativa descrito en el presente documento puede comprender la selección negativa de una célula CD19+, por ejemplo un linfoblasto. El método de selección negativa descrito en el presente documento puede comprender además la selección de una célula cancerosa que expresa una o más de las siguientes: CD19, CD33, CD 123, CLL-1, BCMA, ROR1 o FLT3.

[0190] Los reactivos de separación utilizados en los métodos de selección descritos en el presente documento comprenden un miembro magnético o paramagnético y un miembro de unión a antígeno. En una realización, el reactivo de separación comprende una perla, por ejemplo que tiene propiedades magnéticas o paramagnéticas, que está acoplada (por ejemplo covalentemente o no covalentemente) a un miembro de unión a antígeno. El miembro de unión a antígeno puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo. El reactivo de separación utilizado en la selección negativa para células CD19+ puede comprender una perla que está acoplada (por ejemplo covalentemente o no covalentemente) a un miembro de unión a CD19, por ejemplo un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de anticuerpo. El reactivo de separación utilizado en la selección negativa para células CD14+ comprende una perla que está acoplada (por ejemplo covalentemente o no covalentemente) a un miembro de unión a CD14, por ejemplo un anticuerpo anti-CD14 o un fragmento de anticuerpo. El reactivo de separación utilizado en la selección negativa para células CD25+ comprende una perla que está acoplada (por ejemplo covalentemente o no covalentemente) a un miembro de unión a CD25, por ejemplo un anticuerpo anti-CD25 o un fragmento de anticuerpo.

Dispositivo de Flujo-Continuo Ejemplar

[0191] Tal como se describe en el presente documento, los métodos de selección se pueden realizar en condiciones de flujo, por ejemplo mediante uso de un dispositivo de flujo continuo, también denominado sistema de procesamiento celular, para enriquecer adicionalmente una preparación de células para células efectoras inmunitarias deseadas, por ejemplo células T, adecuadas para la expresión de CAR. En esta sección se describe un dispositivo de flujo continuo ejemplar para uso en tales métodos de selección bajo condiciones de flujo.

[0192] En una realización, el sistema de procesamiento celular que incluye al menos un módulo de suspensión celular; al menos un módulo de tampón; al menos un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo; al menos un módulo de salida no magnética; y al menos un módulo de salida magnética.

[0193] En algunas variaciones de este sistema, este puede incluir al menos un bucle de retorno que retorne aguas arriba de al menos un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo; al menos dos módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en paralelo; al menos dos módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo en serie, al menos un módulo adicional o cualquier combinación de los mismos. El al menos un módulo adicional puede incluir al menos un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria; al menos dos módulos de eliminación de perlas de membrana giratoria en paralelo; o al menos dos módulos de eliminación de perlas de membrana giratoria en serie. Cualquiera de los módulos de eliminación de perlas de membrana giratoria puede incluir al menos un imán adyacente o próximo a una pared lateral cilíndrica.

[0194] En una variación más específica, el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo incluye una cámara definida por paredes y que tiene una dirección x, una dirección y y una dirección z; una entrada y una salida dispuestas en extremos opuestos de la cámara en la dirección y; y al menos dos imanes adyacentes o próximos a una pared de la cámara y dispuestos para establecer una línea de gradiente cero dentro de la cámara entre la entrada y la salida.

[0195] En otra variación más específica, que puede ser independiente o combinarse con la primera variación más específica, el módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria incluye una cámara de eliminación de perlas definida parcialmente por una pared lateral cilíndrica; una membrana giratoria porosa que tiene un interior y está orientada coaxialmente con la pared lateral cilíndrica; una entrada de muestra; un módulo de salida de residuos conectado al interior de la membrana giratoria; y un módulo de salida de células conectado a la cámara de eliminación de perlas.

[0196] En otra realización, el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo incluye una cámara definida por paredes y que tiene una dirección x, una dirección y y una dirección z; una entrada y una salida dispuestas en extremos opuestos de la cámara en la dirección y; al menos dos imanes adyacentes o próximos a una pared de la cámara y dispuestos para establecer una línea de gradiente cero dentro de la cámara entre la entrada y la salida.

[0197] En algunas variaciones de este módulo, incluye al menos dos entradas y al menos dos salidas;
al menos tres imanes adyacentes o próximos a una pared de la cámara y dispuestos para establecer al menos dos líneas de gradiente cero dentro de la cámara entre la entrada y la salida; al menos cuatro imanes dispuestos en dos conjuntos en lados opuestos de la cámara en la dirección z; al menos cuatro imanes dispuestos en dos conjuntos en lados opuestos de la cámara en la dirección z y en orientación cruzada en el plano x-y desde cerca de una entrada hasta cerca de una salida en el lado opuesto de la cámara en la dirección z; un puerto de inyección de submembrana adyacente a una pared de la cámara y también adyacentes al menos dos imanes y una membrana adyacente a la submembrana; o cualquier combinación de los mismos.

[0198] En otra realización, un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria incluye una cámara de eliminación de perlas definida parcialmente por una pared lateral cilíndrica; una membrana giratoria porosa que tiene un interior y está orientada coaxialmente con la pared lateral cilíndrica; una entrada de muestra; un módulo de salida de residuos conectado al interior de la membrana giratoria; un módulo de salida de células conectado a la cámara de eliminación de perlas; y al menos un imán adyacente o próximo a la pared lateral cilíndrica.

[0199] En algunas variaciones de este módulo, puede incluir un módulo de reactivo, tener un tamaño de poro mayor que el de una partícula a liberar de perlas y menor que el de una célula a liberar de perlas, o ambos.

[0200] En otra realización, el método de procesamiento celular de flujo continuo incluye el flujo de una suspensión celular que comprende células unidas a partículas paramagnéticas a través de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo para producir un producto celular no unido. Las células unidas a partículas paramagnéticas continúan moviéndose en el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo a través del paso de flujo. El módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo incluye una cámara de flujo definida por paredes a través de las cuales fluye la suspensión celular y al menos dos imanes dispuestos adyacentes o próximos al menos a una pared.

[0201] En algunas variaciones de este método, la suspensión celular fluye laminarmente a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo; la suspensión celular incluye además células no unidas y el flujo de la suspensión celular a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo separa las células unidas a partículas paramagnéticas y las células no unidas; la suspensión celular incluye además partículas paramagnéticas y el flujo de la suspensión celular a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo separa las partículas paramagnéticas libres y las células no unidas, o cualquier combinación de los mismos.

[0202] Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además el flujo de las células no unidas separadas a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo una segunda o siguiente vez utilizando un bucle de retorno; flujo de las células unidas a partículas paramagnéticas separadas a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo una segunda o siguiente vez utilizando un bucle de retorno; eliminación de perlas de las células unidas a partículas paramagnéticas en el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo durante la segunda o siguiente vez para producir partículas paramagnéticas y células liberadas de perlas no unidas; flujo de las partículas paramagnéticas producidas y células liberadas de perlas no unidas a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo una tercera o siguiente vez para separar las partículas paramagnéticas y las células liberadas de perlas no unidas, o cualquier combinación de los mismos.

[0203] En otra variación, combinable con todas las demás, los imanes están orientados para establecer una línea de gradiente cero que cruza la dirección del flujo, de modo que las células unidas a partículas paramagnéticas son atraídas hacia la línea de gradiente cero en una sola dirección, pero no se ven afectadas por fuerzas magnéticas de los imanes en otras dos direcciones.

[0204] En otra variación, combinable con todas las demás, la cámara incluye además una entrada magnética a través de la cual cualquier partícula paramagnética entra en la cámara de flujo; una entrada no magnética; una salida magnética opuesta a la entrada no magnética; y una salida no magnética opuesta a la entrada magnética, en donde la línea de gradiente cero dirige todas las partículas paramagnéticas y cualquier célula unida a partículas paramagnéticas a la salida magnética.

[0205] La suspensión celular puede incluir además células no unidas y la entrada no magnética puede ser más grande que la entrada magnética, mientras que la salida no magnética es más grande que la salida magnética, de modo que el fluido de la entrada no magnética cruza a la salida no magnética, evitando que cualquier célula no unida fluya hacia la salida magnética.

[0206] Alternativamente, la suspensión celular puede incluir además células no unidas, y la entrada no magnética y la entrada pueden ser sustancialmente del mismo tamaño o la salida no magnética y la salida magnética pueden ser sustancialmente del mismo tamaño, o ambas, y las respectivas tasas de flujo del fluido que entra en las entradas, las respectivas tasas de flujo del fluido que sale por las salidas, o ambas, se pueden ajustar de modo que el fluido que fluye de la entrada no magnética cruce a través de la salida no magnética, evitando que las células no unidas fluyan hacia la salida magnética.

[0207] En otra variación, combinable con todas las demás, el método puede incluir el flujo de las células unidas a partículas paramagnéticas a través de un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria para producir el producto de células no unidas. El módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria puede incluir una cámara de eliminación de perlas cilíndrica, a través de la cual fluyen las células unidas a partículas paramagnéticas, la cámara definida en parte por una pared lateral cilíndrica y que contiene una membrana giratoria coaxial; y al menos un imán dispuesto en posición adyacente o próximo a la pared lateral cilíndrica para establecer al menos una línea de gradiente cero dentro de la cámara de eliminación de perlas cilíndrica.

[0208] La presente divulgación se refiere a sistemas y métodos para la separación, eliminación de perlas, separación de partículas paramagnéticas o cualquier combinación de los mismos de células unidas a partículas paramagnéticas o células no unidas en presencia de partículas paramagnéticas, en una suspensión celular. Los sistemas y métodos utilizan un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo, un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria o ambos. Aunque los sistemas y métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para eliminar partículas paramagnéticas de cualquier tipo de célula, están particularmente bien adaptados para uso en la eliminación de partículas paramagnéticas de células a utilizar en la terapia celular. Además, aunque algunas partes de la descripción se centran en la selección positiva de células unidas a partículas paramagnéticas, ya que la eliminación de perlas solo se realiza normalmente durante métodos de selección positiva, los sistemas y métodos también se pueden utilizar para selección negativa. Cuando se utilizan para selección negativa, normalmente se eliminarán módulos y pasos de eliminación de perlas.

Sistemas y Módulos de Separación y Eliminación de Perlas

[0209] La FIG. 1A es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular 2 para separación de flujo continuo, eliminación de perlas, separación de partículas paramagnéticas o cualquier combinación de las mismas de células unidas a partículas paramagnéticas en una suspensión celular. El sistema 2 incluye módulo de suspensión celular 4, módulo de tampón 6, módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8, módulo de salida no magnética 10 y módulo de salida magnética 12. El sistema 2 también puede incluir opcionalmente al menos un módulo adicional 16, al menos un bucle de retorno 14, o ambos.

[0210] El sistema 2 puede incluir adicionalmente conductos de fluidos, como tubos o mangueras, conectores, válvulas, interruptores, abrazaderas, sitios de soldadura, carcasas, motores, bombas, otros mecanismos mecánicos, circuitos, dispositivos de seguimiento y dispositivos de control. El sistema 2 puede incluir además un ordenador programado para controlar el sistema 2 o cualquier componente del mismo para realizar un proceso de separación de flujo continuo, un proceso de eliminación de perlas de flujo continuo, un proceso de separación de partículas paramagnéticas de flujo continuo, o cualquier combinación de los mismos.

[0211] El sistema 2 puede tener una configuración estática o puede tener una configuración adaptable. Una configuración adaptable puede permitir el intercambio de módulos o la inserción de módulos adicionales. Otra configuración adaptable puede tener un conjunto inalterable de módulos, pero puede permitir cambios en el enrutamiento de fluidos a al menos uno de los módulos. Otras configuraciones adaptables pueden permitir tanto el intercambio como la adición de módulos, así como cambios en el enrutamiento de fluidos. Los componentes del sistema 2 pueden facilitar la configuración adaptable. Por ejemplo, un ordenador programado en el sistema 2 puede detectar o usar información sobre qué módulos están presentes o puede controlar el enrutamiento de fluidos. Además,

el sistema 2 puede tener carcasas o conductos de fluidos con conectores acompañantes, válvulas, abrazaderas o interruptores que permitan la extracción o la inserción de diferentes módulos en la misma ubicación. Los módulos u otros componentes pueden contener elementos de identificación, como códigos de barras o chips de identificación por radiofrecuencia (RFID), para permitir que su presencia o ausencia se detecte automáticamente. Los módulos u otros componentes también pueden contener uno o más elementos de indicación, que pueden garantizar el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación y otras normas de seguridad. Por ejemplo, los elementos de indicación sensibles a la temperatura pueden indicar que un módulo u otro componente ha sido esterilizado térmicamente o no se ha sometido a una temperatura que pueda comprometer su integridad o efectividad. Los elementos de indicación también pueden identificar claramente los módulos u otros componentes utilizados. Los elementos de indicación también se pueden detectar automáticamente por el sistema 2, lo que ayuda a minimizar el error humano.

[0212] Los componentes del sistema 2 no requeridos para un proceso particular pueden estar ausentes, desconectados o cerrados. Por ejemplo, puede estar presente un único módulo de salida en lugar de un módulo de salida no magnética separado 10 y un módulo de salida magnética 12, como se muestra en la FIG. 1H. Además, también como se ilustra en la FIG. 1H, los componentes del sistema 2 pueden tener conductos de fluido con rutas y conexiones diferentes que las que se muestran en la FIG. 1A, dependiendo de la configuración de válvulas, abrazaderas, sitios de soldadura, interruptores y conectores.

[0213] El módulo de suspensión celular 4 contiene células a separar o a liberar de perlas suspendidas en un fluido de suspensión. Si las células se van a separar, normalmente la suspensión celular contiene tanto células unidas a partículas paramagnéticas como células no unidas. Las células unidas a partículas paramagnéticas pueden ser las células deseables, en cuyo caso se producirá selección positiva para células unidas a partículas paramagnéticas en el sistema 2, o las células unidas a partículas paramagnéticas pueden ser indeseables, en cuyo caso se producirá selección negativa para las células unidas a partículas paramagnéticas.

[0214] Si las células se van a liberar de perlas o si las partículas paramagnéticas se van a separar de las células, las células unidas a partículas paramagnéticas son células deseables. Estas se pueden haber separado previamente de células indeseables utilizando el sistema 2 u otro sistema. En casos en donde la presencia de células indeseables no es problemática o donde no hay células indeseables a separar, las células que se van a liberar de perlas pueden no haberse sometido previamente a un proceso de separación.

[0215] Las células se pueden haber obtenido directamente de una muestra biológica, como sangre, o de un cultivo celular.

[0216] El fluido de suspensión puede ser cualquier fluido capaz de apoyar la viabilidad de las células durante todo el proceso de separación, eliminación de perlas o eliminación de partículas. Por ejemplo, puede ser un medio de cultivo, un agente de congelación, como un fluido que contiene DMSO, otro fluido con un pH establecido o controlado u otro fluido con nutrientes. También puede ser un tampón, que puede ser el mismo o diferente del tampón del módulo de tampón 6. El fluido de suspensión puede tener una viscosidad diferente que el tampón. También puede tener una viscosidad diferente que el medio en el que las células entran en el sistema 2, que puede ser muy denso, como Ficoll de alta densidad.

[0217] El tampón en el módulo de tampón 6 puede ser cualquier fluido que se pueda combinar con el fluido de suspensión mientras se permite que el fluido de suspensión continúe apoyando la viabilidad de las células. Por ejemplo, el tampón puede tener un pH establecido o controlado. El tampón puede incluir una o más sales compatibles. Aunque el tampón se proporciona por separado en el módulo de tampón 6, una vez que el tampón se mezcla con la suspensión celular, se considera parte del fluido de suspensión.

[0218] El fluido de suspensión o el tampón puede contener agentes antimicrobianos, pero normalmente no lo hará si las células se van a proporcionar posteriormente a un paciente, a menos que el sistema 2 elimine estos agentes, como a través de un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria u otro módulo, o a menos que se eliminen posteriormente mediante un proceso, módulo o sistema adicional.

[0219] Las partículas paramagnéticas se pueden formar a partir de cualquier material paramagnético y/o magnetizable, como metal o aleación metálica. Normalmente, el material paramagnético no es tóxico para las células ni para ningún paciente que recibirá las células posteriormente, o está revestido para evitar toxicidad. El material paramagnético se puede seleccionar para obtener un elevado flujo de saturación magnética (m_s). En general, los materiales paramagnéticos adecuados están influenciados por los imanes utilizados en el sistema 2 y la configuración de módulos utilizando los imanes, ya que estos elementos influyen llevando al material paramagnético a la saturación magnética.

[0220] Las partículas paramagnéticas pueden estar revestidas con un agente de unión, como un agente de crecimiento, un receptor o ligando, un antígeno, un anticuerpo o cualquier fragmento de unión o variante quimérica del mismo, como un ligando receptor de antígeno quimérico. Los agentes de unión pueden ser reversibles en algunos casos, permitiendo el desprendimiento de las partículas para magnéticas de manera espontánea o utilizando un agente químico particular. Los agentes de unión también pueden incluir un engarce fotoescindible, en cuyo caso el sistema 2 puede incluir una fuente de luz, particularmente una fuente de luz de alta potencia, como un módulo o como parte de

otro módulo para permitir la fotoescisión del engarce y la separación de la célula y la partícula paramagnética. En algunos casos, el revestimiento puede interaccionar con las células. En otros casos, el revestimiento puede interaccionar con al menos un constituyente no deseado de la suspensión celular que se va a eliminar. El constituyente no deseado puede estar activo o inactivo y puede haber cumplido previamente una función útil respecto a las células o al fluido de suspensión celular. Ejemplos de constituyentes no deseados incluyen anticuerpos, factores de crecimiento, otras proteínas y polímeros.

[0221] En algunas suspensiones celulares pueden estar presentes diferentes tipos de partículas paramagnéticas, como partículas con diferentes agentes de unión o formados a partir de diferentes materiales magnéticos, permitiendo separaciones complejas o la eliminación iterativa de agentes de unión. Adicionalmente, también pueden unirse a las células partículas no paramagnéticas, que también pueden estar revestidas con cualquier agente de unión.

[0222] Otras partículas que no son paramagnéticas pueden estar también presentes en la suspensión celular y pueden revestirse con cualquier cosa utilizada para revestir las partículas paramagnéticas.

[0223] Los módulos pueden estar formados o revestidos con cualquier material biológicamente compatible, como bolsas de almacenamiento de células. Los conductos de fluido y cualquier otro componente del sistema 2 que entre en contacto con la suspensión celular o el tampón también pueden estar formados o revestidos con cualquier material biológicamente compatible.

[0224] Los componentes del sistema 2 que entrarán en contacto con la suspensión celular o el tampón pueden ser estériles antes del contacto con la suspensión celular.

[0225] Los componentes del sistema 2 pueden ser desechables. Los componentes que entran en contacto con la suspensión celular, en particular, pueden ser desechables para evitar problemas de contaminación y esterilidad.

[0226] La FIG. 2A es un diagrama esquemático en sección transversal del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 en una configuración de imán orientada a x, mientras que FIG. 2B es un diagrama esquemático tridimensional semitransparente del mismo módulo de separación magnética 8 en la misma configuración. El módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 incluye una cámara de flujo 50, definida por paredes 52. Los imanes dipolares externos 54 crean líneas de fuerza magnética 56. Los imanes 54 están alojados en la plataforma móvil 60. El módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 incluye entrada 62 y salida 64, a través de las cuales se puede hacer fluir una suspensión celular en la dirección y a través del módulo 8.

[0227] Aunque las FIGs. 2A y 2B representan un conjunto de imanes 54, el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 puede tener dos o más conjuntos, como se muestra en la FIG. 4A, y puede tener más de dos imanes en un conjunto. Además, los imanes 54 pueden estar en una posición permanente, en cuyo caso el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 puede carecer de plataforma móvil 60 o puede tener una cámara de flujo móvil 50. Además, aunque los imanes 54 se muestran en una configuración orientada a x, pueden estar orientados en cualquier ángulo en el plano x-y, incluyendo orientación y o una orientación cruzada x-y.

[0228] La entrada 62 y la salida 64 pueden tener cualquier configuración suficiente para establecer el flujo laminar de la suspensión celular a través de la cámara 50. La geometría de entrada, la geometría de salida y la tasa de flujo en su totalidad influyen en el flujo de la suspensión celular a través de la cámara 50. En algunos casos puede ser aceptable el flujo turbulento.

[0229] Las paredes 52 pueden ser estructuras rígidas o pueden ser flexibles. Por ejemplo, pueden ser las paredes de una bolsa de almacenamiento de células u otro componente similar. Cuando las paredes 52 son flexibles, la dimensión de la cámara 50 en la dirección z puede variar dependiendo de la tasa de flujo de la suspensión celular a través de la cámara 50.

[0230] La dimensión de la cámara 50 en la dirección z puede estar entre 5 µm y 100 µm, entre 5 µm y 500 µm o entre 5 µm y 1000 µm, entre 5 µm y 1 cm o generalmente 100 µm, 500 µm, 1000 µm o 1 cm o menos. Las dimensiones en las direcciones x, y y z pueden estar limitadas para obtener fuerzas fluídicas que sean suficientemente elevadas para mover células o partículas paramagnéticas a través de la cámara 50.

[0231] Los imanes 54 pueden tener una fuerza de campo magnético elevada. Por ejemplo, pueden contener metales de tierras raras, como neodimio o samario aleado con otro metal, como cobalto. Los imanes 54 pueden ser imanes dipolares como se representa, o pueden ser otros tipos de imanes, como imanes cuadrupolares. Los imanes 54 pueden tener una fuerza de campo magnético ajustable. Por ejemplo, pueden ser electroimanes. Los imanes 54 pueden se pueden disponer para maximizar la atracción magnética para imanes en el mismo lado de la cámara 50, para maximizar la repulsión magnética para imanes en lados opuestos de la cámara 50, o ambos. Aunque la FIG. 2A representa una configuración de imán particular, se pueden utilizar configuraciones en las que la polaridad del imán sea opuesta o concordante dependiendo del efecto a obtener.

[0232] La FIG. 3 es un diagrama esquemático en sección transversal longitudinal lateral de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 con membrana 70 ubicada por encima de puertos de inyección de fluido de submembrana 72 e imanes 54. El fluido del módulo de tampón 6 u otro módulo de fluido se puede introducir a través de puertos de inyección de fluido 72 para ayudar a la eliminación de perlas de células situadas cerca de la membrana 70.

[0233] La plataforma móvil 60 puede ser móvil en la dirección z, permitiendo el movimiento de imanes 54 en la dirección z desde una posición adyacente a la cámara 50, como se muestra en las FIGs. 2A y 2B, o a la cámara próxima 50 (no mostrada), a una posición distante de la cámara 50 (como se muestra en la FIG. 7C). Por ejemplo, la posición distante de la cámara 50 puede ser al menos 1 cm de la pared 52 más cercana. La posición distante es suficiente para evitar cualquier influencia sustancial de imanes 54 a través de sus campos magnéticos o cualquier partícula paramagnética en la cámara 50. La distancia de posición puede ser sustancialmente menor si se inserta un material aislante magnético entre los imanes 54 y la cámara 50. Si los imanes 54 tienen una fuerza de campo magnético ajustable, en lugar de moverse pueden ajustarse simplemente a una fuerza de campo magnético más baja o a una fuerza de campo magnético cero para evitar cualquier influencia sustancial de cualquier partícula paramagnética en la cámara 50.

[0234] Particularmente cuando se utiliza una configuración de gradiente cero, el módulo 8 puede tener un conjunto superior de imanes 54 o un conjunto inferior de imanes 54, como se representa en las FIGs. 4A y 4B. La plataforma móvil 60 puede ser giratoria en el plano x-y, o los imanes 54 pueden estar permanentemente orientados de modo que los imanes 54 estén en una configuración cruzada orientada a x-y, como la representada en el diagrama esquemático en sección transversal longitudinal de un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 de la FIG. 4C. Para uso en una configuración de gradiente cero, el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 puede tener dos entradas 62 y una entrada no magnética 62a y una entrada magnética 62b, así como dos salidas 64, una salida magnética 64a y una salida no magnética 64b. En este caso, la línea de gradiente cero 58 en una dirección cruzada orientada a x-y forma un filtro de gradiente cero cuando el módulo 8 está en uso. La inclusión de imanes adicionales 54 puede proporcionar dos líneas de gradiente cero, 58a y 58b en el mismo módulo 8, como se ilustra en la FIG. 4D, permitiendo la separación de diferentes partículas paramagnéticas en diferentes salidas 64a y 64 b, o proporcionando un filtro de apoyo.

[0235] La línea de gradiente cero 58 puede ser una banda de gradiente cero, que tiene una dimensión en la dirección x si los imanes 54 están suficientemente espaciados entre sí en lugar de ser adyacentes como se representa en las FIGs. 2A y 2B.

[0236] Los imanes para uso con un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo pueden estar ubicados fuera de la cámara a través de la cual fluye la suspensión celular, o dentro de la cámara. Si los imanes son internos, pueden estar revestidos con un material biocompatible. Particularmente si los imanes son internos, pueden ser desechables.

[0237] La FIG. 1B es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular 2 que incluye una pluralidad de módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8a, 8b y 8c en paralelo. Aunque solo se ilustran tres módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8, la pluralidad puede ser cualquier número mayor que dos. Cuando los módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 están en paralelo, los módulos pueden ser normalmente del mismo tipo y estar en la misma configuración, de modo que cada uno realiza la misma función. Los módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 pueden ser particularmente útiles para el procesamiento rápido de la suspensión celular o la gestión del volumen de fluido cuando se combinan con módulos adicionales. Además, la colocación de los módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 en paralelo proporciona flexibilidad en el control del flujo de fluido, ya que los módulos deben utilizarse al mismo tiempo en su totalidad.

[0238] La FIG. 1C es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular 2 que incluye una pluralidad de módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8a, 8b y 8c en serie. Aunque solo se ilustran tres módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8, la pluralidad puede ser cualquier número mayor que dos. Cuando los módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 están en serie, pueden ser del mismo tipo y configuración de modo que cada uno realice la misma función, pero, generalmente, serán de tipos y configuraciones diferentes de modo que cada uno realice diferentes funciones. Por ejemplo, el módulo 8a puede separar células unidas a partículas paramagnéticas y células no unidas, el módulo 8b puede eliminar perlas de células unidas a partículas paramagnéticas y el módulo 8c puede eliminar perlas de células unidas a partículas paramagnéticas bajo mayores gradientes de campo magnético.

[0239] La FIG. 1D es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular 2 en el que el bucle de retorno 14 dirige células unidas a partículas paramagnéticas de vuelta a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8. Tal sistema se puede utilizar para obtener una mejor separación de células unidas a partículas paramagnéticas y células no unidas o una mejor eliminación de perlas o separación de

células no unidas y partículas paramagnéticas en comparación con un sistema similar sin bucle de retorno 14. El fluido se puede dirigir al bucle de retorno 14 o a un módulo de salida magnética 12 mediante una válvula o interruptor.

[0240] La FIG. 1E es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular 2 en el que el módulo de suspensión celular 4 y el módulo de tampón 6 están conectados por separado al módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8. Tal sistema puede ser particularmente útil cuando el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 tiene dos entradas 62 y dos salidas 64 e imanes 54 en una configuración cruzada orientada a x-y, como se muestra y se describe con respecto a la FIG. 5.

[0241] La FIG. 1F es un diagrama esquemático de un sistema de procesamiento celular 2 con un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18 ubicado aguas abajo del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8. El módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18 está conectado al módulo de salida de residuos 20 y al módulo de salida de células 22. En este sistema, 2, el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo magnético 8 separa células unidas a partículas paramagnéticas y células no unidas, mientras que un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18 realiza toda la eliminación de perlas o el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo magnético 8 puede realizar asimismo la eliminación de perlas. El módulo de reactivo 24 puede estar presente opcionalmente si se añade un reactivo, como un agente químico, al fluido de suspensión en el módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18. Aunque en la FIG. 1F se ilustra un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18, el sistema 2 puede incluir una pluralidad de módulos 18 en serie o en paralelo. Cuando los módulos 18 están en serie, se puede añadir un agente químico solo al último módulo 18 para minimizar la exposición celular al agente químico.

[0242] El reactivo en el módulo de reactivo 24 puede ser cualquier agente químico que debilite el enlace entre una partícula y una célula. La partícula puede ser la partícula paramagnética o puede ser una partícula no paramagnética.

[0243] La FIG. 5A es un diagrama esquemático en sección transversal longitudinal de un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18. Este módulo 18 incluye entrada de muestra 80, que permite que un fluido de suspensión celular fluya hacia la cámara de eliminación de perlas cilíndrica 82, que se define en parte por una pared lateral cilíndrica 84 y contiene la membrana giratoria cilíndrica 86 orientada coaxialmente. La pared 84 está revestida con imanes 88 en el exterior. La cámara de eliminación de perlas 18 permite que el fluido que ha pasado a través de la membrana giratoria 86 salga a través del módulo de salida de residuos 20, mientras que el fluido y las células restantes salen a través del módulo de salida de células 22. La membrana giratoria 86 tiene un tamaño de poro promedio menor que el diámetro promedio de las células, pero más grande que cualquier partícula paramagnética a eliminar mediante eliminación de perlas. El tamaño de poro promedio también puede ser más grande que cualquier partícula paramagnética a eliminar, permitiendo la eliminación de estas partículas paramagnéticas por la membrana giratoria, ya sea como método primario de eliminación de partículas o como apoyo a la eliminación magnética.

[0244] Los imanes 88 pueden rodear sustancialmente la pared 84 como se muestra en la FIG. 5B, o pueden estar espaciados a intervalos a lo largo de la pared 84, como se muestra en la FIG. 5C. Los imanes 88 pueden estar montados en una plataforma móvil para permitir que se muevan de una posición adyacente a la pared 88, como se muestra en las FIGS. 5A-5C, o a las paredes 88 próximas (no mostradas) a una posición distante de la pared 84. Por ejemplo, la posición distante puede ser al menos 1 cm de la pared 84. Este movimiento a una posición distante evita que los imanes 88, a través de su campo magnético, tengan una influencia sustancial sobre cualquier partícula paramagnética en la cámara 82. Si se inserta un material aislante magnético entre los imanes 88 y la cámara 82, la posición distante debe ser menor que si no estuviera presente el material aislante magnético. Si los imanes 88 tienen una fuerza de campo magnético ajustable, en lugar de moverse pueden ajustarse simplemente a una fuerza de campo magnético más baja o a una fuerza de campo magnético cero para evitar una influencia sustancial de cualquier partícula paramagnética en la cámara 82.

[0245] Aunque se muestran múltiples imanes 88 en la FIG. 5, es posible tener solo un imán 88.

[0246] Los imanes 88 pueden tener una fuerza de campo magnético elevada. Por ejemplo, pueden contener metales de tierras raras, como neodimio o samario aleado con otro metal, como cobalto. Los imanes 88 pueden ser imanes dipolares, imanes cuadrupolares o cualquier tipo de imán. Los imanes 88 pueden tener una fuerza de campo magnético ajustable, por ejemplo pueden ser electroimanes. Los imanes 88 se pueden disponer para maximizar la atracción magnética, por ejemplo en una configuración envuelta.

[0247] Los imanes para uso con un módulo de membrana giratoria pueden estar ubicados fuera de la cámara a través de la cual fluye la suspensión celular, o dentro de la cámara. Si los imanes son internos, pueden estar revestidos con un material biocompatible. Particularmente si los imanes son internos, pueden ser desechables.

[0248] Ejemplos de membranas giratorias adecuadas para uso en módulos divulgados en el presente documento incluyen la membrana giratoria de policarbonato grabado de 4-µm utilizada en el sistema de procesamiento celular LOVO® (Fresenius Kabi, Fenwal, Lake Zurich, IL) y la membrana giratoria utilizada en los sistemas de separación de células magnéticas ISOLEX® (Baxter, Deerfield, IL).

[0249] Los elementos de las FIGs. 1A-1F, incluyendo los módulos de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 descritos en las FIGS. 2-4 o módulos de eliminación de perlas de membrana giratoria 18 descritos en la FIG. 5 se pueden combinar entre sí en el sistema de procesamiento celular 2 dependiendo del procesamiento celular específico a realizar. Los elementos se pueden combinar como se representa o en otras variaciones razonables. Por ejemplo, se puede incluir un módulo de reactivo 24 en un sistema de modo diferente al representado en la FIG. 1A, de modo que se pueda añadir un agente químico al fluido de suspensión en el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 cuando se utiliza para la eliminación de perlas. Los módulos, incluyendo módulos de tampón o módulos de salida adicionales, se pueden disponer y utilizar para asegurar volúmenes de fluido y tasas de flujo apropiados, particularmente en los módulos 8 y 18.

[0250] En la FIG. 1G se ilustra un ejemplo de sistema de procesamiento celular 2 que combina múltiples módulos y bucles. Este sistema incluye módulo de suspensión celular 4 y un módulo de tampón 6a conectado al primer módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8a, que tiene un módulo de salida no magnética 10a y un módulo de salida magnética 12a. El módulo de salida magnética 12a está conectado al segundo módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8b, que también está conectado al módulo de tampón 6b y tiene un nódulo de salida no magnética 10b y un módulo de salida magnética 12 y bucle de retorno 14a. El bucle de retorno 14a conduce de vuelta al módulo 8b. El módulo de salida magnética 12b conduce al primer módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18a, que tiene un módulo de salida de residuos 20a y un módulo de salida de células 22a. El módulo de salida de células 22a conduce a un segundo módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18b, que también está conectado al módulo de reactivo 24, así como al módulo de salida de residuos 20b, al bucle de retorno 14b y al módulo de salida de células 22b. El bucle de retorno 14b conduce de vuelta al segundo módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8b en serie.

[0251] En la FIG. 1H se muestra otro ejemplo de sistema de procesamiento celular 2, que tiene varios módulos adicionales con conductos de fluidos específicos. El módulo de suspensión celular 4 y el módulo satélite 30, que pueden estar vacíos o pueden contener tampón, están conectados al módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8. El módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 está conectado por separado al módulo de tampón 6 y al módulo de reserva 26. El módulo de reserva 26 está conectado adicionalmente al módulo de recuperación 28. Se realizan muchas conexiones utilizando tuberías de púas 32. El sistema contiene adicionalmente, a lo largo de varios conductos de fluido, abrazaderas de rodillo 34, sitios de soldadura 36, una abrazadera deslizante 38 y abrazaderas de pinza 40.

[0252] El sistema de procesamiento celular 2 puede contener una variedad de módulos 16 adicionales, como columnas magnéticas, otros módulos de separación física, módulos de lavado de células, módulos de concentración de células y módulos de intercambio de medios.

Métodos de Separación de Células y Eliminación de Perlas

[0253] El sistema 2 se puede utilizar para separar células unidas a partículas paramagnéticas y células no unidas, para eliminar perlas de células unidas a partículas magnéticas, para separar partículas paramagnéticas y células no unidas, o cualquier combinación de los mismos, en un proceso de flujo continuo. En un proceso de flujo continuo, todas las células continúan moviéndose mientras están en un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8. Ninguna, no más del 0,01 % o no más del 0,05 % o no más del 1 % de células unidas a partículas paramagnéticas que pasan a través del módulo 8 se detienen a lo largo de las paredes 52.

Procesos de Separación Magnética/Eliminación de Perlas de Flujo Continuo

[0254] En un proceso de flujo continuo utilizando el sistema de la FIG. 1A, el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 puede cebarse opcionalmente mediante flujo de tampón del módulo de tampón 6 a través del mismo al módulo de salida no magnética 10 o al módulo de salida magnética 12, u otra salida o módulo 16 adicional. A través del módulo 8 fluye una suspensión celular que contiene células unidas a partículas paramagnéticas.

[0255] Si el sistema 2 está configurado para la separación, la suspensión celular se dirige al módulo de salida no magnética 10. El módulo 8 se puede configurar periódicamente para no atraer partículas paramagnéticas mientras que el tampón del tampón 6 fluye a través del mismo al módulo de salida magnética 12. Para asegurar una mejor separación de células y una elevada pureza de los productos celulares magnéticos o no magnéticos, la suspensión celular se puede dirigir a través de un bucle 14 para un segundo o posterior paso a través del módulo 8. Las células unidas a partículas paramagnéticas se pueden dirigir a un componente adicional 16, como un módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 configurado para la eliminación de perlas o a un módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18.

[0256] Si el sistema 2 está configurado para la eliminación de perlas, después del flujo a través del módulo 8, la suspensión celular se dirige al módulo de salida no magnética 10. Alternativamente, la suspensión celular se puede dirigir a través del bucle 14 durante un segundo o posterior paso a través del módulo 8 antes de la dirección al módulo de salida no magnética 10.

[0257] Los procesos que utilizan el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 someten a cada célula unida a partículas paramagnéticas 100 con al menos una partícula paramagnética 102 a una fuerza fluídica 104 (cizallamiento o arrastre). Cada célula 100 también está sujeta a la fuerza magnética 106 como se muestra en la FIG. 6. La fuerza fluídica 104 y la fuerza magnética 106 se pueden combinar de manera que las partículas paramagnéticas 102 permanezcan unidas a la célula unida a partículas paramagnéticas 100, permitiendo que la célula 100 se separe de células no unidas. La fuerza fluídica 104 y la fuerza magnética 106 se pueden combinar de manera que la partícula paramagnética 102 se desprenda de la célula unida a partículas paramagnéticas, permitiendo la eliminación de perlas de la célula 100. Las fuerzas secundarias, como la difusión y la gravedad, también actúan sobre la partícula paramagnética 102, pero sus efectos sobre la eliminación de perlas son normalmente mucho menores que la fuerza fluídica y la fuerza magnética y frecuentemente se ignoran en el cálculo de la tasa de flujo apropiada a través de un módulo.

[0258] El sistema 2 se puede configurar generalmente de modo que, lo más pronto posible, las células deseables ya no estén sujetas al paso a través de módulos, reduciendo el trauma de las células. Por ejemplo, solo el módulo de salida magnética 12 puede contener un bucle de retorno al módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 en una configuración de eliminación de perlas, permitiendo más fácilmente que las células liberadas de perlas pasen a través del módulo 8 menos veces que aquellas con partículas paramagnéticas unidas de manera más recalcitrante.

[0259] El módulo de flujo continuo 8 puede ser laminar o turbulento. La fuerza magnética 106 está influenciada por el flujo de saturación (m_s) de la partícula paramagnética 102. La fuerza magnética 106 también está influenciada por la fuerza del campo magnético 56 al que está sometida la partícula paramagnética 102, que está influenciada por la fuerza de los imanes 54, así como por la profundidad de la cámara 50 en la dirección z y la ubicación de la célula 100 dentro de la cámara. La fuerza magnética 106 está influenciada adicionalmente por el gradiente de campo magnético al que está sometida la partícula paramagnética 102 y se mueve a través de la cámara 50, que está influenciada por la fuerza y la colocación de los imanes 54, así como por la ubicación de la partícula paramagnética 102 respecto a los imanes 54.

[0260] Además, las fuerzas fluídicas se ven afectadas por la velocidad de flujo del fluido, que es normalmente más elevada en el centro de la cámara y es cero en las paredes, lo que significa que las células adheridas a las paredes pueden no experimentar suficiente fuerza fluídica para desprenderlas de su partícula paramagnética y que las células a lo largo de la pared pueden ser en gran medida estacionarias y pueden apantallar células aguas abajo de las fuerzas fluídicas. Esto da lugar a la pérdida de células deseables y se evita mediante el flujo continuo de la suspensión celular a través de la cámara 50. Esta pérdida se puede evitar mediante un enfoque de flujo continuo, en el que las células no se vuelven estacionarias por la fuerza magnética. También se puede evitar mediante módulos en los que la velocidad no sea cero o casi cero en las paredes, como los módulos de flujo de tapón, donde la velocidad de flujo del fluido es uniforme en toda la cámara.

Proceso de Separación de Flujo continuo

[0261] Se puede realizar un proceso de separación de flujo continuo utilizando el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo mostrado 8 en las FIGs. 2A y 2B. La tasa de flujo es tal que la fuerza fluídica 104 y la fuerza magnética 106 permiten que la partícula paramagnética 102 permanezca unida a la célula 100. La tasa de flujo es también tal que la célula 100 no es lisada por fuerzas fluídicas.

[0262] La FIG. 7A muestra el módulo 8 de la FIG. 2B cuando la célula unida a partículas paramagnéticas 100 y la célula no unida 110 han entrado recientemente en la cámara 50. En la FIG. 7B, la célula 100 se ha detenido, mientras que la célula no unida 110 ha continuado a su velocidad original. En la FIG. 7C, los imanes se han alejado y la célula 100 continúa moviéndose, pero la célula no unida 110 ha salido de la cámara 50.

[0263] El fluido de suspensión que sale de la cámara 50 mientras los imanes 54 están en posición adyacente o próximos a la cámara 50 entra en el módulo de salida no magnética 10. Periódicamente, el flujo de la suspensión celular del módulo de suspensión celular 4 se detiene y el tampón fluye hacia la cámara 50 del módulo de tampón 6 mientras los imanes 54 se alejan de la cámara 50 para permitir que las células unidas a partículas paramagnéticas 100 se arrastren al módulo de salida magnética 12 por el tampón.

[0264] Este proceso de separación de flujo continuo, particularmente cuando se repite para permitir múltiples pasos de células a través del módulo 8, puede eliminar al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de células unidas a partículas paramagnéticas 100 de la suspensión celular antes de su entrada en el módulo de salida no magnética 10. La eficiencia puede ser menor para un proceso de paso único en el que las células pasan a través del módulo 8 solo una vez. Por ejemplo, en un proceso de paso único, el módulo 8 puede eliminar al menos 25 % o al menos 50 % de células unidas a partículas paramagnéticas 100 de la suspensión celular antes de su entrada en el módulo de salida no magnética 10. El paso único o múltiple de la salida no magnética o la salida magnética a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 puede dar lugar a un producto de células unidas a partículas paramagnéticas con no más del 1 % de células no unidas 110 y que contiene al menos el 99 % de

células unidas a partículas paramagnéticas 100 halladas en la suspensión celular antes del proceso de separación de flujo continuo, un producto de células no unidas con no más del 1 % de células unidas a partículas paramagnéticas 100 y que contiene al menos el 99 % de las células no unidas 110 halladas en la suspensión celular antes del proceso de flujo continuo, o ambos.

Proceso de Eliminación de Perlas de Flujo continuo

[0265] También se puede realizar un proceso de eliminación de perlas de flujo continuo utilizando el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 mostrado en las FIGs. 2A y 2B. La tasa de flujo es tal que la fuerza fluídica 104 y la fuerza magnética 106 desprenden, en promedio sobre las células en la suspensión celular, al menos una partícula paramagnética 102 de la célula 100 mientras la célula 100 pasa a través de la cámara 50. La tasa de flujo es también tal que las células no son lisadas por fuerzas fluídicas.

[0266] La FIG. 8A muestra el módulo 8 de la FIG. 2B cuando las células unidas a partículas paramagnéticas 100a y 100b han entrado recientemente en la cámara 50. La célula 100a tiene una partícula paramagnética 102, mientras que la célula 100b tiene dos partículas paramagnéticas 102. En la FIG. 8B, una partícula paramagnética 102 se ha desprendido tanto de la célula 100a como de la célula 100b y se ha posado en la pared 52, mientras que las células 100a y 100b continúan pasando a través de la cámara 50. La célula 100a ya no tiene ninguna partícula paramagnética 102, mientras que la célula 100b conserva una partícula paramagnética 102. La célula 100b puede pasar a través del módulo 8 una segunda vez para eliminar esta segunda partícula paramagnética 102. Alternativamente, el módulo 8 puede estar configurado de modo que la célula 100b permanezca en la cámara 50, de manera similar a la célula unida a partículas paramagnéticas en la FIG. 7, mientras que la célula 100a sale de la cámara 50.

[0267] Este proceso de eliminación de perlas de flujo continuo puede eliminar al menos 99% de partículas paramagnéticas de las células.

[0268] Cuando se utilizó un sistema 2 que contenía un bucle de recirculación 14 del módulo de salida magnética 12 para eliminar perlas de células T CLT0119, las células en la salida magnética se resuspendieron en el tampón del módulo de tampón 6 y pasaron a través del módulo 8 una segunda vez y después de nuevo una tercera vez. En la FIG. 9 se proporciona una comparación de resultados de este proceso con los resultados de un proceso de flujo de parada convencional. La FIG. 9 presenta rendimientos de extremo a extremo, que son las relaciones entre el número de células en el producto final y el número de células que entraron en el sistema de eliminación de perlas.

[0269] El módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 mostrado en la FIG. 3 se puede utilizar para eliminar perlas de células de una manera similar al módulo 8 como se muestra en las FIGs. 2A y 2B. El fluido introducido a través de puertos 72 suministra una fuerza a las células 100 suficiente para desalojarlas de la membrana 70. Debido a que la velocidad del fluido de suspensión se aproximó a cero cerca de la membrana 70, estas células podrían no separarse o liberarse de perlas o perderse.

[0270] Este proceso de eliminación de perlas de flujo continuo puede eliminar al menos 99% de partículas paramagnéticas de las células.

Proceso de Filtro de Gradiente Cero de Flujo continuo

[0271] Se puede realizar un proceso de separación de flujo continuo utilizando el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo mostrado 8 en las FIGs. 4A y 4B. La tasa de flujo es tal que la fuerza fluídica 104 y la fuerza magnética 106 permiten que la partícula paramagnética 102 permanezca unida a la célula 100. La tasa de flujo es también tal que la célula 100 no se detiene en la cámara 50 y tampoco es lisada por fuerzas fluídicas. Se muestran varias configuraciones en las FIGs. 10-13 y se pueden modificar, por ejemplo para ajustar el número y el tamaño proporcional de entradas 62 y salidas 64 para uso con diferentes procesos de filtro de gradiente cero. Por ejemplo, los mismos efectos que se obtienen al tener entradas 62 y salidas 64 de diferentes tamaños también se pueden obtener proporcionando diferentes tasas de flujo, normalmente controladas por bombas, a través de entradas y salidas del mismo tamaño.

[0272] La FIG. 10 presenta una descripción básica de cómo las células unidas a partículas paramagnéticas 100 fluyen a través del módulo 8 en una configuración de gradiente cero. Como se ilustra en la FIG. 10A, las células 100 después de entrar en el módulo 8 (figura de la izquierda) son arrastradas en la dirección x al a línea de gradiente cero 58 en el momento en el que están a punto de salir del módulo 8 (figura de la derecha). Como se ilustra en las FIGs. 10A y 10B, las células 100 no están sujetas a efectos de fuerza magnética en la dirección y o en la dirección z al entrar en el módulo 8 (figura de la izquierda) o incluso al estar cerca de la salida (figura de la derecha).

[0273] La FIG. 11 muestra un módulo de gradiente cero 8 con imanes 54 orientados como se muestra en la FIG. 4A. En este módulo, el fluido entra a través de la entrada 62. Las células 100 con partículas magnéticas 102 siguen la línea de gradiente cero 58 y se dirigen a la salida magnética 64b. Las células no unidas 110 no se ven afectadas por la línea de gradiente cero 58 y fluyen a las salidas no magnéticas 64a y 64c. Algunas células no unidas 110 también entrarán en la salida magnética 64b en esta configuración.

[0274] La FIG. 12 muestra células moviéndose a través del módulo 8 de la FIG. 4C. Las células 100 con partículas magnéticas 102 siguen la línea de gradiente cero 58 y se dirigen a la salida magnética 64a. Las células no unidas 110 no se ven afectadas por la línea de gradiente cero 58 y fluyen a la salida no magnética 64b. Por lo tanto, la línea de gradiente cero 58 actúa como un filtro magnético al tiempo que permite que todas las células continúen moviéndose a través de la cámara 50 sin ser empujadas hacia ninguna pared 52. Como se ilustra, la entrada no magnética 62a es más grande que la entrada magnética 62b y la salida no magnética 64b es más grande que la salida magnética 64a. Si el flujo de fluido en el módulo 8 es laminar, el fluido de la entrada no magnética 62a cruza a través de la salida no magnética 64b, evitando que las células no unidas 110 entren en la salida magnética 64a. Este método también se puede utilizar con flujo turbulento, pero con menos eficiencia debido a la pérdida de células no unidas a la salida magnética 64a.

[0275] Este proceso de separación de flujo continuo puede eliminar al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de células unidas a partículas paramagnéticas 100 de la suspensión celular antes de su entrada en el módulo de salida no magnética 10. Los pasos múltiples de la salida no magnética o la salida magnética a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 puede dar lugar a un producto de células unidas a partículas paramagnéticas con no más del 1 % de células no unidas 110 y que contiene al menos el 99 % de células unidas a partículas paramagnéticas 100 halladas en la suspensión celular antes del proceso de separación de flujo continuo, un producto de células no unidas con no más del 1 % de células unidas a partículas paramagnéticas 100 y que contiene al menos el 99 % de las células no unidas 110 halladas en la suspensión celular antes del proceso de flujo continuo, o ambos.

Proceso de Separación de Partículas Paramagnéticas en Gradiente Cero de Flujo continuo

[0276] También se puede realizar un proceso de separación de partículas paramagnéticas de flujo continuo utilizando el módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8 mostrado en las FIG. 4C La FIG. 13 muestra células no unidas liberadas de perlas 110 y partículas paramagnéticas 102 moviéndose a través del módulo 8. Las células 110 se liberaron de perlas previamente, por ejemplo mediante el módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18, un módulo de liberación de perlas de membrana no giratoria, o el mismo o un módulo 8 separado en una configuración de eliminación de perlas. Alternativamente, las células 110 pueden haber estado ya en presencia de partículas paramagnéticas 102 pero no haberse unido a las mismas. Las partículas paramagnéticas 102 siguen la línea de gradiente cero 58 y se dirigen a la salida magnética 64a. Las células no unidas liberadas de perlas 110 no se ven afectadas por la línea de gradiente cero 58 y fluyen a la salida no magnética 64b. Por lo tanto, la línea de gradiente cero 58 actúa como un filtro magnético al tiempo que permite que las células 110 continúen moviéndose a través de la cámara 50 sin ser empujadas hacia ninguna pared 52.

[0277] Este proceso de separación de partículas paramagnéticas de flujo continuo puede eliminar al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de perlas de la suspensión celular.

[0278] Este proceso, junto con la eliminación de partículas paramagnéticas, también puede eliminar un constituyente no deseado de la suspensión celular.

[0279] Aunque el proceso de separación celular y el proceso de separación de partículas se describieron por separado anteriormente, ambos pueden producirse simultáneamente en el mismo módulo o sistema. Por ejemplo, un módulo de separación eliminará normalmente tanto células unidas a partículas paramagnéticas como partículas paramagnéticas libres de la suspensión celular.

Procesos de Eliminación de Perlas por membrana Giratoria

[0280] En un proceso de flujo continuo utilizando el sistema 2 de la FIG. 1F, las células unidas a partículas paramagnéticas separadas 100 se dirigen al módulo de membrana giratoria 18 como se muestra en la FIG. 14 a través de la entrada de muestra 80. Dentro de la cámara de eliminación de perlas 82, la membrana giratoria 86 genera flujos de Taylor-Couette recirculantes en la suspensión celular que ocasionan fuerzas fluídicas además de las fuerzas fluídicas generadas por la cámara de flujo continuo 82 desde la entrada 80 a las salidas 20 y 22. Como resultado, aunque las partículas paramagnéticas 102 experimentan aún una fuerza fluídica y una fuerza magnética, la relación de estas fuerzas y cómo ocasionan la eliminación de perlas es difícil de modelizar. Sin embargo, las fuerzas fluídicas se ven afectadas al menos por el tamaño y la velocidad de giro de la membrana giratoria 80, la tasa de flujo de la suspensión celular a través de la cámara 82 y la viscosidad del fluido de suspensión. La fuerza magnética se ve afectada por la naturaleza de las partículas paramagnéticas 102, la naturaleza de los imanes 88 y el diseño del módulo 18, particularmente la distancia entre las células 100 y los imanes 88. Normalmente, las fuerzas fluídicas no son tan elevadas como para lisar las células. Los flujos de Taylor-Couette son suficientes para mantener las células alejadas y fuera del contacto con la pared 84 y la membrana giratoria 86.

[0281] Las partículas paramagnéticas 102 que se eliminan de las células 100 migran a la pared 84, y particularmente a líneas o bandas de gradiente cero a lo largo de la pared 84. Cualquier partícula no paramagnética 120 se elimina también de las células 100 solo mediante fuerzas fluídicas. Las partículas no paramagnéticas 120 pasan a través de

poros en la membrana giratoria 86 y después salen de la cámara 82 a través del módulo de salida de residuos 20. Cualquier agente químico 122 añadido desde la cámara de reactivo 24 opcional también pasa a través de los poros en la membrana giratoria 86 y sale de la cámara 82 a través del módulo de salida de residuos 20. Esto limita la exposición de células 100 al agente químico 120. Las células no unidas liberadas de perlas 110 salen de la cámara 82 a través del módulo de salida de células 22.

[0282] Las partículas paramagnéticas 102 se pueden eliminar de la pared 84 periódicamente, por ejemplo deteniendo el flujo de suspensión celular a través de la cámara 82, moviendo los imanes 88 a una posición distante de la pared 84, después haciendo fluir tampón a través de la cámara 82.

[0283] Algunas partículas paramagnéticas 102 también pueden pasar a través de la membrana giratoria 80 y eliminarse. Si los imanes 88 están ausentes o suficientemente distantes de la cámara 82, toda la eliminación de partículas paramagnéticas se puede conseguir mediante la membrana giratoria 80.

[0284] Este proceso de eliminación de perlas de flujo continuo también puede eliminar al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o 99% de partículas paramagnéticas de las células, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de todas las partículas no paramagnéticas de las células, o ambos.

[0285] La membrana giratoria también se puede utilizar para separar partículas paramagnéticas 102 de células no unidas 102.

[0286] La membrana giratoria 86 puede tener un tamaño de poro suficientemente pequeño para excluir todas las células en la suspensión celular.

[0287] El módulo de membrana giratoria 18 también se puede utilizar para eliminar constituyentes no deseados de la suspensión celular. Estos constituyentes se pueden filtrar simplemente mediante la membrana giratoria 88 o pueden interaccionar con el revestimiento de partículas paramagnéticas 102, partículas no paramagnéticas 120 o ambas, y eliminarse con las partículas. La eliminación de perlas y la eliminación de constituyentes no deseados se pueden producir por separado o simultáneamente.

Otros Procesos de Eliminación de Perlas y Separación de Partículas Paramagnéticas

[0288] El sistema 2, debido a su diseño modular, también es compatible con otros procesos de eliminación de perlas y separación de partículas paramagnéticas. Solo es necesario insertar un módulo adicional 16 adecuado. Por ejemplo, las columnas, incluyendo columnas magnéticas y métodos de separación física, se utilizan frecuentemente para la eliminación de perlas y se pueden incluir como módulo adicional 16.

Otros Procesos Incorporados

[0289] El sistema 2, debido a su diseño modular, es compatible con otros procesos incorporados. Estos procesos se pueden producir en al menos un módulo adicional 16. Por ejemplo, se puede utilizar un módulo para lavar células. También se puede utilizar un módulo para concentrar células. Se puede utilizar un módulo para intercambiar los medios en los que están ubicadas las células. Se puede utilizar un módulo para más de uno de estos pasos.

Proceso de Flujo Continuo de Múltiples Módulos

[0290] El sistema 2, como se muestra en la FIG. 1G, se puede utilizar en un proceso de flujo continuo de múltiples módulos. Opcionalmente, el tampón del módulo de tampón 6a puede fluir a través del módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8a y opcionalmente también uno o más de los módulos 8b, 18a y 18b. Una suspensión celular que contiene células deseables, partículas paramagnéticas y células unidas a partículas no paramagnéticas y células no unidas indeseables se hace fluir a través del módulo 8a, que está configurado como se muestra en la FIG. 4 para la separación, pero alternativamente se puede configurar como se muestra en las FIGs. 2A y 2B para la separación. Las células no unidas se dirigen al módulo de salida no magnética 10a como residuo. Las células unidas a partículas paramagnéticas se dirigen a través del módulo de salida magnética 12a al módulo de separación magnética/eliminación de perlas de flujo continuo 8b. El módulo 8b está configurado como se muestra en las FIGs. 2A y 2B para la eliminación de perlas. Las células unidas a partículas paramagnéticas se hacen fluir a través del bucle de retorno 14a al menos una vez antes de entrar en el módulo de salida magnética 12b como residuo. Las células no unidas liberadas de perlas se envían a través del módulo de salida no magnética 10b al módulo de eliminación de perlas de membrana giratoria 18a. Cualquier partícula paramagnética y partícula no paramagnética remanente se elimina, fluyendo las partículas no paramagnéticas al módulo de salida de residuos 20a, mientras que las partículas paramagnéticas permanecen en el módulo 18 y las células no unidas y las células con partículas paramagnéticas, partículas no paramagnéticas, o ambas fluyen al módulo de salida de células 22a. El módulo de salida de células 22a conduce a un segundo módulo de membrana giratoria 18b. Desde el módulo de reactivo 24 se añade un agente químico capaz de facilitar la eliminación de partículas paramagnéticas o de partículas no paramagnéticas, o ambas, de las células. Las partículas no paramagnéticas y el agente químico fluyen al módulo de residuos 20b. Las partículas para magnéticas permanecen en el módulo 18. Las células no unidas y las células con

partículas paramagnéticas, partículas no paramagnéticas, o ambas, fluyen al bucle de retorno 14b al menos una vez antes de ser enviadas al módulo de salida de células 22b como el producto celular final del proceso de flujo continuo.

Aplicaciones Clínicas

[0291] Todos los procesos del presente documento se pueden llevar a cabo según las normas de buenas prácticas clínicas de fabricación (cGMP).

[0292] Los procesos se pueden utilizar para purificación celular, enriquecimiento, cosecha, lavado, concentración o intercambio de medios celulares, particularmente durante la recogida de materias primas de partida (particularmente células) al inicio del proceso de fabricación, así como durante el proceso de fabricación para la selección o la expansión de células para terapia celular.

[0293] Las células pueden incluir cualquier pluralidad de células. Las células pueden ser del mismo tipo de célula o de tipos mixtos de células. Además, las células pueden ser de un donante, como un donante autólogo o solo un donante alogénico para terapia celular. Las células se pueden obtener de paciente, por ejemplo mediante leucoféresis o aféresis. Las células pueden incluir células T, por ejemplo pueden incluir una población que tiene más de 50% de células T, más de 60% de células T, más de 70% de células T, más de 80 % de células T o 90% de células T.

[0294] Los procesos de selección pueden ser particularmente útiles en la selección de células antes del cultivo y la expansión. Por ejemplo, las partículas paramagnéticas revestidas con anti-CD3 y/o CD28 se pueden utilizar para seleccionar células T para expansión o para introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) u otra proteína. Tal proceso se utiliza para producir células T CTL019 para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL).

[0295] Los procesos y módulos de eliminación de perlas divulgados en el presente documento pueden ser particularmente útiles en la fabricación de células para terapia celular, por ejemplo en la purificación de células antes o después del cultivo y la expansión. Por ejemplo, las partículas paramagnéticas revestidas con anti-CD3 y/o CD28 se pueden utilizar para expandir selectivamente células T, por ejemplo células T que están o estarán modificadas mediante introducción de un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) u otra proteína, de modo que el CAR se expresa mediante las células T. Durante la fabricación de tales células T, los procesos o módulos de eliminación de perlas se pueden utilizar para separar células T de las partículas paramagnéticas. Tal proceso o módulo de eliminación de perlas se utiliza para producir, por ejemplo, células T CTL019 para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (ALL).

[0296] En uno de tales procesos, ilustrado aquí a modo de ejemplo, se recogen células, por ejemplo células T, de un donante (por ejemplo un paciente a tratar con un producto de células T con receptor de antígeno quimérico autólogo) a través de aféresis (por ejemplo leucoféresis). Las células recogidas se pueden purificar entonces opcionalmente, por ejemplo, mediante un paso de elutriación. Después se pueden añadir partículas paramagnéticas, por ejemplo partículas paramagnéticas revestidas de anti-CD3/anti-CD28, a la población celular para expandir las células T. El proceso puede incluir también un paso de transducción, donde se introduce en la célula ácido nucleico codifica una o más proteínas deseadas, por ejemplo un CAR, por ejemplo un CAR dirigido a CD19. El ácido nucleico puede ser introducido en un vector lentiviral. Las células, por ejemplo las células transducidas lentiviralmente se pueden expandir entonces durante un periodo de días, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días, por ejemplo en presencia de un medio adecuado. Después de la expansión, los procesos/módulos de eliminación de perlas divulgados en el presente documento se pueden utilizar para separar las células T deseadas de las partículas paramagnéticas. El proceso puede incluir uno o más pasos de eliminación de perlas según los procesos de la presente divulgación. Las células liberadas de perlas se pueden formular entonces para administración al paciente. Se describen adicionalmente ejemplos de células T con CAR y su fabricación, por ejemplo, en el documento WO2012/079000. Los sistemas y métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para cualquier proceso de separación celular/purificación/eliminación de perlas descrito o asociado al documento WO2012/079000.

[0297] Los sistemas y métodos del presente documento pueden beneficiar de manera similar a otros productos de terapia celular al desechar menos células deseables, causar menos trauma celular y eliminar de manera más fiable partículas magnéticas y no paramagnéticas de células con menor o nula exposición a agentes químicos, en comparación con sistemas y métodos convencionales.

[0298] Aunque anteriormente solo se describen de manera específica realizaciones ejemplares de la divulgación, se apreciará que son posibles modificaciones y variaciones de estos ejemplos sin apartarse del espíritu y el alcance previsto de la divulgación. Por ejemplo, los módulos magnéticos y los sistemas magnéticos que los contienen se pueden disponer y utilizar en una variedad de configuraciones además de las descritas. Además, los sistemas y métodos pueden incluir componentes adicionales y pasos no descritos específicamente en el presente documento. Por ejemplo, los métodos pueden incluir el cebado, en el que primero se introduce un fluido en un componente para eliminar burbujas y reducir la resistencia a la suspensión celular o el movimiento de tampón. Además, las realizaciones pueden incluir solo una porción de los sistemas descritos en el presente documento para uso con los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las realizaciones se pueden relacionar con módulos desechables, mangueras,

etc., utilizables dentro de equipos no desechables para formar un sistema completo capaz de separar células o liberarlas de perlas para producir un producto celular.

Paso de Lavado Mejorado

[0299] La composición celular de productos de aféresis, por ejemplo leucoféresis, varía en gran medida de un paciente a otro. Los productos de leucoféresis con altos porcentajes de granulocitos (por ejemplo neutrófilos) se han correlacionado con casos de aglomeración celular elevada durante la fabricación de células T con CAR utilizando el Proceso B. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que tal aglomeración irreversible reduce los números de células disponibles y afecta negativamente sobre los rendimientos celulares interfiriendo con el proceso de enriquecimiento (por ejemplo selección positiva), lo que da lugar a una reducción general en números de células y pureza. Además, sin desear ceñirse a la teoría, la reducción de la pureza y el rendimiento celular afecta posteriormente sobre la posterior ejecución del proceso (por ejemplo eficiencia de transducción y expansión) y los números y la calidad de las células del producto final. El resultado neto de esto reduce la capacidad de fabricar un producto capaz de cumplir las especificaciones de dosis al final del ciclo de procesamiento. Por lo tanto, sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la prevención de la aglomeración puede reducir la pérdida de células y mejorar la pureza de células T, lo que puede generar una mejor calidad y cantidad de material de partida para los posteriores pasos de procesamiento y dar lugar a un producto terapéutico mejorado en general.

[0300] En los actuales procesos de fabricación en la técnica, por ejemplo el Proceso B, el material de leucoféresis celular del paciente se descongela en Plasmatherm (Genesis), se lava utilizando el instrumento CellSaver 5+ (Haemonetics) y después se resuspende en un medio de expansión celular basado en medio X-VIVO15 (Lonza), llamado 'Medio Modificado' o en solución salina isotónica tamponada como solución salina tamponada con fosfato (PBS) para la posterior selección de linfocitos de Ficoll. El Medio Modificado se prepara según el protocolo proporcionado en el Ejemplo 2. Sin embargo, como se describe en el Ejemplo 2, la transferencia de células descongeladas a Medio Modificado o a solución de PBS puede provocar que las células se aglomeren.

[0301] En consecuencia, en el presente documento también se divulgan métodos mejorados para el lavado de células para evitar la aglomeración, compatible con posteriores pasos de fabricación, por ejemplo selección positiva por estimulación, por ejemplo con Dynabeads anti-CD3/CD28 CTS (Thermo Fisher). Además, el paso de lavado mejorado descrito en el presente documento se realiza, por ejemplo, en células descongeladas para eliminar desechos subcelulares, hemoglobina libre y crioprotectores, para conseguir reducción de volumen y para permitir la posterior separación por gradiente de densidad. En una realización, el paso de lavado se realiza con un tampón de resuspensión celular alternativo al Medio Modificado o a la solución de PBS. En una realización, el paso de lavado se realiza con un tampón que comprende dextrosa y/o cloruro de sodio. En una realización, el tampón comprende alrededor de 5% y alrededor de 0,45% de cloruro de sodio, por ejemplo medio D5 1/2 NS. En una realización, el tampón estabiliza la suspensión celular y evita la aglomeración, por ejemplo durante al menos 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 3,5 horas, 4 horas, 4,5 horas, 5 horas, 5,5 horas o 6 horas.

[0302] En una realización, el paso de lavado mejorado descrito en el presente documento se realiza utilizando un dispositivo, por ejemplo un dispositivo de separación celular, por ejemplo el mismo dispositivo utilizado para la centrifugación por gradiente de densidad. Por ejemplo, el paso de lavado mejorado se realiza utilizando el dispositivo Sepax 2 RM (Biosafe).

[0303] El paso de lavado divulgado en el presente documento se puede utilizar para una muestra de aféresis fresca o una muestra de aféresis congelada previamente, por ejemplo descongelada. El paso de lavado divulgado en el presente documento se puede utilizar antes o después de cualquiera de los métodos de elutriación, centrifugación por gradiente de densidad o selección descritos en el presente documento. El paso de lavado divulgado en el presente documento se puede realizar tras un paso de centrifugación por gradiente de densidad, por ejemplo un paso de centrifugación por gradiente de densidad utilizando medio OptiPrep.

Proceso de Fabricación mejorado

[0304] En el presente documento se divulgan métodos para mejorar la calidad y el rendimiento de células efectores inmunitarias adecuadas para la expresión de CAR a un mayor grado que los métodos utilizados actualmente en la técnica. La elutriación, la centrifugación por gradiente de densidad, la selección positiva y negativa en condiciones de flujo y el paso de lavado mejorado descrito en las secciones precedentes se pueden utilizar en cualquier combinación entre sí o con métodos adicionales utilizados actualmente en la técnica o descritos en el presente documento para aislar o enriquecer las células efectoras inmunitarias que son adecuadas para expresar un CAR.

[0305] Generalmente, un método para generar o enriquecer una población de células efectoras inmunitarias que se puede modificar por ingeniería genética para expresar un CAR incluye: proporcionar una muestra de entrada, realizar un paso de enriquecimiento y realizar un paso de selección, produciendo de este modo una muestra de salida que comprende las células efectoras inmunitarias que son adecuadas para la expresión de un CAR. La invención proporciona un método como se define en las reivindicaciones. Los métodos para producir una población de células efectoras inmunitarias que expresan un CAR comprenden los métodos para generar o enriquecer la población de

células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR y comprenden además un paso de estimulación, por ejemplo en donde las células se estimulan para proliferar o persistir, y comprende además la introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR. En las siguientes secciones se describe adicionalmente la divulgación adicional respecto a la estimulación e introducción/expresión de un CAR.

[0306] En la invención, la muestra de entrada es una muestra congelada, por ejemplo una muestra de aféresis, leucoféresis o sangre completa congelada o criopreservada, y el método comprende descongelar la muestra congelada o proporcionar una muestra descongelada.. Las muestras congeladas, por ejemplo criopreservadas, se pueden descongelar mediante medios pasivos o activos. La descongelación por medios pasivos incluye permitir que la muestra se descongele, por ejemplo alcance la temperatura del medio circundante, por ejemplo alcance la temperatura ambiente o alcance la temperatura del tampón o de la solución en la que la muestra se transfiere o con la que se mezcla. La descongelación por medios activos incluye utilizar un dispositivo que descongele la muestra, por ejemplo que lleve la muestra a la temperatura del entorno circundante más rápidamente que si se descongelara por medios pasivos.

[0307] El paso de enriquecimiento puede realizar la elutriación o la centrifugación por gradiente de densidad. La elutriación se puede realizar utilizando condiciones de elutriación conocidas en la técnica o los ajustes mejorados descritos en el presente documento para elutriación de una muestra congelada o previamente congelada. La centrifugación por gradiente de densidad se puede realizar utilizando Ficoll o un medio que comprende iodixanol, por ejemplo alrededor de 60% de iodixanol en agua, por ejemplo OptiPrep ™. En la invención, el método comprende realizar la elutriación.

[0308] En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el paso de selección comprende realizar un paso de selección positiva y/o un paso de selección negativa. El paso de selección positiva puede comprender la selección de células CD3+/CD28+, por ejemplo utilizando un agente de separación, por ejemplo una perla acoplada con un anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28, en condiciones de flujo estáticas, por ejemplo utilizando un. El paso de selección negativa puede comprender selección negativa de células B CD19+ o linfoblastos CD19+, por ejemplo utilizando un agente de separación, por ejemplo una perla acoplada a un anticuerpo anti-CD19.

[0309] En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se puede realizar un paso de lavado después de la recogida de muestra, antes del paso de enriquecimiento, después del paso de enriquecimiento, antes del paso de selección o después del paso de selección o cualquier combinación de los mismos.

[0310] En el presente documento se describen adicionalmente métodos ejemplares para generar o enriquecer una población de células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR, que incluyen una o más de elutriación, centrifugación por gradiente de densidad, selección positiva o negativa, por ejemplo en condiciones de flujo, o paso de lavado mejorado.

[0311] En una realización, un método para generar o enriquecer una población de células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR incluye proporcionar una muestra de entrada congelada que comprende células efectoras inmunitarias; descongelar la muestra de entrada congelada para producir una muestra descongelada; realizar un paso de enriquecimiento, en donde el paso de enriquecimiento comprende realizar la elutriación en la muestra de entrada, en donde la muestra de entrada es una muestra de entrada descongelada; y realizar un paso de selección, en donde la selección es una selección positiva, por ejemplo para células CD3/CD28+, o una selección negativa, por ejemplo para células CD19+, CD25+ o CD14+.

[0312] También se divulga un método para generar o enriquecer una población de células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR incluye proporcionar una muestra de entrada fresca o congelada que comprende células efectoras inmunitarias; y opcionalmente en donde la muestra de entrada es una muestra de entrada congelada, descongelar la muestra de entrada congelada para producir una muestra descongelada; realizar un paso de enriquecimiento, en donde el paso de enriquecimiento comprende realizar un paso de centrifugación por densidad utilizando un medio que comprende iodixanol, por ejemplo 60% de iodixanol en agua, por ejemplo medio OptiPrep y/o que tiene una densidad mayor que Ficoll (por ejemplo mayor que 1,077 g/ml, por ejemplo alrededor de 1,32 g/ml); y realizar un paso de selección, en donde la selección es una selección positiva, por ejemplo para células CD3/CD28+, o una selección negativa, por ejemplo para células CD19+, CD25+ o CD14+.

[0313] En otra realización, un método para generar o enriquecer una población de células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR incluye proporcionar una muestra de entrada congelada que comprende células efectoras inmunitarias; realizar un paso de enriquecimiento, en donde el paso de enriquecimiento comprende realizar la elutriación, y realizar un paso de selección positiva en condiciones de flujo, por ejemplo para células CD3/CD28+.

[0314] En otra realización, un método para generar o enriquecer una población de células efectoras inmunitarias que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un CAR incluye proporcionar una muestra de entrada congelada que comprende células efectoras inmunitarias; realizar un paso de enriquecimiento, en donde el paso de

enriquecimiento comprende realizar la elutriación, y realizar un paso de selección negativa en condiciones de flujo, por ejemplo para células CD19+, CD25+ o CD14+;
En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se puede realizar un paso de lavado después de la recogida de muestra, antes del paso de enriquecimiento, después del paso de enriquecimiento, antes del paso de selección o después del paso de selección o cualquier combinación de los mismos.

[0315] Se pueden definir límites de control que identifiquen el intervalo o umbral de una propiedad de la muestra de entrada o después de un o más pasos en los métodos descritos en el presente documento, y dicten o determinen el siguiente paso con el fin de optimizar el enriquecimiento de las células efectoras inmunitarias deseadas y asegurar el éxito de la fabricación y la calidad del producto.. En realizaciones, los límites de control pueden ser diferentes dependiendo del tipo de cáncer del sujeto del que se obtiene la muestra de entrada. A modo de ejemplo, los límites de control para la presencia de monocitos en la muestra de entrada obtenida de un sujeto que tiene ALL o DLBCL son los siguientes: si los monocitos son >20% de la muestra de entrada, por ejemplo células de sangre completa por leucoféresis, el método óptimo comprende la elutriación y/o la selección positiva de CD3/CD28 en condiciones de flujo; o si los monocitos son <20% de la muestra de entrada, se lava la muestra de entrada y se determina el método óptimo en base al contenido en blastos. En otro ejemplo, los límites de control para la presencia de blastocitos en la muestra de entrada obtenida de un sujeto que tiene ALL o DLBCL son los siguientes; si los blastocitos son ≥20% de leucoféresis entrante WBC, se debe realizar la elutriación (para eliminar monocitos, granulocitos y desechos celulares) y/o la selección negativa de CD19 modificada (para eliminar blastos) o se deberían realizar otras tecnologías para depletar blastos; o si los blastocitos son <20% de leucoféresis entrante, entonces se lavará el material de leucoféresis y se determinará el proceso en base al contenido en monocitos.

[0316] Después del enriquecimiento de las células efectoras inmunitarias adecuadas para la expresión de un CAR, en una realización, las células efectoras inmunitarias se estimulan, por ejemplo para proliferar, utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento, por ejemplo como se describe en la sección titulada "Activación y Expansión de Células Efectoras Inmunitarias".

[0317] Después del enriquecimiento de las células efectoras inmunitarias adecuadas para la expresión de un CAR y, opcionalmente, después de la estimulación y/o expansión como se describe en el presente documento, se puede introducir en las células efectoras inmunitarias un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo un CAR descrito en el presente documento. Los métodos para introducir un ácido nucleico, por ejemplo que codifica un CAR, son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento, por ejemplo como se describe en las secciones tituladas "Construcciones de Ácido Nucleico que Codifican un CAR", "Transfección de ARN" y "Métodos de Suministro No virales".

Fuentes de Células Efectoras Inmunitarias

[0318] Esta sección proporciona métodos o pasos adicionales para obtener una muestra de entrada que comprende células efectoras inmunitarias deseadas, aislar y procesar células efectoras inmunitarias deseadas, por ejemplo células T, y eliminar materiales no deseados, por ejemplo células no deseadas. Los métodos o pasos adicionales descritos en esta sección se pueden utilizar en combinación con cualquiera de elutriación, centrifugación por gradiente de densidad, selección en condiciones de flujo o paso de lavado mejorado descritos en las secciones precedentes.

[0319] A partir de un sujeto se puede obtener una fuentes de células, por ejemplo células T o células asesinas naturales (NK). Ejemplos de sujetos incluyen humanos, monos, chimpancés, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas no humanas de los mismos. Se pueden obtener células T de una serie de fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores.

[0320] En ciertos aspectos de la presente divulgación, se pueden obtener células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T, a partir de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el artesano experto y cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento, en cualquier combinación de pasos de los mismos. En un aspecto, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y, opcionalmente, colocar las células en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. En una realización, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no de todos los cationes divalentes. En otra realización, las células se lavan utilizando el paso de lavado mejorado descrito en el presente documento.

[0321] Los pasos de activación iniciales en ausencia de calcio pueden conducir a activación aumentada. Como apreciarían fácilmente los expertos en la materia, un paso de lavado se puede cumplir mediante métodos conocidos por los que están en la materia, como mediante uso de una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo el procesador celular Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) según las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de tampones biocompatibles

como, por ejemplo, PBS exento de Ca, exento de Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y las células se pueden resuspender directamente en medio de cultivo.

[0322] En un aspecto, las células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T, se aíslan de linfocitos de sangre periférica mediante lisis de glóbulos rojos y depleción de monocitos, por ejemplo mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga en contraflujo.

[0323] Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, selección de una subpoblación específica de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T, que son una población con depleción de células T reguladoras, con depleción de células CD25+, por ejemplo utilizando una técnica de selección negativa, por ejemplo descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la población con depleción de células T reguladoras contiene menos de 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de células CD25+.

[0324] En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo células, por ejemplo células T CD25+, se eliminan de la población utilizando un anticuerpo anti-CD25 o un fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25, por ejemplo IL-2. En una realización, el anticuerpo anti-CD25 o el fragmento del mismo, o el ligando de unión a CD25, se conjuga a un sustrato, por ejemplo una perla, o se reviste de otro modo en un sustrato, por ejemplo una perla. En una realización, el anticuerpo anti-CD25 o el fragmento del mismo se conjuga a un sustrato como se describe en el presente documento.

[0325] En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo células T CD25+, se eliminan de la población utilizando reactivo de depleción de CD25 de Miltenyi™. En una realización, la relación de células respecto a reactivo de depleción de CD25 es 1e7 células a 20 uL, o 1e7 células a 15 uL, o 1e7 células a 10 uL, o 1e7 células a 5 uL, o 1e7 células a 2,5 uL, o 1e7 células a 1,25 uL. En una realización, por ejemplo para células T reguladoras, por ejemplo depleción de CD25+, se utilizan más de 500 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 600, 700, 800 o 900 millones de células/ml.

[0326] En una realización, la población de células efectoras inmunitarias a depletar incluye alrededor de 6×10^9 células T CD25+. En otros aspectos, la población de células efectoras inmunitarias a depletar incluye alrededor de 1×10^9 a 1×10^{10} células T CD25+, y cualquier valor entero intermedio. En una realización, la población resultante con depleción de células T reguladoras tiene 2×10^9 células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+, o menos (por ejemplo, 1×10^9, 5×10^8, 1×10^8, 5×10^7, 1×10^7, o menos células CD25+).

[0327] En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo células CD25+, se eliminan de la población utilizando el sistema CliniMAC con un conjunto de tuberías de depleción, como por ejemplo la tubería 162-01. En una realización, el sistema CliniMAC se ejecuta en una configuración de depleción como, por ejemplo, DEPLETION2.1.

[0328] Sin desear ceñirse a una teoría particular, la disminución del nivel de reguladores negativos de células inmunes (por ejemplo la disminución del número de células inmunes no deseadas, por ejemplo células T_{REG}), en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación del producto de células que expresan CAR reduce significativamente el riesgo de recaída del sujeto. Por ejemplo, en la técnica se conocen métodos de depleción de células T_{REG}. Los métodos para la disminución de células T_{REG} incluyen, pero sin limitación, ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR (un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento), depleción de CD25, inhibidor de mTOR y combinaciones de los mismos.

[0329] En algunas realizaciones, los métodos de fabricación comprenden reducir el número (por ejemplo depleción) de células T_{REG} antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los métodos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, por ejemplo la muestra de aféresis con un anticuerpo anti-GITR y/o anti-CD25 (o fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25), por ejemplo para depletar células T_{REG} antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (por ejemplo célula T, célula NK).

[0330] Sin desear ceñirse a una teoría particular, la disminución del nivel de reguladores negativos de células inmunes (por ejemplo la disminución del número de células inmunes no deseadas, por ejemplo células T_{REG}), en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación del producto de células que expresan CAR puede reducir el riesgo de recaída del sujeto. Un sujeto se puede pretratar con una o más terapias que reducen células T_{REG} antes de la recogida de células para la fabricación del producto de células que expresan CAR, reduciendo de este modo el riesgo de recaída del sujeto para el tratamiento de células que expresan CAR. Los métodos de disminución de células T_{REG} incluyen, entre otros, la administración al sujeto de una o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, o una combinación de los mismos. Los métodos de disminución de células T_{REG} incluyen, entre otros, la administración al sujeto de una o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, inhibidor de mTOR, o una combinación de los mismos. La administración de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, o una combinación de los mismos, puede realizarse antes, durante o después de una infusión del producto de células que expresan CAR. La administración de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, inhibidor de mTOR, o una combinación de los mismos, puede realizarse antes, durante o después de una infusión del producto de células que expresan CAR.

[0331] En algunas realizaciones, los métodos de fabricación comprenden reducir el número (por ejemplo depleción) de células T_{REG} antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los métodos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, por ejemplo la muestra de aféresis con un anticuerpo anti-GITR y/o anti-CD25 (o fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25), por ejemplo para depletar células T_{REG} antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (por ejemplo célula T, célula NK).

[0332] Un sujeto se puede pretratar con ciclofosfamida antes de la recogida de células para la fabricación del producto de células que expresan CAR, reduciendo de este modo el riesgo de recaída del sujeto para el tratamiento de células que expresan CAR (por ejemplo tratamiento CTL019). Un sujeto se puede pretratar con un anticuerpo anti-GITR antes de la recogida de células para la fabricación del producto de células que expresan CAR (por ejemplo célula T o célula NK), reduciendo de este modo el riesgo de recaída del sujeto para el tratamiento de células que expresan CAR.

[0333] En una realización, el proceso de fabricación de célula que expresa CAR (por ejemplo célula T, célula NK) se modifica para depletar células TREG antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (por ejemplo célula T, célula NK) (por ejemplo un producto CTL019). En una realización, la depleción de CD25 se utiliza para depletar células TREG antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (por ejemplo célula T, célula NK) (por ejemplo un producto CTL019).

[0334] En una realización, la población de células a eliminar no son las células T reguladoras ni células tumorales, sino células que afectan negativamente de otro modo la expansión y/o función de células CART, por ejemplo células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por células supresivas potencialmente inmunitarias. En una realización, se prevé que tales células se eliminen simultáneamente con células T reguladoras y/o células tumorales, o después de dicha depleción o en otro orden.

[0335] Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir más de un paso de selección, por ejemplo más de un paso de depleción. El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede conseguir, por ejemplo, con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección celular a través de inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a los marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales puede incluir anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

[0336] Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir adicionalmente eliminar células de la población que expresa un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral que no comprende CD25, por ejemplo CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar de este modo una población de con depleción de células T reguladoras, por ejemplo con depleción de CD25+, y con depleción de antígeno tumoral, que son adecuadas para la expresión de un CAR, por ejemplo un CAR descrito en el presente documento. En una realización, las células que expresan antígenos tumorales se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, por ejemplo CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 o un fragmento del mismo y un anticuerpo de antígeno antitumoral o un fragmento del mismo se pueden adherir al mismo sustrato, por ejemplo perla, que se puede utilizar para eliminar las células o el anticuerpo anti-CD25 o un fragmento del mismo, o el anticuerpo de antígeno antitumoral o un fragmento del mismo se puede adherir a perlas separadas, una mezcla de las cuales se puede utilizar para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo células CD25+, y la eliminación de células que expresan el antígeno tumoral es secuencial y se puede producir, por ejemplo, en cualquier orden.

[0337] También se proporcionan métodos que incluyen la eliminación de células de la población que expresan un inhibidor de punto de control descrito en el presente documento, por ejemplo una o más células PD1+, células LAG3+ y células TIM3+, para proporcionar de este modo una población con depleción de células T reguladoras, por ejemplo con depleción de CD25+ y células con depleción de inhibidor de punto de control, por ejemplo células con depleción de PD1+, LAG3+ y/o TIM3+. Inhibidores de punto de control ejemplares incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF (por ejemplo TGF beta), por ejemplo como se describe en el presente documento. En una realización, las células que expresan el inhibidor de punto de control se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, por ejemplo CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 o un fragmento del mismo y un anticuerpo de inhibidor de punto de control o un fragmento del mismo se pueden adherir al mismo sustrato, por ejemplo perla, que se puede utilizar para eliminar las células o el anticuerpo anti-CD25 o un fragmento del mismo, o el anticuerpo de inhibidor de punto de control o un fragmento del mismo se puede adherir a perlas separadas, una mezcla de las cuales se puede utilizar para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo células CD25+, y la eliminación de células que expresan el inhibidor de punto de control es secuencial y se puede producir, por ejemplo, en cualquier orden.

[0338] Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir un paso de selección positiva. Por ejemplo, las células T se pueden aislar mediante incubación con perlas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo 3×28), como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un periodo de tiempo suficiente para la selección positiva de las

células T deseadas. En una realización, el periodo de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros intermedios. En una realización adicional, el periodo de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En otra realización, el periodo de tiempo es al menos 10 a 24 horas, por ejemplo 24 horas. Se pueden utilizar tiempos de incubación más largos para aislar células T en cualquier situación en la que haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, como en el aislamiento de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) del tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficiencia de captura de células T CD8+. De este modo, mediante simple acortamiento o prolongación del tiempo que se permite que las células T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o mediante aumento o disminución de la relación de perlas respecto a células T (como se describe adicionalmente en el presente documento, las subpoblaciones de células T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra del inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el proceso. Adicionalmente, mediante aumento o disminución de la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, las subpoblaciones de células T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos temporales deseados.

[0339] En una realización, se puede seleccionar una población de células T que exprese uno o más de IFN-ɣ, TNFα, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina u otras moléculas apropiadas, por ejemplo otras citoquinas. Los métodos de cribado para la expresión celular se pueden determinar, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la Publicación PCT Nº: WO 2013/126712.

[0340] Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y superficie (por ejemplo partículas como perlas). En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (por ejemplo aumentar la concentración de células) para asegurar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, en un aspecto se utiliza una concentración de 10 billones de células/ml, 9 billones/ml, 8 billones/ml, 7 billones/ml, 6 billones/ml o 5 billones/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de 1 billón de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml.

[0341] El uso de concentraciones elevadas puede dar lugar a un rendimiento celular, una activación celular y una expansión celular aumentadas. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, como células T CD28 negativas, o de muestras donde se presentan muchas células tumorales (por ejemplo sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una concentración elevada de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[0342] En un aspecto relacionado, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Mediante dilución significativa de la mezcla de células T y la superficie (por ejemplo partículas como perlas), se minimiza la interacción entre partículas y células. Esto selecciona células que expresan cantidades elevadas de antígenos deseados a unirse a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4+ expresan niveles más elevados de CD28 y se capturan más eficientemente que las células T CD8+ en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células utilizadas es 5×10^6/ml. En otros aspectos, la concentración utilizada puede ser de alrededor de 1×10^5/ml a 1×10^6/ml, y cualquier valor entero intermedio.

[0343] En otros aspectos, las células se pueden incubar en un rotador durante diferentes periodos de tiempo a diferentes velocidades a 2-10°C o a temperatura ambiente.

[0344] En una realización, una pluralidad de las células efectoras inmunitarias de la población no expresa diglicerol quinasa (DGK), por ejemplo es deficiente en DGK. En una realización, una pluralidad de las células efectoras inmunitarias de la población no expresa Ikaros, por ejemplo, es deficiente en Ikaros. En una realización, una pluralidad de las células efectoras inmunitarias de la población no expresa DGK ni Ikaros, por ejemplo, es deficiente en DGK e Ikaros.

[0345] Las células T para estimulación también se pueden congelar tras un paso de lavado. Sin desear ceñirse a la teoría, la congelación y el posterior paso de descongelación proporcionan un producto más uniforme mediante eliminación de granulocitos y hasta cierto grado monocitos en la población celular. Después del paso de lavado que elimina plasma y plaquetas, las células se pueden suspender en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina sérica humana o medio de cultivo que contiene 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina sérica humana y 7,5% de DMSO o 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% de dextrosa 5%, 0,45% de NaCl, 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina sérica humana y 7,5% de DMSO u otro medio de congelación de células adecuado que contiene, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A, las células se congelan entonces a -80°C a una tasa de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Pueden utilizarse otros medios de congelación controlada, así como congelación no controlada inmediatamente a -20° C o en nitrógeno líquido.

[0346] En ciertos aspectos, las células criopreservadas se descongelan y se lavan como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación utilizando los métodos de la presente invención.

[0347] En el contexto de la presente invención también se contempla la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un periodo de tiempo anterior al momento en el que las células expandidas como se describe en el presente documento podrían ser necesarias. Como tal, la fuente de las células que se va a expandir se puede recoger en cualquier momento necesario y las células deseadas, tales como células T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia con células efectoras inmunitarias para cualquiera de un cierto número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con células efectoras inmunitarias, tales como las descritas en el presente documento. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En ciertos aspectos, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y se congelan para uso posterior. En ciertos aspectos, las células T se pueden expandir, congelar y utilizar en un momento posterior. En ciertos aspectos, se recogen muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe en el presente documento pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, entre otros, tratamiento con agentes como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

[0348] Las células T se pueden obtener de un paciente directamente después de tratamiento que deja al sujeto con células T funcionales. En este sentido, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el periodo en el que los pacientes se recuperarían normalmente del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima o mejorarse por su capacidad de expansión ex vivo. Del mismo modo, después de la manipulación ex vivo utilizando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferente para un injerto mejorado y una expansión in vivo. Por lo tanto, dentro del contexto de la presente invención se contempla recoger células de la sangre, incluyendo células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en determinados aspectos, la movilización (por ejemplo la movilización con GM-CSF) y las pautas de acondicionamiento se pueden utilizar para crear una condición en un sujeto en donde se favorezca la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos de células particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Tipos de células ilustrativos incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

[0349] Las células efectoras inmunitarias que expresan una molécula de CAR, por ejemplo una molécula de CAR descrita en el presente documento, se pueden obtener a partir de un sujeto que ha recibido una baja dosis inmunoestimuladora de un inhibidor de mTOR. En una realización, la población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T, a modificar por ingeniería genética para expresar un CAR, se cosechan después de un tiempo suficiente o después de dosificación suficiente de la baja dosis inmunoestimuladora de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo células T, o la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo células T, en el sujeto o cosechada del sujeto han aumentado, al menos transitoriamente.

[0350] En otras realizaciones, la población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T, que se han modificado o se modificarán por ingeniería genética para expresar un CAR, se puede tratar ex vivo mediante contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo células T, o aumenta la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo células T.

[0351] Se reconoce que los métodos de la solicitud pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprenden 5% o menos, por ejemplo 2% o menos de suero AB humano, y emplear condiciones y composiciones de medios de cultivo conocidas, por ejemplo las descritas en Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" Clinical & Translational Immunology (2015) 4, e31; doi: 10. 103 8/cti.2014.3 1.

[0352] En una realización, los métodos de la solicitud pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprenden medio exento de suero. En una realización, el medio exento de suero es OpTmizer CTS (LifeTech), Immunocult XF (Stemcell technologies), CellGro (CellGenix), TexMacs (Miltenyi), Stemline (Sigma), Xvivo15 (Lonza), PrimeXV (Irvine Scientific) o StemXVivo (RandD systems). El medio exento de suero se puede complementar con un sustituto del suero como ICSR (remplazo de suero de células inmunitarias) de LifeTech. El nivel de sustituto del suero (por ejemplo ICSR) puede ser, por ejemplo, hasta 5%, por ejemplo alrededor de 1%, 2%, 3%, 4% o 5%.

[0353] En una realización, una población de células T es deficiente en diaglicerol quinasa (DGK). Las células deficientes en DGK pueden incluir células que no expresan ARN o proteína de DGK, o tienen una actividad de DGK reducida o inhibida. Las células deficientes en DGK se pueden generar mediante enfoques genéticos, por ejemplo administración de agentes ARN interferentes, por ejemplo ARNip, ARNhc, miARN, para reducir o impedir la expresión de DGK. Alternativamente, las células deficientes en DGK se pueden generar mediante tratamiento con inhibidores de DGK como se describe en el presente documento.

[0354] En una realización, una población de células T es deficiente en Ikaros. Las células deficientes en Ikaros incluyen células que no expresan ARN o proteína de Ikaros o tienen actividad de Ikaros reducida o inhibida, las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante enfoques genéticos, por ejemplo administración de agentes ARN interferentes, por ejemplo ARNip, ARNhc o miARN, para reducir o impedir la expresión de Ikaros. Alternativamente, las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante tratamiento con inhibidores de Ikaros, por ejemplo lenalidomida.

[0355] En realizaciones, una población de células T es deficiente en DGK y deficiente en Ikaros, por ejemplo no expresa DGK ni Ikaros, o tiene actividad de DGK e Ikaros reducida o inhibida. Tales células deficientes en DGK e Ikaros se pueden generar mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

[0356] En una realización, las células NK se obtienen del sujeto. En otra realización, las células NK son una línea celular NK, por ejemplo la línea celular NK-92 (Conkwest).

Células alogénicas que expresan CAR

[0357] En realizaciones descritas en el presente documento, la célula efectora inmunitaria puede ser una célula efectora inmunitaria alogénica, por ejemplo célula T o célula NK. Por ejemplo, la célula puede ser una célula T alogénica, por ejemplo una célula T alogénica que carece de expresión de un receptor de células T funcional (TCR) y/o antígeno leucocitario humano (HLA), por ejemplo HLA clase I y/o HLA clase II.

[0358] Una célula T que carece de un TCR funcional se puede modificar por ingeniería genética, por ejemplo, de modo que no exprese ningún TCR en su superficie, modificar por ingeniería genética de modo que no exprese una o más subunidades que comprenden un TCR funcional, por ejemplo modificar por ingeniería genética de modo que no exprese (o exhiba expresión reducida) de TCR alfa, TCR beta, TCR gamma, TCR delta, TCR épsilon y/o TCR zeta) o modificar por ingeniería genética de modo que produzca muy poco TCR funcional en su superficie. Alternativamente, la célula T puede expresar un TCR sustancialmente deteriorado, por ejemplo mediante expresión de formas mutadas o truncadas de una o más de las subunidades del TCR. El término "TCR sustancialmente deteriorado" significa que este TCR no provocará una reacción inmunitaria adversa en un hospedante.

[0359] Una célula T descrita en el presente documento se puede modificar por ingeniería genética, por ejemplo, de modo que no exprese un HLA funcional en su superficie. Por ejemplo, una célula T descrita en el presente documento se puede modificar por ingeniería genética de modo que la expresión de HLA en la superficie celular, por ejemplo HLA clase 1 y/o HLA clase II, se regule a la baja. En algunas realizaciones, la regulación a la baja de HLA se puede conseguir reduciendo o eliminando la expresión de microglobulina beta-2 (B2M).

[0360] En algunas realizaciones, la célula T puede carecer de un TCR funcional y un HLA funcional, por ejemplo HLA clase I y/o HLA clase II.

[0361] Las células T modificadas que carecen de expresión de un TCR y/o HLA funcional se pueden obtener mediante cualquier medio adecuado, incluyendo una inactivación o atenuación de una o más subunidades de TCR o HLA. Por ejemplo, la célula T puede incluir una atenuación de TCR y/o HLA utilizando ARNip, ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente (CRISPR), nucleasa efectora similar a activador de transcripción (TALEN) o endonucleasa con dedos de zinc (ZFN).

[0362] En algunas realizaciones, la célula alogénica puede ser una célula que no expresa o expresa a bajos niveles una molécula inhibidora, por ejemplo mediante cualquier método descrito en el presente documento. Por ejemplo, la célula puede ser una célula que no expresa o expresa a bajos niveles una molécula inhibidora, por ejemplo que puede disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR para montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF (por ejemplo TGF beta). La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo mediante inhibición del nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar un rendimiento de célula que expresa CAR. En realizaciones, se puede utilizar un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo ARNbc, por ejemplo un ARNip o ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente (CRISPR), una nucleasa efectora similar a activador de transcripción (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), por ejemplo como se describe en el presente documento.

ARNip y ARNhc para inhibir TCR o HLA

[0363] En algunas realizaciones, la expresión de TCR y/o la expresión de HLA se pueden inhibir utilizando ARNip y ARNhc que se dirigen a un ácido nucleico que codifica una TCR y/o HLA y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF beta), en una célula, por ejemplo célula T.

[0364] Los sistemas de expresión para ARNip y ARNhc y ARNhc ejemplares se describen, por ejemplo, en los párrafos 649 y 650 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

CRISPR para inhibir TCR o HLA

[0365] "CRISPR" o "CRISPR para TCR y/o HLA" o "CRISPR para inhibir TCR y/o HLA", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un conjunto de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente o a un sistema que comprende dicho conjunto de repeticiones. "Cas", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína asociada a CRISPR. Un sistema "CRISPR/Cas" se refiere a un sistema derivado de CRISPR y Cas que se puede utilizar para silenciar o mutar un gen TCR y/o HLA y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF beta), en una célula, por ejemplo célula T.

[0366] El sistema de expresión CRISPR/Cas y los usos del mismo se describen, por ejemplo, en los párrafos 651-658 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

TALEN para inhibir TCR y/o HLA

[0367] "TALEN" o "TALEN para HLA y/o TCR" o "TALEN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa efectora similar a un activador de transcripción, una nucleasa artificial que se puede utilizar para editar el gen HLA y/o TCR y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF beta), en una célula, por ejemplo célula T.

[0368] Se describen TALEN y usos de los mismos, por ejemplo, en los párrafos 659-665 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Nucleasa con dedos de zinc para inhibir HLA y/o TCR

[0369] "ZFN" o "Nucleasa con Dedos de Zinc" o "ZFN para HLA y/o TCR" o "ZFN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa con dedos de zinc, una nucleasa artificial que se puede utilizar para editar el gen HLA y/o TCR y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (por ejemplo PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF beta), en una célula, por ejemplo célula T.

[0370] Se describen ZFN y usos de la misma, por ejemplo, en los párrafos 666-671 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Expresión de telomerasa

[0371] Los telómeros desempeñan un papel crucial en la persistencia celular somática y su longitud se mantiene mediante telomerasa (TERT). La longitud de los telómeros en las células de CLL puede ser muy corta (Roth et al., "Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38 chronic lymphocytic leukaemia" British Journal of Haematology, 143, 383-386., 28 de agosto de 2008), y puede ser aún más corta en las células que expresan CAR producidas, por ejemplo células CART19, lo que limita su potencial de expansión después de la transferencia adoptiva a un paciente. La expresión de telomerasa puede rescatar a las células que expresan CAR del agotamiento replicativo.

[0372] Sin desear ceñirse a una teoría particular, en algunas realizaciones, una célula T terapéutica tiene persistencia a corto plazo en un paciente, debido a los telómeros acortados en la célula T; en consecuencia, la transfección con un gen de telomerasa puede alargar los telómeros de la célula T y mejorar la persistencia de la célula T en el paciente. Véase Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007). Por lo tanto, en una realización, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo una célula T, expresa ectópicamente una subunidad de telomerasa, por ejemplo la subunidad catalítica de telomerasa, por ejemplo TERT,

por ejemplo hTERT. En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un método de producción de una célula que expresa CAR que comprende la puesta en contacto de una célula con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, por ejemplo la subunidad catalítica de telomerasa, por ejemplo TERT, por ejemplo hTERT. La célula se puede poner en contacto con el ácido nucleico antes, simultáneamente con o después de ponerse en contacto con una construcción que codifica un CAR.

[0373] La expresión de telomerasa puede ser estable (por ejemplo el ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula) o transitoria (por ejemplo el ácido nucleico no se integra y la expresión disminuye después de un periodo de tiempo, por ejemplo varios días). La expresión estable se puede conseguir mediante la transfección o transducción de la célula con ADN que codifica la subunidad de la telomerasa y un marcador seleccionable, y la selección de los integrantes estables. Como alternativa o en combinación, la expresión estable se puede conseguir mediante la recombinación específica del sitio, por ejemplo utilizando el sistema Cre/Lox o FLP/FRT.

[0374] La expresión transitoria puede implicar la transfección o transducción con un ácido nucleico, por ejemplo ADN o ARN, como ARNm. En algunas realizaciones, la transfección transitoria con ARNm evita la inestabilidad genética asociada a veces con la transfección estable con TERT. La expresión transitoria de la actividad de la telomerasa exógena se describe, por ejemplo, en la Solicitud Internacional WO2014/130909. En las realizaciones, la transfección con ARNm de una subunidad de la telomerasa se realizará acuerdo con la plataforma de RNA Therapeutics™ comercializada por Moderna Therapeutics. Por ejemplo, el método puede ser un método descrito en las Patentes de EE. UU. Nº 8710200, 8822663, 8680069, 8754062, 8664194 u 8680069.

[0375] En una realización, hTERT tiene la secuencia de aminoácidos de GenBank Protein ID AAC51724.1 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Número 4, 22 de agosto de 1997, Páginas 785-795):

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDP

AAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFA

LLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFV

LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPA

PGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPA

RPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYS

SGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPL

FLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQ

LLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQEL

TWKMSVRGCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTET

TFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFI

PKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLG

LDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYC

VRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSL

NEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAG

IRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEAL

GGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRR

KLFGVLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPT

FFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVT

YVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD
(SEQ ID NO: 108)

[0376] En una realización, la hTERT tiene una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 108. En una realización, la hTERT tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 108.

En una realización, la hTERT comprende una deleción (por ejemplo de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos. En una realización, la hTERT comprende una secuencia de aminoácidos transgénica (por ejemplo de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos.

[0377] En una realización, la hTERT está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de GenBank Nº AF018167 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Número 4, 22 de agosto de 1997, Páginas 785-795):

```
  1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc ccccgcgatgc
 61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc
121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg
181 gggaccccgc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgcgtg ccctgggacg
```

```
 241 cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg
 301 ccccgagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg
 361 cgctgctgga cggggccccgc ggggggcccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct
 421 acctgccccaa cacggtgacc gacgcactgc ggggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc
 481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg
 541 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctccca
 601 ctcaggcccg gccccgccca cacgctagtg gaccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg
 661 cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtccga
 721 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caacaggccc aggcgtggcg
 781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga
 841 cgcgtggacc gagtgaccgt ggtttctgtg tggtgtcacc tgccagaccc gccgaacaag
 901 ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacccatcc gtgggccgcc
 961 agcaccacgc gggcccccca tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgtc
1021 cccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactcctc aggcgacaag gagcagctgc
1081 ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgctcgg aggctcgtgg
1141 agaccatctt tctgggttcc aggccctgga tgccagggac tccccgcagg ttgccccgcc
1201 tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc
1261 agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgccccct gcgagctgcg gtcaccccag
1321 cagccggtgt ctgtgccccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggccccc gaggaggagg
1381 acacagaccc ccgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt
1441 acggcttcgt gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgccccc aggcctctgg ggctccaggc
1501 acaacgaacg ccgattcctc aggaacacca agaagtttcat ctccctgggg aagcatgcca
1561 agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct tggctgcgca
1621 ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatcctgg
1681 ccaagttcct gcactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt
1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga
1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggccccgc cctgctgacg tccagactcc
1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag
1981 ccagaacgtt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg aaggcactgt
2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtgctgg
2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg gccccaggacc
2161 cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatccccc
2221 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgcgtgc
2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc
2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg
2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctcctccctg aatgaggcca
2461 gcagtggcct cttcgacgtc ttcctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcatcaggg
2521 gcaagtccta cgtccagtgc cagggcatcc cgcagggctc catcctctcc acgctgctct
2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc
2641 tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtgacacc tcacctcacc cacgcgaaaa
2701 ccttcctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aacttgcgga
2761 agacagtggt gaacttccct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgttcaga
2821 tgccggccca cggcctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccgg accctggagg
2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc accttcaacc
2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggcgtcttg cggctgaagt
3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct
3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc
3121 atcagcaagt tgggaagaac ccccacattt tcctgcgcgt catctctgac acggccttcc
3181 tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg
3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc
3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggtc actcaggaca gcccagacgc
3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg
3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc accgccccac agccaggccg
3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgt cccagggagg gaggggcggc
3541 ccacacccag gcccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaacggc
3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctgcgcgtcg gctccacccc
3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc
3781 cccagattcg ccattgttca ccccctcgccc tgccctcctt tgccttccac ccccaccatc
3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt
3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg
```

```
    3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa
    4021 aaaaaaa
(SEQ ID NO: 23)
```

[0378] En una realización, la hTERT está codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 23. En una realización, la hTERT está codificada por un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 23.

Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)

[0379] Los métodos de la presente invención proporcionan células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) que se pueden modificar por ingeniería genética para contener uno o más CAR que dirigen las células efectoras inmunitarias al cáncer. Esto se consigue mediante un domino de unión a antígeno en el CAR que es específico para un antígeno asociado con el cáncer. Existen dos clases de antígenos asociados al cáncer (antígenos tumorales) que pueden ser diana de los CAR descritos en el presente documento: (1) antígenos asociados al cáncer que se expresan en la superficie de las células cancerosas; y (2) antígenos asociados al cáncer que en sí mismos son intracelulares, sin embargo, un fragmento de dicho antígeno (péptido) se presenta en la superficie de las células cancerosas por MHC (complejo mayor de histocompatibilidad).

[0380] En consecuencia, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo obtenida mediante un método descrito en el presente documento, se puede modificar por ingeniería genética para contener un CAR que se dirija a uno de los siguientes antígenos asociados con cáncer (antígenos tumorales): CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, PSMA, ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, mesotelina, IL-11Ra, PSCA, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-beta, PRSS21, SSEA-4, CD20, receptor de folato alfa, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, EGFR, NCAM, prostasa, PAP, ELF2M, Efrina B2, receptor de IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, tirosinasa, EphA2, fucosil GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-acetil-GD2, receptor de folato beta, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, áido plisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, legumaína, HPV E6,E7, MAGE-A1, MAGE A1, ETV6-AML, proteína de esperma 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, antígeno relacionado con Fos 1, p53, p53 mutante, prosteína, survivina y telomerasa, PCTA-1/Galectina 8, MelanA/MART1, Ras mutante, hTERT, puntos de rotura de translocación de sarcoma, ML-IAP, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, receptor de andrógeno, Cyclin B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, telomerasa humana transcriptasa inversa, RU1, RU2, carboxil esterasa intestinal y mut hsp70-2.

CAR biespecíficos

[0381] En una realización una molécula de anticuerpo multiespecífica es una molécula de anticuerpo biespecífica. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífica está caracterizada por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un segundo epítopo. En una realización, el primer y el segundo epítopos están en el mismo antígeno, por ejemplo la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una realización, el primer y el segundo epítopos se solapan. En una realización, el primer y el segundo epítopos no se solapan. En una realización, el primer y el segundo epítopos están en diferentes antígenos, por ejemplo en diferentes proteínas (o diferentes subunidades de una proteína multimérica). En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítopo y una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un semianticuerpo que tiene especificidad de unión para un primer epítopo, y un semianticuerpo que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un semianticuerpo, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítopo, y un semianticuerpo, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítopo, y un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo.

[0382] En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífico (por ejemplo biespecífico o triespecífico). Los protocolos para generar moléculas de anticuerpos biespecíficos o heterodiméricos, y diversas configuraciones para moléculas de anticuerpos biespecíficos, se describen, por ejemplo en los párrafos 455-458 del documento WO2015/142675, presentado el 13 de marzo de 2015.

[0383] En un aspecto, la molécula de anticuerpo biespecífico está caracterizada por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina, por ejemplo un scFv que tiene especificidad de unión para CD19, por ejemplo comprende un scFv como se describe en el presente documento, o comprende las CDR de cadena ligera y/o las CDR de cadena pesada de un scFv descrito en el presente documento, y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo en un antígeno diferente.

TCR quimérico

[0384] En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención (por ejemplo anticuerpos CD19 y fragmentos) se pueden injertar en uno o más dominios constantes de una cadena de receptores de células T ("TCR"), por ejemplo una cadena alfa de TCR o beta de TCR, para crear un TCR quimérico. Sin ceñirse a la teoría, se cree que los TCR quiméricos señalizarán a través del complejo TCR tras la unión al antígeno. Por ejemplo, un scFv tal como se divulga en el presente documento, puede injertarse en el dominio constante, por ejemplo al menos una porción del dominio constante extracelular, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático, de

una cadena de TCR, por ejemplo la cadena alfa de TCR y/o la cadena beta de TCR. Como otro ejemplo, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un dominio VL como se describe en el presente documento, puede injertarse al dominio constante de una cadena alfa de TCR, y un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un dominio VH como se describe en el presente documento, puede injertarse al dominio constante de una cadena beta de TCR (o, como alternativa, un dominio VL puede injertarse en el dominio constante de la cadena beta de TCR y un dominio VH puede injertarse en una cadena alfa de TCR). Como otro ejemplo, las CDR de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden injertarse en una cadena alfa y/o beta de TCR para crear un TCR quimérico. Por ejemplo, las LCDR divulgadas en el presente documento se pueden injertar en el dominio variable de una cadena alfa de TCR y las HCDR divulgadas en el presente documento se pueden injertar en el dominio variable de una cadena beta de TCR, o viceversa. Tales TCR quiméricos pueden producirse, por ejemplo mediante métodos conocidos en la técnica (Por ejemplo, Willemsen RA et al., Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al., Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al., Gene Ther. abril de 2012;19(4):365-74).

Armazones no anticuerpos

[0385] En realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende un armazón no anticuerpo, por ejemplo una fibronectina, anquirina, anticuerpo de dominio, lipocalina, inmunofármaco modular pequeño, maxicuerpo, proteína A o afilina. El armazón no anticuerpo tiene la capacidad de unirse al antígeno diana en una célula. En las realizaciones, el dominio de unión al antígeno es un polipéptido o fragmento de este de una proteína de origen natural expresada en una célula. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un armazón no anticuerpo. Puede emplearse una amplia diversidad de armazones no anticuerpos siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente al antígeno diana en una célula diana.

[0386] Armazones no anticuerpos incluyen: fibronectina (Novartis, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), inmunofármacos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

[0387] En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende el dominio extracelular, o un fragmento de unión a contraligando del mismo, de una molécula que une un contraligando en la superficie de una célula diana.

[0388] Las células efectoras inmunes pueden comprender una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpo o fragmento de anticuerpo, TCR o fragmento de TCR) que se une específicamente a un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral descrito en el presente documento, y un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador y/o un dominio de señalización primario, por ejemplo una cadena zeta. Como se describe en otro punto, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir transducir una célula, por ejemplo de la población de células con depleción de células T reguladoras, con un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo un CAR descrito en el presente documento.

[0389] En aspectos específicos, un CAR comprende un dominio de scFv, en donde el scFv puede estar precedido de una secuencia líder opcional como la proporcionada en SEQ ID NO: 1, y seguido de una secuencia de bisagra opcional como la proporcionada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:36 o SEQ ID NO:38, una región transmembrana como la proporcionada en SEQ ID NO:6, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:16 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO: 10, por ejemplo en donde los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión.

[0390] En un aspecto, una construcción de CAR ejemplar comprende una secuencia líder opcional (por ejemplo una secuencia líder descrita en el presente documento), un dominio de unión al antígeno extracelular (por ejemplo un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento), una bisagra (por ejemplo una región bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (por ejemplo un dominio transmembrana descrito en el presente documento) y un dominio estimulador intracelular (por ejemplo un dominio de estimulador intracelular descrito en el presente documento). En un aspecto, una construcción de CAR ejemplar comprende una secuencia líder opcional (por ejemplo una secuencia líder descrita en el presente documento), un dominio de unión al antígeno extracelular (por ejemplo un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento), una bisagra (por ejemplo una región bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (por ejemplo un dominio transmembrana descrito en el presente documento), un dominio de señalización coestimulador intracelular (por ejemplo un dominio de señalización coestimulador descrito en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario intracelular (por ejemplo un dominio de señalización primario descrito en el presente documento).

[0391] Se proporciona una secuencia líder ejemplar como SEQ ID NO: 1. Se proporciona una secuencia bisagra/espaciadora ejemplar como SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:36 o SEQ ID NO:38. Se proporciona una secuencia del dominio transmembrana ejemplar como SEQ ID NO: 6. Se proporciona una secuencia del dominio de señalización intracelular de la proteína 4-1BB ejemplar como SEQ ID NO: 7. Se proporciona una secuencia ejemplar del dominio

de señalización intracelular de CD27 como SEQ ID NO: 16. Se proporciona una secuencia del dominio CD3zeta ejemplar como SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

[0392] En un aspecto, la célula efectora inmune comprende una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno, en donde la secuencia es contigua y se encuentra en el mismo marco de lectura que la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular ejemplar que puede utilizarse en CAR incluye, entre otros, uno o más dominios de señalización intracelular de, por ejemplo, CD3-zeta, CD28, CD27, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

[0393] Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, como, por ejemplo mediante cribado de bibliotecas de células que expresan la molécula de ácido nucleico, mediante derivación de la molécula de ácido nucleico de un vector conocido para incluir la misma o mediante aislamiento directamente de células y tejidos que contienen la misma, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico de interés se puede producir sintéticamente en lugar de clonarse.

[0394] Los ácidos nucleicos que codifican un CAR se pueden introducir en las células efectoras inmunitarias utilizando, por ejemplo una construcción de vector retroviral o lentiviral.

[0395] Los ácidos nucleicos que codifican un CAR también se pueden introducir en la célula efectora inmunitaria, por ejemplo una construcción de ARN que se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para uso en transfección implica transcripción *in vitro* (IVT) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguida de adición de poliA para producir una construcción que contiene una secuencia no traducida en 3' y 5' ("UTR") (por ejemplo una UTR en 3' y/o 5' descrita en el presente documento), una caperuza 5' (por ejemplo una caperuza 5' descrita en el presente documento y/o un Sitio de Entrada de Ribosoma Interno (IRES) (por ejemplo un IRES descrito en el presente documento), el ácido nucleico a expresar y una cola de poliA, generalmente de 50-2000 bases de longitud (por ejemplo descrita en los Ejemplos, por ejemplo SEQ ID NO:35). El ARN producido de este modo puede transfectar eficientemente diferentes clases de células. En una realización, la plantilla incluye secuencias para el CAR. En una realización, un vector de ARN de CAR se transduce a una célula, por ejemplo una célula T, por electroporación.

Dominio de unión a antígenos

[0396] En un aspecto, una pluralidad de células efectoras inmunitarias, por ejemplo la población con depleción de células T reguladoras, incluye un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un elemento de unión específico de la diana, también conocido como dominio de unión a antígeno. La elección del elemento de unión depende del tipo y del número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como marcador de la superficie celular en células diana asociadas con una patología particular. Por tanto, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión al antígeno en un CAR descrito en el presente documento incluyen los asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas.

[0397] En un aspecto, la porción de CAR que comprende el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión a antígeno que se dirige a un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral descrito en el presente documento.

[0398] El dominio de unión a antígeno puede ser cualquier dominio que se una al antígeno. incluyendo, entre otros, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento funcional del mismo, incluyendo, entre otros, un anticuerpo de dominio único como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de nanocuerpo derivado de camélido, y a un armazón alternativo conocido en la técnica que funciona como dominio de unión a antígenos, como un dominio de fibronectina recombinante, un receptor de células T (TCR), o un fragmento del mismo, por ejemplo TCR de cadena simple y similares. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión al antígeno se derive de la misma especie en la que finalmente se utilizará el CAR. Por ejemplo, para uso en humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión al antígeno del CAR comprenda residuos humanos o humanizados para el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0399] En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento del mismo, por ejemplo un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera enumeradas en la Tabla 1. La secuencia de engarce que une las cadenas variable pesada y variable ligera pueden ser, por ejemplo, cualquiera de las secuencias de engarce descritas en el presente documento o, como alternativa, puede ser GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 104).

Tabla 1: Dominios de unión de anticuerpos anti-CD19

CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRL HSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKG
	(SEQ ID NO: 39).	GGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PGKGLEWIGVIWGSETTYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
CD19	huscFv2 (SEQ ID NO: 40)	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsg gggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgse ttyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgt lvtvss
CD19	huscFv3 (SEQ ID NO: 41)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy ssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleik
CD19	huscFv4 (SEQ ID NO: 42)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy qsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleik
CD19	huscFv5 (SEQ ID NO: 43)	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsg gggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigv iwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdy wgqgtlvtvss
CD19	huscFv6 (SEQ ID NO: 44)	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsg gggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigv iwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdy wgqgtlvtvss

CD19	huscFv7 (SEQ ID NO: 45)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy ssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyq qkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpy tfgqgtkleik
CD19	huscFv8 (SEQ ID NO: 46)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy qsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyq qkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpy tfgqgtkleik
CD19	huscFv9 (SEQ ID NO: 47)	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsg gggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigv iwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdy wgqgtlvtvss
CD19	Hu scfv10 (SEQ ID NO: 48)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy nsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyq qkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpy tfgqgtkleik
CD19	Hu scFv11 (SEQ ID NO: 49)	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgip arfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsg gggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgse ttyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgt lvtvss
CD19	Hu scfv12 (SEQ ID NO: 50)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyy nsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtv ssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgq aprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqg tkleik
CD19	muCTL0 19 (SEQ ID NO:	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvp srfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsggggsg gggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwgse

	51)	ttyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvss

Tabla 2: Dominios de unión de anticuerpos anti-CD19 adicionales

Anticuerpo	Secuencia VH	Secuencia de VL
SSJ25-C1	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVT (SEQ ID NO: 3)	ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFYFCQYNRYPYTSGGGTKLEIKRRS (SEQ ID NO: 4)

Tabla 2A: Dominios de unión de anticuerpos anti-CD19 murinos adicionales

scFv mCAR1	SEQ ID NO: 124	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTGGGSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQYNRYPYTSFFFTKLEIKRRS
scFv mCAR2	SEQ ID NO: 125	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSE
scFv mCAR3	SEQ ID NO: 126	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

[0400] Según la presente divulgación se puede utilizar cualquier CAR de CD19, por ejemplo el dominio de unión al antígeno CD19 de cualquier CAR de CD19 conocido. Por ejemplo, LG-740; CAR de CD19 descrito en la Pat. de EE.UU Nº 8,399,645; Pat. de EE.UU. Nº 7,446,190; Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2):255-260(2012); Cruz et al., Blood 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens et al., Blood, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., Blood 116(20):4099-

102 (2010); Kochenderfer et al., Blood 122 (25):4129-39(2013); y 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (May 15-18, Salt Lake City) 2013, Abst 10.

[0401] Los antígenos diana ejemplares que pueden ser diana utilizando las células que expresan CAR incluyen, sin limitación, CD19, CD123, EGFRvIII, mesotelina, entre otros, como se describe, por ejemplo en los documentos WO 2014/130635, WO 2014/130657 y WO 2015/090230.

[0402] En una realización, la célula T con CAR que se une específicamente a CD19 tiene la designación USAN TISAGENLECLEUCEL-T. CTL019 se produce mediante una modificación génica de las células T mediada por la inserción estable a través de la transducción con un vector Lentiviral (LV) autoinactivador, deficiente en replicación, que contiene el transgén CTL019 bajo el control del promotor EF-1 alfa. CTL019 puede ser una mezcla de células T transgénicas positivas y negativas que se suministran al sujeto sobre la base de un porcentaje de células T transgénicas positivas.

[0403] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a CD19 humano, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno (por ejemplo un dominio de unión al antígeno humanizado) según la Tabla 3 del documento WO2014/153270.

[0404] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a CD123, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR (por ejemplo cualquiera de CAR1-CAR8) o un dominio de unión al antígeno según las Tablas 1-2 del documento WO 2014/130635.

[0405] En una realización, la molécula de CAR comprende un CAR de CD123 descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CD123 descrito en el documento US2014/0322212A1 o el documento US2016/0068601A1. En realizaciones, el CAR de CD123 comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2014/0322212A1 o el documento US2016/0068601A1.

[0406] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a EGFRvIII, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno según la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11 del documento WO 2014/130657.

[0407] En una realización, la molécula de CAR comprende una molécula de CAR de EGFRvIII descrita en el presente documento, por ejemplo un CAR de EGFRvIII descrito en el documento US2014/0322275A1. En realizaciones, el CAR de EGFRvIII comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2014/0322275A1.

[0408] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a mesotelina, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno según las Tablas 2-3 del documento WO 2015/090230.

[0409] En una realización, la molécula de CAR comprende un CAR de mesotelina descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de mesotelina descrito en el documento WO 2015/090230. En realizaciones, el CAR de mesotelina comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento WO 2015/090230.

[0410] En una realización, la molécula de CAR comprende una molécula de CAR de BCMA descrita en el presente documento, por ejemplo un CAR de BCMA descrito en el documento US-2016-0046724-A1. En realizaciones, el CAR de BCMA comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US-2016-0046724-A1.

[0411] En una realización, la molécula de CAR comprende un CAR de CLL1 descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CLL1 descrito en el documento US2016/0051651A1. En realizaciones, el CAR de CLL1 comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2016/0051651A1.

[0412] En una realización, la molécula de CAR comprende un CAR de CD33 descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CD33 descrito en el documento US2016/0096892A1. En realizaciones, el CAR de CD33 comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2016/0096892A1.

[0413] Según cualquier método descrito en el presente documento, en realizaciones, una molécula de CAR comprende un CAR de CD123 descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CD123 descrito en el documento US2014/0322212A1 o el documento US2016/0068601A1. En realizaciones, el CAR de CD123 comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2014/0322212A1 o el documento US2016/0068601A1. En otras realizaciones, una molécula de CAR comprende un CAR de CD19 descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CD19 descrito en el documento US-2015-0283178-A1, por ejemplo CTL019. En realizaciones, el CAR de CD19 comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US-2015-0283178-A1. En una realización, la molécula de CAR comprende una molécula de CAR de

BCMA descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de BCMA descrito en el documento US-2016-0046724-A1. En realizaciones, el CAR de BCMA comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US-2016-0046724-A1. En una realización, la molécula de CAR comprende un CAR de CLL1 descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CLL1 descrito en el documento US2016/0051651A1. En realizaciones, el CAR de CLL1 comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2016/0051651A1. En una realización, la molécula de CAR comprende un CAR de CD33 descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CD33 descrito en el documento US2016/0096892A1. En realizaciones, el CAR de CD33 comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2016/0096892A1. En una realización, la molécula de CAR comprende una molécula de CAR de EGFRvIII descrita en el presente documento, por ejemplo un CAR de EGFRvIII descrito en el documento US2014/0322275A1. En realizaciones, el CAR de EGFRvIII comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento US2014/0322275A1. En una realización, la molécula de CAR comprende un CAR de mesotelina descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de mesotelina descrito en el documento WO 2015/090230. En realizaciones, el CAR de mesotelina comprende un aminoácido o tiene una secuencia de nucleótidos mostrada en el documento WO 2015/090230.

[0414] Los CAR de CD19 ejemplares incluyen los CAR de CD19 descritos en el presente documento, por ejemplo en una o más tablas descritas en el presente documento, o un CAR anti-CD19 descrito en Xu et al. Blood 123.24(2014):3750-9; Kochenderfer et al. Blood 122.25(2013):4129-39, Cruz et al. Blood 122.17(2013):2965-73, NCT00586391, NCT01087294, NCT02456350, NCT00840853, NCT02659943, NCT02650999, NCT02640209, NCT01747486, NCT02546739, NCT02656147, NCT02772198, NCT00709033, NCT02081937, NCT00924326, NCT02735083, NCT02794246, NCT02746952, NCT01593696, NCT02134262, NCT01853631, NCT02443831, NCT02277522, NCT02348216, NCT02614066, NCT02030834, NCT02624258, NCT02625480, NCT02030847, NCT02644655, NCT02349698, NCT02813837, NCT02050347, NCT01683279, NCT02529813, NCT02537977, NCT02799550, NCT02672501, NCT02819583, NCT02028455, NCT01840566, NCT01318317, NCT01864889, NCT02706405, NCT01475058, NCT01430390, NCT02146924, NCT02051257, NCT02431988, NCT01815749, NCT02153580, NCT01865617, NCT02208362, NCT02685670, NCT02535364, NCT02631044, NCT02728882, NCT02735291, NCT01860937, NCT02822326, NCT02737085, NCT02465983, NCT02132624, NCT02782351, NCT01493453, NCT02652910, NCT02247609, NCT01029366, NCT01626495, NCT02721407, NCT01044069, NCT00422383, NCT01680991, NCT02794961 o NCT02456207.

[0415] En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos, tres (por ejemplo tres) CDR de cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, de un anticuerpo descrito en el presente documento (por ejemplo un anticuerpo descrito en los documentos WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 o WO2015/090230) y/o una, dos, tres (por ejemplo tres) CDR de cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, de un anticuerpo descrito en el presente documento (por ejemplo un anticuerpo descrito en los documentos WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 o WO2015/090230). En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada y/o una región de cadena ligera variable de un anticuerpo enumerado anteriormente.

[0416] En realizaciones, el dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno descrito en los documentos WO2015/142675, US-2015-0283178-A1, US-2016-0046724-A1, US2014/0322212A1, US2016/0068601A1, US2016/0051651A1, US2016/0096892A1, US2014/0322275A1 o WO2015/090230.

[0417] En realizaciones, el dominio de unión al antígeno se dirige a BCMA y se describe en el documento US-2016-0046724-A1.

[0418] En realizaciones, el dominio de unión al antígeno se dirige a CD19 y se describe en el documento US-2015-0283178-A1.

[0419] En realizaciones, el dominio de unión al antígeno se dirige a CD123 y se describe en los documentos US2014/0322212A1, US2016/0068601A1.

[0420] En realizaciones, el dominio de unión al antígeno se dirige a CLL1 y se describe en el documento US2016/0051651A1.

[0421] En realizaciones, el dominio de unión al antígeno se dirige a CD33 y se describe en el documento US2016/0096892A1.

[0422] Antígenos diana ejemplares que pueden ser diana utilizando las células de expresión de CAR incluyen, sin limitación, CD19, CD123, EGFRvIII, CD33, mesotelina, BCMA y GFR ALPHA-4, entre otros, como se describe, por ejemplo, en los documentos WO2014/153270, WO 2014/130635, WO2016/028896, WO 2014/130657, WO2016/014576, WO 2015/090230, WO2016/014565, WO2016/014535 y WO2016/025880.

[0423] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a CD19 humanizado, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno (por ejemplo un dominio de unión al antígeno humanizado) según la Tabla 3 del documento WO2014/153270. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de CD19 y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia) se especifican en el documento WO2014/153270.

[0424] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a CD123, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR (por ejemplo cualquiera de CAR1 a CAR8) o un dominio de unión al antígeno según las Tablas 1-2 del documento WO 2014/130635. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de CD123 y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia) se especifican en el documento WO 2014/130635.

[0425] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a CD123, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR (por ejemplo cualquiera de CAR123-1 a CAR123-4 y hzCAR123-1 a hzCAR123-32) o un dominio de unión al antígeno según las Tablas 2, 6 y 9 del documento WO2016/028896. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de CD123 y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia) se especifican en el documento WO2016/028896.

[0426] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a EGFRvIII, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno según la Tabla 2 o SEQ ID NO: 11 del documento WO 2014/130657. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de EGFRvIII y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia) se especifican en el documento WO 2014/130657.

[0427] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a CD33, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR (por ejemplo cualquiera de CAR33-1 a CAR-33-9) o un dominio de unión al antígeno según las Tablas 2 o 9 del documento WO2016/014576. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de CD33 y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia) se especifican en el documento WO2016/014576.

[0428] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a mesotelina, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno según las Tablas 2-3 del documento WO 2015/090230. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de mesotelina y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR VH; y una, dos, tres CDR VL según Kabat o Chothia), se especifican en el documento WO 2015/090230.

[0429] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a BCMA, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno según la Tabla 1 o 16, SEQ ID NO: 271 o SEQ ID NO: 273 del documento WO2016/014565. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de BCMA y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia) se especifican en el documento WO2016/014565.

[0430] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a CLL-1, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno según la Tabla 2 del documento WO2016/014535. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de CLL-1 y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia) se especifican en el documento WO2016/014535.

[0431] En otras realizaciones, las células que expresan CAR se pueden unir específicamente a GFR ALPHA-4, por ejemplo pueden incluir una molécula de CAR o un dominio de unión al antígeno según la Tabla 2 del documento WO WO2016/025880. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que codifican las moléculas de CAR de GFR ALFA-4 y los dominios de unión a antígeno (por ejemplo, incluidas una, dos, tres CDR de VH; y una, dos, tres CDR de VL según Kabat o Chothia), se especifican en el documento WO2016/025880.

[0432] En una realización, el dominio de unión al antígeno de cualquiera de las moléculas de CAR descritas en el presente documento (por ejemplo cualquiera de CD19, CD123, EGFRvIII, CD33, mesotelina, BCMA y GFR ALPHA-4) comprende una, dos, tres (por ejemplo tres) CDR de cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente y/o una, dos, tres (por ejemplo tres) CDR de cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, de un dominio de unión a antígeno enumerado anteriormente. En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo enumerado o descrito anteriormente.

[0433] En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos, tres (por ejemplo tres) CDR de cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente y/o una, dos, tres (por ejemplo

tres) CDR de cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente. En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo enumerado o descrito anteriormente.

[0434] En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno tumoral descrito en la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral se selecciona de uno o más de: CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (también denominado subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24); molécula 1 similar a lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII); ganglióside G2 (GD2); ganglióside GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); maduración de células B de miembros de la familia de receptores de TNF (BCMA); antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAcα-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); receptor huérfano de tipo tirosina quinasa 1 (ROR1); tirosina quinasa 3 de tipo Fms (FLT3); glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre prostáticas (PSCA); proteasa serina 21 (testisina o PRSS21); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno de Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario 4 específico de etapa (SSEA-4); CD20; receptor de folato alfa; tirosina-proteína quinasa receptora ERBB2 (Her2/neu); Mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión de células neurales (NCAM); prostasa; fosfatasa ácida prostática (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); efrina B2; proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP); receptor del factor insulínico de crecimiento 1 (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); subunidad de proteasoma (prosoma, macropaína), tipo beta, 9 (LMP2); glucoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén que consiste en la región de agrupamiento de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén viral de la leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina de tipo A (EphA2); fucosil GM1; molécula de adhesión de sialilo de Lewis (sLe); ganglióside GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); ganglióside o-acetil-GD2 (OAcGD2); receptor de folato beta; marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248); relacionado con el marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulador del tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; quinasa de linfoma anaplásico (ALK); ácido polisiálico; específico de placenta 1 (PLAC1); porción de hexasacárido de glucoceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor acoplado a proteína G 20 (GPR20); complejo de antígeno de células 6, locus K 9 (LY6K); receptor olfativo 51E2 (OR51E2); Proteína de Marco de Lectura Alternativa TCR Gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); antígeno de cáncer/testículo 1 (NY-ESO-1); antígeno de cáncer/testículo 2 (LAGE-1a); antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1); gen 6 variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína de espermatozoide 17 (SPA17); familia de antígenos X, miembro 1A (XAGE1); receptor de superficie celular de unión a angiopoyetina 2 (Tie 2); antígeno de testículo y cáncer de melanoma 1 (MAD-CT-1); antígeno de testículo y cáncer de melanoma 2 (MAD-CT-2); antígeno 1 relacionado con Fos; proteína tumoral p53 (p53); p53 mutada; prosteína; survivina; telomerasa; antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1 o Galectina 8), antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MelanA o MART1); mutante de sarcoma de rata (Ras); transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT); puntos de ruptura de translocación de sarcoma; inhibidor de melanoma de la apoptosis (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, gen de fusión de ETS y serina 2 (TMPRSS2)); N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17); proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3); receptor de andrógenos; ciclina B1; homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén viral de la mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc) (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por células T 3 (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina quinasa específica de células (LCK); proteína de anclaje de A quinasa 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de ruptura 2 de X (SSX2); receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE-1); renal ubicuo 1 (RU1); renal ubicuo 2 (RU2); legumaína; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPV E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; receptor 1 de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos (LAIR1); fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia de tipo molécula CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 de dominios de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2); tipo receptor de hormona de tipo mucina que contiene módulo de tipo EGF 2 (EMR2); antígeno de células 75 (LY75); Glipicano-3 (GPC3); tipo receptor de Fc 5 (FCRL5); y el polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda (IGLL1).

[0435] En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos, tres (por ejemplo tres) CDR de cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente y/o una, dos, tres (por ejemplo tres) CDR de cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente. En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo enumerado o descrito anteriormente.

[0436] En un aspecto, el dominio de unión a antígeno antitumoral es un fragmento, por ejemplo un fragmento variable de cadena simple (scFv). En un aspecto, el dominio de unión al antígeno asociado con cáncer anti-a descrito en el presente documento es un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo biespecífico) (por ejemplo Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos para uso en la invención se unen a un antígeno asociado con cáncer como se describe en el presente documento con afinidad de tipo salvaje o potenciada.

[0437] En algunos casos, los scFv se pueden preparar según un método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879- 5883). Las moléculas de scFv se pueden producir mediante enlace de regiones VH y VL conjuntamente utilizando engarces polipeptídicos flexibles. Las moléculas de scFv comprenden un engarce (por ejemplo un engarce Ser-Gly) con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. La longitud del engarce puede afectar en gran medida sobre la forma en la que las regiones variables de un scFv se pliegan e interaccionan. De hecho, si se emplea un engarce polipeptídico corto (por ejemplo entre 5-10 aminoácidos) se evita el plegamiento dentro de la cadena. También se requiere el plegamiento entre cadenas para unir las dos regiones variables y formar un sitio de unión de epítopos funcional. Para ejemplos de orientación y tamaño de engarce, véase, por ejemplo Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 y Publicación PCT Nº WO2006/020258 y WO2007/024715.

[0438] Un scFv puede comprender un engarce de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos de aminoácido entre sus regiones VL y VH. La secuencia de engarce puede comprender cualquier aminoácido que se produzca naturalmente. En otras realizaciones, la secuencia de engarce comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia de engarce comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina como $(Gly_4Ser)n$, donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1 (SEQ ID NO:25). En una realización, el engarce puede ser $(Gly_4\ Ser)_4$ (SEQ ID NO:27) o $(Gly_4\ Ser)_3$ (SEQ ID NO:28). La variación de la longitud del engarce puede mantener o potenciar la actividad, lo que da lugar a una eficacia superior en estudios de actividad.

[0439] En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno es un receptor de células T ("TCR") o un fragmento del mismo, por ejemplo un TCR de cadena simple TCR (scTCR). En la técnica se conocen métodos de preparación de tales TCR. Véase, por ejemplo, Willemsen RA et al, Gene Therapy 7: 1369-1377 (2000); Zhang T et al, Cancer Gene Ther 11: 487-496 (2004); Aggen et al, Gene Ther. 19(4):365-74 (2012). Por ejemplo, se puede modificar por ingeniería genética un scTCR que contenga los genes Vα y Vβ de un clon de célula T enlazado por un engarce (por ejemplo un péptido flexible). Este enfoque es muy útil para la diana asociada al cáncer que en sí misma es intracelular, sin embargo, el MHC presenta un fragmento de dicho antígeno (péptido) en la superficie de las células cancerosas.

Dominio transmembrana

[0440] Con respecto al dominio transmembrana, en varias realizaciones, un CAR se puede diseñar para comprender un dominio transmembrana que está adherido al dominio extracelular del CAR. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región transmembrana, por ejemplo uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que se derivó la transmembrana (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la que se derivó la transmembrana (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es uno que está asociado con uno de los otros dominios del CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de la membrana superficial, por ejemplo, para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana tiene capacidad de homodimerización con otro CAR en la superficie celular de una célula que expresa CAR. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede modificarse o sustituirse con el fin de minimizar las interacciones con los dominios de unión del compañero de unión nativo presente en el mismo CART.

[0441] El dominio transmembrana se puede derivar de una fuente natural o de una fuente recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio se puede derivar de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de señalizar a dominio(s) intracelular(es) siempre que el CAR se haya unido a una diana. Un dominio transmembrana de uso particular en esta invención puede incluir al menos la(s) región(regiones) transmembrana de, por ejemplo la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD27, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunas realizaciones, un dominio transmembrana puede incluir al menos la(s) región(regiones) transmembrana de, por ejemplo KIR2DS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100

(SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C o CD19.

[0442] En algunos casos, el dominio transmembrana puede estar adherido a la región extracelular del CAR, por ejemplo el dominio de unión al antígeno del CAR a través de una bisagra, por ejemplo una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana, por ejemplo una bisagra de IgG4 o una bisagra de CD8a. En una realización, la bisagra o el espaciador comprende (por ejemplo está formado por) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En un aspecto, el dominio transmembrana comprende (por ejemplo está formado por) un dominio transmembrana de SEQ ID NO: 6.

[0443] En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgG4. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG KM (SEQ ID NO:36). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCG

GACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG

GACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGT

CCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC

CCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG

CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGC

CTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAG

CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG

TCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG

AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACA

GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGC

AGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA

CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:37).

[0444] En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgD. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERE TKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVP TGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPA AQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPP PQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH (SEQ ID NO:38). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCC
AGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATA
CTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGA
AGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGT
CTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTT
ACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTG
CCGGAAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCA
ATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGC
CGGGACCTCTGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCACAGCGTCTG
ATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGC
TCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGG
CTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAAC
ACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCCACCCCAGCCGGGTTCTACCACATTCT
GGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACCTAGCCCCCAGCCAGCCACATA
CACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGT
CTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT (SEQ ID NO:103).

[0445] En un aspecto, el dominio transmembrana puede ser recombinante, en cuyo caso comprenderá predominantemente residuos hidrofóbicos como leucina y valina. En un aspecto, un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se puede encontrar en cada extremo de un dominio transmembrana recombinante.

[0446] Opcionalmente, un engarce oligopeptídico o polipeptídico corto, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un engarce particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el engarce comprende la secuencia de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 5). En algunas realizaciones, el enlazador está codificado por una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 8).

[0447] En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de KIR2DS2.

Dominio citoplasmático

[0448] El dominio citoplasmático de la región del CAR incluye un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular es generalmente responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha introducido el CAR.

[0449] Ejemplos de dominios de señalización intracelulares para uso en un CAR descrito en el presente documento incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR) y correceptores que actúan en conjunto para iniciar la transducción de señales después del compromiso del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia recombinante que tenga la misma capacidad funcional.

[0450] Es sabido que las señales generadas a través del TCR en sí mismas son insuficientes para la activación completa de las células T y que se requiere también una señal secundaria y/o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de las células T está mediada por dos clases diferentes de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través de TCR (dominios de señalización intracelular primarios) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (dominio citoplasmático secundario, por ejemplo un dominio coestimulador).

[0451] Un dominio de señalización primario regula la activación primaria del complejo TCR, ya sea de manera estimuladora o de manera inhibidora. Los dominios de señalización intracelular primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que son conocidos como motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptora o ITAM.

[0452] Ejemplos de ITAM que contienen dominios de señalización intracelular primarios, que son de uso particular en la invención, incluyen los de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta , CD3 épsilon, CD5, CD22,

CD79a, CD79b, CD278 (también conocidos como "ICOS"), FcεRI, DAP 10, DAP 12 y CD66d. En una realización, un CAR de uso en la invención comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo un dominio de señalización primario de CD3-zeta, por ejemplo una secuencia de CD3-zeta descrita en el presente documento.

[0453] En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio ITAM modificado, por ejemplo un dominio ITAM mutado que tiene actividad alterada (por ejemplo aumentada o disminuida) en comparación con el dominio ITAM nativo. En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio de señalización intracelular que contiene ITAM, por ejemplo un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM optimizado y/o truncado. En una realización, un dominio de señalización primario comprende uno, dos, tres, cuatro o más motivos ITAM.

Dominio de señalización Coestimulador

[0454] El dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender el dominio de señalización de CD3-zeta por sí mismo o se puede combinar con cualquier otro(s) dominio(s) de señalización intracelular deseado útil en el contexto de un CAR de uso en la invención. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender una porción de cadena CD3 zeta y un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En una realización, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de ICOS.

[0455] Una molécula coestimuladora puede ser una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocítica-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente a CD83, y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que la coestimulación de CD27 potencia la expansión, la función efectora y la supervivencia de células CART humanas in vitro y aumenta la persistencia de las células T humanas y la actividad antitumoral in vivo (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). Ejemplos adicionales de tales moléculas coestimuladoras incluyen CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp30, NKp44, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD 103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, NKG2D, NKG2C y PAG/Cbp.

[0456] Las secuencias de señalización intracelular dentro de la porción citoplasmática del CAR pueden estar enlazadas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un engarce de oligopéptido o polipéptido corto, por ejemplo entre 2 y 10 aminoácidos (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) de longitud puede formar el enlace entre secuencias de señalización intracelular. En una realización, se puede utilizar un doblete de glicina-serina como un engarce adecuado. En una realización, se puede utilizar un único aminoácido, por ejemplo una alanina, una glicina, como un engarce adecuado.

[0457] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender dos o más, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más dominios de señal coestimuladores. En una realización, los dos o más, por ejemplo 2, 3, 4, 5 o más dominios de señalización coestimuladores están separados por una molécula de engarce, por ejemplo una molécula de engarce descrita en el presente documento. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende dos dominios de señalización coestimuladores. En algunas realizaciones, la molécula de engarce es un residuo de glicina. En algunas realizaciones, el engarce es un residuo de alanina.

[0458] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En un aspecto, el dominio de señalización de 4-1BB es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 7. En un aspecto, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 9.

[0459] In un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos de QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 16). En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos de AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC CGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG CAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO: 14).

[0460] En un aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede comprender además un segundo CAR, por ejemplo un segundo CAR que incluye un diferente dominio de unión a antígeno, por ejemplo a la misma diana o a diferente diana (por ejemplo una diana que no sea un antígeno asociado con el cáncer descrito en el presente documento o un diferente antígeno asociado con el cáncer descrito en el presente documento, por ejemplo CD19, CD33, CLL-1, CD34, FLT3, o receptor de folato beta). En una realización, el segundo CAR incluye un dominio de unión a antígeno a una diana expresada por el mismo tipo de célula cancerosa que el antígeno asociado con el cáncer. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que se dirige a un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que se dirige a un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario pero no un dominio de señalización coestimulador. Sin desear ceñirse a la teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, por ejemplo 4-1BB, CD28, ICOS, CD27 u OX-40, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, por ejemplo CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad del CAR a las células en las que se expresan ambas dianas. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR antigénico asociado con el cáncer que incluye un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que se dirige a un diferente antígeno diana (por ejemplo un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario. En otra realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primaria y un segundo CAR que dirige a un antígeno distinto del primer antígeno diana (por ejemplo un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión antigénico al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señal coestimuladora.

[0461] En otro aspecto, la divulgación presenta una población de células que expresan CAR, por ejemplo células CART. En algunas realizaciones, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CAR.

[0462] Por ejemplo, en una realización, la población de células CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión antigénico a un antígeno asociado con el cáncer descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un diferente dominio de unión al antígeno, por ejemplo un dominio de unión antigénico a un antígeno asociado con el cáncer descrito en el presente documento que difiere del antígeno asociado con el cáncer unido por el dominio de unión al antígeno del CAR expresado por la primera célula.

[0463] Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión antigénico a un antígeno asociado con el cáncer descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión antigénico a una diana diferente a un antígeno asociado con el cáncer descrito en el presente documento. En una realización, la población de células que expresan CAR incluye, por ejemplo una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario.

[0464] En otro aspecto, la divulgación presenta una población de células en donde al menos una célula en la población expresa un CAR que tiene un dominio de unión antigénico a un antígeno asociado con el cáncer descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa otro agente, por ejemplo un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, por ejemplo PD-1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF (por ejemplo TGF beta). En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo de una molécula inhibidora como PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGF beta, o un fragmento de cualquiera de estos, y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo que comprende un domino coestimulador (por ejemplo 41BB, CD27, OX40 o CD28, por ejemplo como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD-1 o un fragmento de este, y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento).

[0465] Las secuencias de dominios de unión anti-CD19 se proporcionan en el presente documento en la Tabla 1. Se pueden generar construcciones de CAR completos utilizando cualquiera de los dominios de unión a antígeno descritos en la Tabla 1 con uno o más componentes de CAR adicionales proporcionados a continuación.

- Líder (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 1)
- MALPVTALLLPLALLLHAARP

- **líder (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 12)**

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCAT GCCGCTAGACCC

- **líder (secuencia de ácido nucleico 2) (SEQ ID NO: 127)**

ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGC TCGGCCC

- **líder (secuencia de ácido nucleico 3) (SEQ ID NO: 128)**

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGC CAGGCCG

- bisagra de CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 2)
- TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

- **bisagra de CD8 (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 13)**

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGT CGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAG TGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

- **bisagra de CD8 (secuencia de ácido nucleico 2) (SEQ ID NO: 129)**

ACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTC CCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTG CATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGAT

- transmembrana de CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 6)
- IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

- **transmembrana (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 17)**

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCA CTGGTTATCACCCTTTACTGC

- **transmembrana (secuencia de ácido nucleico 2) (SEQ ID NO: 130)**

ATCTACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCCTGCTGCTTTCA CTCGTGATCACTCTTTACTGT

- dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 7)
- KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

- **dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 18)**

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
GACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG
AAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

- **dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de ácido nucleico 2) (SEQ ID NO: 131)**

AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAG
GCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAGGA
GGAGGAAGGCGGCTGCGAACTG

- dominio de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 9)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

- **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 20)**

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAG
AACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG
CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG
CAGGCCCTGCCCCCTCGC

- **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico 2) (SEQ ID NO: 132)**

CGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGC
AGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGC
TGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAG
AATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCC
TATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGG
ACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATG
CAGGCCCTGCCGCCTCGG

- **dominio de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos; Secuencia de Referencia NCBI NM_000734.3) (SEQ ID NO:10)**

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

- **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico; Secuencia de Referencia NCBI NM_000734.3) (SEQ ID NO: 21)**

agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatcta
ggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccct
caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagg
ggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccc
tcgc

bisagra de IgG4 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 36)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGKM

bisagra de IgG4 (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 37)

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCT
GGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC
AGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCC
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAAC
AAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCT
CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGC
TGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCC
GGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

Promotor EF1 alfa

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGT
CCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTG
GCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAG
GGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCA
ACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGG
CCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGT
ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCC
TTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGC
TGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCG
ATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGG
CAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTG
GGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGC
GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC
GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGC
AAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGG
CCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG
TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT
GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTT
GGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCA
CACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC
TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT
GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA (SEQ ID NO: 11).

Gly/Ser (SEQ ID NO: 25)
GGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO: 26): Esta secuencia puede englobar 1-6 unidades repetidas de «Gly Gly Gly Gly Ser»
GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO: 27)
GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO: 28)
GGGGSGGGGS GGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO: 29)
GGGS

PoliA (SEQ ID NO:30): A5000

PoliA (SEQ ID NO:31): A100

PoliT (SEQ ID NO:32): T5000

PoliA (SEQ ID NO:33): A5000

PoliA (SEQ ID NO:34): A400

PoliA (SEQ ID NO:35)" A2000

- Gly/Ser (SEQ ID NO: 15): Esta secuencia puede abarcar 1-10 unidades repetidas "Gly Gly Gly Ser"
- GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS

[0466] Las construcciones de CAR de CD 19 ejemplares que se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento se muestran en la **Tabla 3:**

Tabla 3: Construcciones de CAR de CD19

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
Dominio scFv de CAR1	39	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS
103101 CAR1 scFv Soluble - nt	52	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR1 scFv Soluble - aa	64	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss**hhhhhhhh**

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
104875 CAR1-Completo - nt	90	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgca tacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac
		cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
104875 CAR 1-Completo - aa	77	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc**rasqdiskylnw**yqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qqgntlpyt**fgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp**dygvs**wirqppgkglewig**viwgsettyyssslks**rvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvsstttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 2		
Dominio scFv de CAR2	40	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
103102 CAR2 - scFv Soluble - nt	53	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacccctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatcccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
103102 CAR2 - scFv Soluble - aa	65	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss**hhhhhhhh**
104876 CAR 2 - Completo - nt	91	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgca tacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
104876 CAR 2 - Completo - aa	78	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc**rasqdiskylnw**yqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qqg** **ntlpyt**fgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslp**dygvs**wirqppgkglewig**viwgsettyyqsslks**rvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvsstttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 3		
Dominio scFv de CAR	41	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq
		qgntlpytfgqgtkleik
103104 CAR 3 - scFv Soluble - nt	54	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatctacc acacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac

CAR 3		
103104 CAR 3 - scFv Soluble - aa	66	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhh**
104877 CAR 3 - Completo - nt	92	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatctacc acacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactcccgctccaaggccacccacccctgccccgaccatcgcctct cagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgca tacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac
		tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg

CAR 3		
104877 CAR 3 - Completo - aa	79	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp**dygvs** wirqppgkglewig**viwgsettyyssslks**rvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlsc**rasqdiskyln**wyqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfc**qqgntlpyt**fgqgtkleikttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 4		
Dominio scFv de CAR4	42	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq qgntlpytfgqgtkleik
103106 CAR4 - scFv Soluble - nt	55	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatctacc acacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103106 CAR4 - scFv Soluble -aa	67	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg

CAR 3		
		tdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhh**
104878 CAR 4 - Completo - nt	93	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatcaatcttcccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatctacc acacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactcccgctccaaggccacccaccccctgccccgaccatcgcctct cagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgca tacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104878 CAR 4 - Completo - aa	80	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp**dygvs** wirqppgkglewig**viwgsettyyqsslks**rvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlsc**rasqdiskyln**wyqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfc**qqgntlpyt**fgqgtkleikttt**paprpptpaptias** qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

CAR 5		
Dominio scFv de CAR5	43	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggs ggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpp
		gkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR5 - scFv Soluble - nt	56	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcacccggcg agagggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctgatctaccacaccagccgcct ccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcgg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctg acttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgatttggggatcagagactactt actactcttcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR5 - scFv Soluble -aa	68	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss**hhhhhhhh**

CAR 5		
104879 CAR 5 - Completo - nt	94	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctctttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggcggaggcgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc
		tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104879 CAR 5 - Completo - aa	81	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc**rasqdiskylnw** yqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qqg** **ntlpyt**fgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp**dygvs**wirqppgkglewig**viwgsettyyssslks**rvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvsstttpaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 6		

CAR 5		
Dominio scFv de CAR6	44	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggs ggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99790 CAR6 - scFv Soluble - nt	57	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctgatctaccacaccagccgcct ccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcgg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctg acttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgatttggggatcagagactactt actaccagtcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99790 CAR6 - Soluble	69	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl
scFv - aa		tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss**hhhhhhhh**

CAR 5		
104880 CAR6 - Completo - nt	95	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggagggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104880 CAR6 - Completo - aa	82	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc**rasqdiskyln**w yqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc**ggg** **ntlpyt**fgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp**dygvs**wirqppgkglewig**viwgsettyyqsslks**rvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvsstttpaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

CAR 7		
Dominio scFv de CAR7	45	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq
		gtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik
100796 CAR7 - scFv Soluble - nt	58	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccgggaaagggcttgaatggattggtgtcatctggggttc tgaaaccacctactactcatcttcctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtca ccagccacctttctctttcacccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataccctccttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
100796 CAR7 - scFv Soluble - aa	70	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhh**

CAR 7

104881 CAR 7 Completo - nt 96

atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc
tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga
ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc
tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag
cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata
actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc
gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg
gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg
ggagcggtggaggtggctccggaggtggcggaagcgaaatcgtgatgacccagagc
cctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatc
acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccta
ggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagc
gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgagga
cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg
gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccacccaccccctgcc
ccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc
tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg
ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac

tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc
tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg
aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac
aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta
cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca
gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa
gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg
actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc
aggccctgccgcctcgg

CAR 7 104881 Completo - aa 83

MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp**dygvs**
wirqppgkglewig**viwgsettyyssslks**rvtiskdnsknqvslklssvtaadta
vyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs
patlslspgeratlsc**rasqdiskyln**wyqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfs
gsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qqgntlpyt**fgqgtkleikttpaprpptpa
ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly
ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay
kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae
ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

CAR 8

CAR 7		
Dominio scFv de CAR8	46	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik
100798 CAR8 - scFv Soluble - nt	59	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccgggaaagggcttgaatggattggtgtcatctggggttc tgaaaccacctactaccagtcttccctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtca ccagccaccctttctctttcacccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataccccttccttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcatcaccac
100798 CAR8 -	71	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta
scFv -aa Soluble		vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhh**

CAR 7		
104882 CAR 8 - Completo - nt	97	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccggaggcggtgggtcagaaatcgtgatgacccagagc cctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctacccttcttgtcgggcatc acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccta ggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgagga cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccacccaccccctgcc ccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104882 CAR 8 - Completo - aa	84	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp**dygvs** wirqppgkglewig**viwgsettyyqsslks**rvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlsc**rasqdiskyln**wyqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qqgntlpyt**fgqgtkleikttpaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

CAR 9		
Dominio scFv de CAR9	47	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs
		giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggs ggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR9 - scFv Soluble - nt	60	atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcacccggcg agagggcaacccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctgatctaccacaccagccgcct ccacagcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcgg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctg acttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgatttggggatcagagactactt actacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR9 - scFv Soluble - aa	72	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss**hhhhhhhh**

CAR 9		
105974 CAR 9 - Completo - nt	98	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggtgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg
		ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105974 CAR 9 - Completo - aa	85	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc**rasqdiskylnw** yqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qgg** **ntlpyt**fgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp**dygvs**wirqppgkglewig**viwgsettyynsslks**rvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvsstttpaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR10		

CAR 9		
Dominio scFv de CAR10	48	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik
100796 CAR10 - scFv Soluble - nt	61	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggacccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccgggaaagggcttgaatggattggtgtcatctggggttc tgaaaccacctactacaactcttccctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtca ccagccaccctttctctttcacccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcacgccttcactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataccctccttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
100796	73	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs
CAR10 - Soluble scFv - aa		wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhh**

CAR 9		
105975 CAR 10 Completo - nt	99	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctctttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggtgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105975 CAR 10 Completo - aa	86	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQDISKYLN**W YQQKPGQAPRLLIY**HTSRLHS**GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC**QQG** **NTLPYT**FGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGVSLP**DYGVS**WIRQPPGKGLEWIG**VIWGSETTYYNSSLKS**RVTISKDNSKN QVSLKLSSVTAADTAVYYCAK**HYYYGGSYAMDY**WGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CAR11		
Dominio scFv de CAR11	49	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggs ggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkgle wigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvss
103101 CAR11 - scFv Soluble - nt	62	Atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactacaattcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR11 - scFv Soluble - aa	74	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss**hhhhhhhh**

CAR11		
105976 CAR 11 Completo - nt	100	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccggaggtggcggaagcgaaatcgtgatgacccagagc cctgcaaccctgtccctttctcccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatc acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccta ggcttcttatctaccacacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgagga cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg
		gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccacccacccctgcc ccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105976 CAR 11 - Completo - aa	87	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLP**DYGVS** WIRQPPGKGLEWIG**VIWGSETTYYNSSLKS**RVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAK**HYYYGGSYAMDY**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQS PATLSLSPGERATLSC**RASQDISKYLN**WYQQKPGQAPRLLIY**HTSRLHS**GIPARFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC**QQGNTLPYT**FGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR12		

CAR11		
Dominio scFv de CAR12	50	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq qgntlpytfgqgtkleik
103104 CAR12 - scFv Soluble - nt	63	atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatctacc
		acacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR12 - scFv Soluble -aa	75	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhh**

CAR11		
105977 CAR 12 - Completo - nt	101	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctctttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcacccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactacaactcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgca tacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
105977 CAR 12 - Completo - aa	88	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQDISKYLN**W YQQKPGQAPRLLIY**HTSRLHS**GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC**QQG** **NTLPYT**FGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLP**DYGVS**WIRQPPGKGLEWIG**VIWGSETTYYNSSLKS**RVTISKDNSKNQVSLK
		LSSVTAADTAVYYCAK**HYYYGGSYAMDY**WGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CTL019		
CTL019 - scFv Soluble-marcador His - nt	22	atggccctgcccgtcaccgctctgctgctgcccttgctctgcttcttcatgcagc aaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgcctctcttggag acagggtgaccatttcttgtcgcgccagccaggacatcagcaagtatctgaactgg tatcagcagaagccggacggaaccgtgaagctcctgatctaccatacctctcgcct gcatagcggcgtgccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgattattctc tcactatttcaaatcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccagcagggt aataccctgccctacaccttcggaggagggaccaagctcgaaatcaccggtggagg aggcagcggcggtggagggtctggtggaggtggttctgaggtgaagctgcaagaat caggccctggacttgtggcccttcacagtccctgagcgtgacttgcaccgtgtcc ggagtctccctgcccgactacggagtgtcatggatcagacaacctccacggaaagg actggaatggctcggtgtcatctggggtagcgaaactacttactacaattcagccc tcaaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtcccaagtctttcttaag atgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtgctaagcactacta ctacggaggatcctacgctatggattactggggacaaggtacttccgtcactgtct cttcacaccatcatcaccatcaccatcac
CTL019 - scFv Soluble-marcador His - aa	76	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflk mnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvss**hhhhhhhh**
CTL019 Completo - nt	102	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgc caggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggag acagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattgg tatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagatt acactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctc tcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggt aatacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcgg tggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagt caggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctca ggggtctcattacccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaaggg tctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctc tcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtttttcttaaaa atgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattatta ctacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtct

CTL019		
		cctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcg cagccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgca cacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgccttggccggga cttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcaga aagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactca agaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaac cagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaa gagacgtggccgggaccctgagatgggggcgaaagccgagaaggaagaaccctcagg aaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagatt gggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtct cagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccctc gc
CTL019 Completo - aa	89	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflk mnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvsstttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CTL019	51	diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhtsrlhs gvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggs ggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkgle wlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyg gsyamdywgqgtsvtvss

[0467] En algunas realizaciones, las CDR se definen según el esquema de numeración Kabat, el esquema de numeración Chothia o una combinación de los mismos.

[0468] Las secuencias de CDR humanizada de los dominios scFv se muestran en la **Tabla 3A** para los dominios variables de cadena pesada y en la **Tabla 3B** para los dominios variables de cadena ligera. "ID" representa la respectiva SEQ ID NO para cada CDR.

Tabla 3A. CDR de dominio variable de cadena pesada (Kabat)

Candidato	FW	HCDR1	ID	CDR2H	ID	CDR3H	ID
murino_CART19		DYGVS	133	VIWGSETTYYNSALKS	134	HYYYGGSYAMDY	138

Candidato	FW	HCDR1	ID	CDR2H	ID	CDR3H	ID
humanizado_CART19 a	VH4	DYGVS	133	VIWGSETTYYSSSLKS	135	HYYYGGSYAMDY	138
humanizado_CART19 b	VH4	DYGVS	133	VIWGSETTYYSSSLKS	136	HYYYGGSYAMDY	138
humanizado_CART19 c	VH4	DYGVS	133	VIWGSETTYYNSSLKS	137	HYYYGGSYAMDY	138

Tabla 3B CDR de Dominio Variable de Cadena Ligera

Candidato	FW	CDR1L	ID	CDR2L	ID	CDR3L	ID
murino_CART19		RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141
humanizado_CART19 a	VK3	RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141
humanizado_CART19 b	VK3	RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141
humanizado_CART19 c	VK3	RASQDISKYLN	139	HTSRLHS	140	QQGNTLPYT	141

Coexpresión de CAR con otras moléculas o agentes

Coexpresión de un segundo CAR

[0469] En un aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede comprender además un segundo CAR, por ejemplo un segundo CAR que incluye un diferente dominio de unión al antígeno, por ejemplo a la misma diana (por ejemplo CD19) o una diana diferente (por ejemplo una diana diferente de CD19, por ejemplo una diana descrita en el presente documento). En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que se dirige a un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que se dirige a un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario pero no un dominio de señalización coestimulador. La colocación de un dominio de señalización coestimulador, por ejemplo 4-1BB, CD28, CD27, OX-40 o ICOS, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, por ejemplo CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad de CAR a las células en donde se expresan ambas dianas. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que fija como objetivo otro antígeno e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario. En otra realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que fija como objetivo otro antígeno e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

[0470] En una realización, la célula que expresa CAR comprende un XCAR descrito en el presente documento y un CAR inhibidor. En una realización, el CAR inhibidor comprende un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno que se encuentra en las células normales, pero no en las células cancerosas, por ejemplo células normales que también expresan X. En una realización, el CAR inhibidor comprende el dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR inhibidor puede ser un dominio intracelular de PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGF (por ejemplo TGF beta).

[0471] En una realización, cuando la célula que expresa CAR comprende dos o más CAR diferentes, el dominio de unión al antígeno de los diferentes CAR pueden ser tales que los dominios de unión al antígeno no interaccionan entre sí.. Por ejemplo, una célula que expresa un primer y un segundo CAR pueden tener un dominio de unión al antígeno del primer CAR, por ejemplo como un fragmento, por ejemplo un scFv, que no forma una asociación con el dominio de unión al antígeno del segundo CAR, por ejemplo el dominio de unión al antígeno del segundo CAR es un VHH.

[0472] En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un dominio único de unión al antígeno (SDAB), las moléculas incluyen moléculas cuyas regiones determinantes de complementariedad forman parte de un polipéptido de un dominio único. Los ejemplos incluyen, entre otros, dominios variables de cadena pesada, moléculas de unión naturalmente desprovistas de cadenas ligeras, dominios únicos derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, dominios modificados por ingeniería genética y armazones de dominio único diferentes a los derivados de anticuerpos. Las moléculas de SDAB pueden ser cualquiera de la técnica, o cualquier molécula futura de dominio único. Las moléculas de SDAB se pueden derivar de cualquier especie, incluyendo, entre otros, ratones, humanos, camellos, llamas, lampreas, peces, tiburones, cabras, conejos y bovinos. Este término también incluye moléculas de anticuerpos de dominio único que se producen naturalmente de especies distintas de camélidos y tiburones.

[0473] En un aspecto, una molécula de SDAB se puede derivar de una región variable de la inmunoglobulina hallada en peces, como, por ejemplo, la que se deriva del isotipo de inmunoglobulina conocido como el Nuevo Receptor de Antígeno (NAR) hallado en el suero de tiburón. Métodos para producir moléculas de dominio único derivadas de una región variable de NAR ("IgNARs") se describen en el documento WO 03/014161 y Streltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909.

[0474] Según otro aspecto, una molécula de SDAB es una molécula de unión a antígeno de dominio único que se produce naturalmente conocida como cadena pesada desprovista de cadenas ligeras. Moléculas de dominio único de este tipo se describen en el documento WO 9404678 y Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448, por ejemplo. Por razones de claridad, este dominio variable derivado de una molécula de cadena pesada desprovista de forma natural de cadena ligera se conoce en el presente documento como VHH o nanocuerpo para distinguirla del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas Una molécula de VHH de este tipo se puede derivar de especies de camélidos, por ejemplo en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de camélidos pueden producir moléculas de cadena pesada desprovistas de forma natural de la cadena ligera; las VHH de este tipo están dentro del alcance de la invención.

[0475] Las moléculas de SDAB pueden ser recombinantes, injertadas en CDR, humanizadas, camelizadas, desinmunizadas y/o generadas in vitro (por ejemplo seleccionadas por visualización de fagos).

[0476] También se ha descubierto que las células que tienen una pluralidad de receptores quiméricos incrustados en la membrana que comprenden un dominio de unión al antígeno cuyas interacciones entre el dominio de unión al antígeno de los receptores pueden ser indeseables, por ejemplo debido a que inhiben la capacidad de uno o más de los dominios de unión al antígeno para unirse a su antígeno afín. En consecuencia, en el presente documento se divulgan células que tienen un primer y un segundo receptor incrustado en la membrana quimérica no natural que comprenden dominios de unión al antígeno que minimizan tales interacciones. También se describen en el presente documento ácidos nucleicos que codifican un primer y un segundo receptor integrado en la membrana quimérico que no tiene un origen natural que comprende dominios de unión al antígeno que minimizan tales interacciones así como métodos para fabricar y utilizar tales células y ácidos nucleicos. En una realización, el dominio de unión al antígeno de uno del primer y el segundo receptores integrados en la membrana quiméricos que no tienen origen natural comprende un scFv, y el otro comprende un dominio de VH único, por ejemplo un dominio de VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio de VH único derivado de una secuencia humana o de ratón.

[0477] En algunas realizaciones, una composición del presente documento comprende un primer y un segundo CAR, en donde el dominio de unión al antígeno de uno del primer y del segundo CAR no comprende un dominio ligero variable ni un dominio pesado variable. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer y del segundo CAR es un scFV, y el otro no es un scFv. En una realización, el dominio de unión al antígeno de uno del primer y el segundo CAR comprende un dominio VH único, por ejemplo un dominio de VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio de VH único derivado de una secuencia humana o de ratón. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer y del segundo CAR comprende un nanocuerpo. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer y del segundo CAR comprende un dominio VHH de camélido.

[0478] En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer y el segundo CAR comprende un scFv y el otro comprende un dominio VH único, por ejemplo un dominio de VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio de VH único derivado de una secuencia humana o de ratón. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer y del segundo CAR comprende un scFV, y el otro comprende un nanocuerpo. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer y del segundo CAR comprende un scFV, y el otro comprende un VHH de camélido.

[0479] En algunas realizaciones, cuando está presente en la superficie de una célula, la unión del dominio de unión al antígeno del primer CAR a su antígeno afín no se reduce sustancialmente por la presencia del segundo CAR. En algunas realizaciones, la unión del dominio de unión al antígeno del primer CAR a su antígeno afín en presencia del segundo CAR es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, por ejemplo 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de unión del dominio de unión al antígeno del primer CAR a su antígeno afín en ausencia del segundo CAR.

[0480] En algunas realizaciones, cuando está presente en la superficie de una célula, los dominios de unión al antígeno del primer y del segundo CAR se asocian entre sí menos que si ambos fueran dominios de unión al antígeno scFv. En algunas realizaciones, los dominios de unión al antígeno del primer y del segundo CAR se asocian entre sí al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% menos, por ejemplo 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% menos que si ambos fueran dominios de unión al antígeno scFv.

Coexpresión de un Agente que Potencia la Actividad del CAR

[0481] En otro aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede expresar además otro agente, por ejemplo un agente que potencia la actividad o la aptitud de una célula que expresa CAR.

[0482] Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula que modula o regula, por ejemplo inhibe la función de las células T. En algunas realizaciones, la molécula que modula o regula la función de células T es una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, por ejemplo PD1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD 1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina o TGF beta.

[0483] En realizaciones, un agente, por ejemplo un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo un ARNbc, por ejemplo un ARNip o ARNhc; o por ejemplo una proteína inhibidora o sistema, por ejemplo repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente (CRISPR), un activador de transcripción como nucleasa efectora (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), por ejemplo como se describe en el presente documento, se puede utilizar para inhibir la expresión de una molécula que modula o regula, por ejemplo inhibe la función de las células T en la célula que expresa CAR. En una realización, el agente es un ARNhc, por ejemplo un ARNhc descrito en el presente documento. En una realización, el agente que modula o regula, por ejemplo inhibe la función de las células T, es inhibido dentro de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de una molécula que modula o regula, por ejemplo inhibe, la función de las células T está ligada al ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo todos los componentes, del CAR.

[0484] En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo de una molécula inhibidora como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina o TGF beta, o un fragmento de cualquiera de estos (por ejemplo al menos una porción de un dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo que comprende un domino coestimulador (por ejemplo 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento de este (por ejemplo al menos una porción de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Se ha demostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 regulan a la baja la activación de células T al unirse a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). La inmunosupresión se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1.

[0485] En una realización, el agente comprende el dominio extracelular (ECD) de una molécula inhibidora, por ejemplo Muerte Programada 1 (PD1), se puede fusionar con un dominio transmembrana y dominios intracelulares como 41BB y CD3 zeta (también denominados PD1 CAR en el presente documento). En una realización, el PD1 CAR, cuando se utiliza en combinaciones con un XCAR descrito en el presente documento, mejora la persistencia de la célula T. En una realización, el CAR es un PD1 CAR que comprende el dominio extracelular de PD1 indicado como subrayado en la SEQ ID NO: 105. En una realización, el PD1 CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:105.

Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdkla
afpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqtl
vtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqt
tqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqk
dkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO:105).

[0486] En una realización, el PD1 CAR comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada a continuación (SEQ ID NO:106).

pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvtql
pngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqtlvtttpaprpptpaptiasqpl
slrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggc
elrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr
gkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO:106).

[0487] En una realización, el agente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el PD1 CAR, por ejemplo el the PD1 CAR descrito en el presente documento. En una realización, la secuencia de ácido nucleico para el PD1 CAR se muestra a continuación, con el PD1 ECD subrayado a continuación en la SEQ ID NO: 107

atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatggtttctggactc
tccggatcgccccgtggaatccccccaaccttctcaccggcactcttggttgtgactgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctc
caacacctccgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgcgtttccggaagatcg
gtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctaggcg
aaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggcgcctaaggcccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgagag
tgaccgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcggcctgcgggcagtttcagaccctggtcacgacca
ctccggcgccgcgcccaccgactccggccccaactatcgcgagccagccccgtcgctgaggccggaagcatgccgcctgccgc
cggaggtgctgtgcatacccgggattggacttcgcatgcgacatctacatttgggctcctctcgccggaacttgtggcgtgctccttct
gtccctggtcatcaccctgtactgcaagcggggtcggaaaaagcttctgtacatttcaagcagccctcatgaggccgtgcaaacca
cccaggaggaggacggttgctcctgccggttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgcgtgaagttctcccggagcgc
cgacgccccgcctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaagagtacgatgtgctggac
aagcggcgcggccgggaccccgaaatgggcgggaagcctagaagaaagaaccctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaa
ggacaagatggccgaggcctactccgaaattgggatgaagggagagcggcggaggggaaaggggcacgacggcctgtaccaag
gactgtccaccgccaccaaggacacatacgatgcccctgcacatgcaggccctccccctcgc (SEQ ID NO: 107).

[0488] En otro ejemplo, en una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser una molécula coestimuladora o un ligando de molécula coestimuladora. Los ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen la molécula de MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll, así como OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). Ejemplos adicionales de tales moléculas coestimuladoras incluyen CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente a CD83., por ejemplo como se describe en el presente documento. Los ejemplos de ligandos de moléculas coestimuladoras incluyen CD80, CD86, CD40L, ICOSL, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL y LIGHT. En algunas realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora diferente del dominio de la molécula coestimuladora del CAR. En algunas realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora que es el mismo que el dominio de la molécula coestimuladora del CAR. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es 4-1BBL. En una realización, el ligando coestimulador es CD80 o CD86. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es CD70. En realizaciones, una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en el presente documento se puede modificar adicionalmente para expresar una o más moléculas coestimuladoras adicionales o ligandos de moléculas coestimuladoras.

Coexpresión de CAR con un receptor de quimioquinas

[0489] En realizaciones, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento, por ejemplo la célula que expresa CAR de CD19, comprende además una molécula receptora de quimioquina. La expresión transgénica de receptores de quimioquina CCR2b o CXCR2 en células T potencia el tráfico a tumores sólidos secretores de CCL2 o CXCL1, incluyendo melanoma y neuroblastoma (Craddock et al., J Immunother. 2010 Oct; 33(8):780-8 y Kershaw et al., Hum Gene Ther. 2002 Nov 1; 13(16): 1971-80). Por lo tanto, sin desear ceñirse a la teoría, se cree que los receptores de quimioquinas expresados en células que expresan CAR que reconocen quimioquinas secretadas por

tumores, por ejemplo tumores sólidos, pueden mejorar la migración dirigida de la célula que expresa CAR al tumor, facilitar la infiltración de la célula que expresa CAR en el tumor y potenciar la eficacia antitumoral de la célula que expresa CAR. La molécula receptora de quimioquinas puede comprender un receptor de quimioquinas de origen natural o recombinante o un fragmento de unión a quimioquinas del mismo. Una molécula receptora de quimioquina adecuada para la expresión en una célula que expresa CAR (por ejemplo CAR-Tx) descrita en el presente documento incluye un receptor de quimioquina CXC (por ejemplo CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 o CXCR7), un receptor de quimioquina CC (por ejemplo CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 o CCR11), un receptor de quimioquina CX3C (por ejemplo CX3CR1), un receptor de quimioquina XC (por ejemplo XCR1) o un fragmento de unión a quimioquina del mismo. En una realización, la molécula receptora de quimioquina a expresar con un CAR descrito en el presente documento se selecciona en base a quimioquina(s) secretada(s) por el tumor. En una realización, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento comprende adicionalmente, por ejemplo expresa, un receptor CCR2b o un receptor CXCR2. En una realización, el CAR descrito en el presente documento y la molécula receptora de quimioquina están en el mismo vector o están en dos vectores diferentes. En realizaciones en las que el CAR descrito en el presente documento y la molécula receptora de quimioquina están en el mismo vector, el CAR y la molécula receptora de quimioquina están en cada caso bajo el control de dos promotores diferentes o están bajo el control del mismo promotor.

Construcciones de Ácido Nucleico que Codifican un CAR

[0490] La presente invención también se puede utilizar para proporcionar una célula efectora inmunitaria que incluye moléculas que codifican una o más construcciones de CAR descritos en el presente documento. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un transcrito de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una construcción de ADN.

[0491] Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden ser una molécula de ADN, una molécula de ARN o una combinación de las mismas. En una realización, la molécula de ácido nucleico es un ARNm que codifica un polipéptido de CAR descrito en el presente documento. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un vector que incluye cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente.

[0492] En un aspecto el dominio de unión al antígeno de un CAR de uso en la invención (por ejemplo un scFv) está codificado por una molécula de ácido nucleico cuya secuencia ha sido optimizada para su expresión en una célula de mamífero. En un aspecto, la construcción de CAR completo para su uso en la invención está codificado por una molécula de ácido nucleico en donde la secuencia completa tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero. La optimización de codones se refiere al descubrimiento de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (es decir, codones que codifican el mismo aminoácido) en el ADN codificante presenta un sesgo en diferentes especies. Tal degeneración de codones permite que un polipéptido idéntico sea codificado por una variedad de secuencias de nucleótidos. En la técnica se conoce una variedad de métodos de optimización de codones, y estos incluyen, por ejemplo, los métodos divulgados en al menos los números de patente de EE.UU. 5,786,464 y 6,114,148.

[0493] En consecuencia, en un aspecto, una célula efectora inmunitaria, por ejemplo producida mediante un método descrito en el presente documento, incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno tumoral descrito en el presente documento, un dominio transmembrana (por ejemplo un dominio transmembrana descrito en el presente documento) y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento) que comprende un dominio estimulador, por ejemplo un dominio de señalización coestimulador (por ejemplo un dominio de señalización coestimulador descrito en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo un dominio de señalización primario descrito en el presente documento, por ejemplo una cadena zeta descrita en el presente documento).

[0494] La presente invención también puede utilizar vectores en los que se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento. Los vectores derivados de retrovirus, como el lentivirus, son herramientas adecuadas para conseguir la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de oncoretrovirus, como virus de leucemia murina, de que pueden transducir células no proliferativas, como hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad. Un vector retroviral también puede ser, por ejemplo, un vector gammarretroviral. Un vector gammarretroviral puede incluir, por ejemplo, un promotor, una señal de empaquetamiento (ψ), un sitio de unión al cebador (PBS), uno o más (por ejemplo dos) repeticiones terminales largas (LTR) y un transgén de interés, por ejemplo un gen que codifica un CAR. Un vector gammarretroviral puede carecer de genes estructurales virales tales como gag, pol y env. Vectores gammarretrovirales ejemplares incluyen Virus de Leucemia Murina (MLV), Virus Formador de Foco de Bazo (SFFV) y Virus de Sarcoma Mieloproliferativo (MPSV) y vectores derivados de los mismos. Otros vectores gammarretrovirales se describen, por ejemplo, en Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. junio de 2011; 3(6): 677-713.

[0495] En otra realización, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado es un vector adenoviral (A5/35). En otra realización, la expresión de ácidos nucleicos que codifican el CAR pueden realizarse

utilizando transposones como la bella durmiente, crisper, CAS9 y nucleasas con dedos de zinc. Véase,más adelante June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716.

[0496] En un breve resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican el CAR se consigue generalmente mediante enlace operable de un ácido nucleico que codifica el polipéptido de CAR o porciones del mismo a un promotor e incorporación de la construcción a un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

[0497] El ácido nucleico se puede clonar en una serie de tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector, incluyendo, entre otros, un plásmido, un fago, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

[0498] Además, el vector de expresión se puede proporcionar a uan célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Virus que son útiles como vectores incluyen, entre otros, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo los documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y la Pat. de EE.UU. No. 6,326,193).

[0499] Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes. Un gen seleccionado se puede insertar en un vector y empaquetar en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la materia. El virus recombinante se puede aislar entonces y suministrar a células del sujeto in vivo o ex vivo. En la técnica se conoce una serie de sistemas retrovirales. En algunas realizaciones, se usan vectores adenovirales. En la técnica se conoce una serie de vectores adenovirales. En una realización, se usan vectores lentivirales.

[0500] Elementos promotores adicionales, por ejemplo potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, estos están ubicados en la región 30-110 bp aguas arriba del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que una serie de promotores también contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espaciado entre elementos promotores suele ser flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven respectivamente. En el promotor de timidina quinasa (tk), el espaciado entre elementos promotores puede aumentar a 50 pb de distancia antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción. Promotores ejemplares incluyen los genes CMV IE, EF-1α, ubiquitina C o promotores de fosfogliceroquinasa (PGK).

[0501] Un ejemplo de un promotor que es capaz de expresar una molécula de ácido nucleico que codifica CAR en una célula T de mamífero es el promotor EF1a. El promotor EF1a nativo impulsa la expresión de la subunidad alfa del complejo del factor de elongación-1, que es responsable del suministro enzimático de ARNt al ribosoma. El promotor EF1a se ha utilizado ampliamente en plásmidos de expresión de mamíferos y ha demostrado ser eficaz para impulsar la expresión de CAR a partir de moléculas de ácido nucleico clonadas en un lector lentiviral. Véase, por ejemplo, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). En un aspecto, el promotor EF1a comprende la secuencia proporcionada en los ejemplos.

[0502] Otro ejemplo de un promotor es la secuencia promotora temprana inmediata del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia es una secuencia promotora constitutiva fuerte, capaz de impulsar niveles elevados de expresión de cualquier secuencia de polinucleótidos enlazada de manera operativa a ella. Sin embargo, también se pueden utilizar otras secuencias promotoras constitutivas, incluyendo, entre otros, el promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), el virus de tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor del virus de leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos como, entre otros, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor del factor de elongación-1α, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de conectar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está ligada operablemente cuando se desea una expresión de este tipo, o desconectar la expresión cuando no se desea la expresión. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, entre otros, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de protesterona y un promotor de tetraciclina.

[0503] Otro ejemplo de un promotor es el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK). En algunas realizaciones, puede resultar deseable un promotor de PGK truncado (por ejemplo un promotor de PGK con una o más, por ejemplo 1, 2,

5, 10, 100, 200, 300 o 400, deleciones de nucleótidos en comparación con la secuencia del promotor de PGK de tipo salvaje).

[0504] Las secuencias de nucleótidos de promotores de PGK ejemplares se proporcionan a continuación.

Promotor de WT PGK:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCAC
GCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGT
GATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGC
CGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGA
CGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGA
AGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCC
CCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCC
ACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGC
AAAGGGCCTTGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGG
AACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO: 109)

Promotores de PGK truncados ejemplares:

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCAC
GCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGT
GATGGCGGGGTG (SEQ ID NO: 110)

PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCAC
GCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGT
GATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGC
CGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGA
CGGTAACG (SEQ ID NO:111)

PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCAC
GCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGT
GATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGC
CGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGA
CGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGA
AGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCC
CCG (SEQ ID NO:112)

PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCAC
GCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGT
GATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGC
CGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGA
CGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGA
AGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCTGAATCC
CCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCC
ACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG (SEQ ID
NO:113)

[0505] Un vector también puede incluir, por ejemplo, una secuencia de señales para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de transcripción (por ejemplo el gen de la Hormona de Crecimiento Bovino (BGH)), un elemento que permite la replicación episomal y la replicación en procariotas (por ejemplo el origen de SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y/o elementos que permiten la selección (por ejemplo el gen de resistencia a ampicilina y/o el marcador de zeocina).

[0506] Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido de CAR o porciones del mismo, el vector de expresión a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen reportero o ambos para facilitar la identificación y la selección de células que se expresan de la población de células que se pretende transfectar o infectar a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en un trozo separado de ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células hospedantes. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

[0507] Los genes reporteros se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen reportero es un gen que no está presente en el organismo o tejido receptor ni es expresado por él y codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo la actividad enzimática. La expresión del gen reportero se analiza en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes reporteros adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína verde fluorescente (por ejemplo Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y se pueden preparar utilizando técnicas conocidas u obtener comercialmente. En general, la construcción con la región flanqueante de 5' mínima que muestra el nivel más alto de expresión del gen reportero se identifica como el promotor. Tales regiones promotoras se pueden enlazar a un gen reportero y utilizar para evaluar la capacidad de los agentes para modular la transcripción impulsada por el promotor.

[0508] En realizaciones, el vector puede comprender dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un CAR, por ejemplo un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CD19, y un segundo CAR, por ejemplo un CAR inhibidor o un CAR que se une específicamente a un antígeno diferente a CD19. En tales realizaciones, las dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican el CAR están codificadas por una única molécula de ácido nucleico en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica. En este aspecto, los dos o más CAR pueden, por ejemplo, estar separados por uno o más sitios de escisión peptídica (por ejemplo un sitio de autoescisión o un sustrato para una proteasa intracelular). Los ejemplos de sitios de escisión de péptidos incluyen sitios T2A, P2A, E2A o F2A.

[0509] Los métodos de introducción y expresión de genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector se puede introducir fácilmente en una célula hospedante, por ejemplo una célula de mamífero, bacteria, levadura, insecto, o por cualquier método, por ejemplo, uno conocido en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula hospedante por medios físicos, químicos o biológicos.

[0510] Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en un hospedante pueden incluir precipitación de fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Un método adecuado para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedante es la transfección con fosfato de calcio.

[0511] Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedante incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus virus del herpes simple I, adenovirus y similares. Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. Nº 5,350,674 y 5,585,362.

[0512] Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedante incluye sistemas de dispersión coloidales, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para uso en un vehículo de suministro in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo una vesícula de membrana artificial). Se dispone de otros métodos de suministro dirigido de ácidos nucleicos de última generación por el estado de la técnica, como el suministro de polinucleótidos con nanopartículas dirigidas u otro sistema de suministro de tamaño submicrométrico adecuado

[0513] En caso de que se utilice un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula hospedante (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede estar encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejado con un liposoma, disperso en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como suspensión en un lípido, contenido o complejado con una micela o asociado con un lípido de otro modo. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden estar simplemente intercalados en una solución, posiblemente formado agregados que no son uniforme en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que se pueden producir naturalmente o son lípidos sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que se producen naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contiene hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

[0514] Los lípidos adecuados se pueden obtener a partir de fuentes comerciales. Por ejemplo, la dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener de Sigma, St. Louis, MO; el fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); el colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; el dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a alrededor de -20°C. El cloroformo se usa como único disolvente, ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos simples y multilaminares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos cerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan un autorreordenamiento antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan el agua y los solutos disueltos entre las capas lipídicas (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, también están incluidas composiciones que tienen estructuras en solución diferentes a la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos lipofectamina-ácido nucleico.

[0515] Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedante o exponer una célula al inhibidor de uso en la presente invención, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ácido nucleico recombinante en la célula hospedante, se pueden realizar varios ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la materia, tales como transferencia de Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencias de Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que quedan dentro del alcance de la invención.

Receptor de Células Asesinas Naturales (NKR) CAR

[0516] En una realización, la molécula de CAR descrita en el presente documento comprende uno o más componentes de un receptor de células asesinas naturales (NKR), formando de este modo un NKR-CAR. El componente NKR puede ser un dominio transmembrana, un dominio bisagra o un dominio citoplasmático de cualquiera de los siguientes receptores de células asesinas naturales: receptor de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR), por ejemplo KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, DIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1; receptor de citotoxicidad natural (NCR), por ejemplo NKp30, NKp44, NKp46; familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización (SLAM) de receptores de células inmunitarias, por ejemplo CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME y CD2F-10; receptor de Fc (FcR), por ejemplo CD16 y CD64; y receptores Ly49, por ejemplo LY49A, LY49C. Las moléculas de NKR-CAR descritas en el

presente documento pueden interaccionar con una molécula adaptadora o un dominio de señalización intracelular, por ejemplo DAP12. Se describen configuraciones ejemplares de secuencias de moléculas de CAR que comprenden componentes NKR en la Publicación Internacional Nº WO2014/145252.

CAR dividido

[0517] En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR utiliza un CAR dividido. El enfoque de CAR dividido se describe con más detalle en las publicaciones WO2014/055442 y WO2014/055657. Brevemente, un sistema CAR comprende una célula que expresa un primer CAR que tiene un primer dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo 41BB), y la célula también expresa un segundo CAR que tiene un segundo dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo CD3 zeta). Cuando la célula se encuentra con el primer antígeno, el dominio coestimulador se activa, y la célula prolifera. Cuando la célula se encuentra con el segundo antígeno, el dominio de señalización intracelular se activa, y comienza la actividad de destrucción celular. Por lo tanto, la célula que expresa CAR solo se activa completamente en presencia de ambos antígenos.

Estrategias para la Regulación de Receptores de Antígenos Quiméricos

[0518] En algunas realizaciones, es deseable un CAR regulable (RCAR) donde se pueda controlar la actividad de CAR para optimizar la seguridad y la eficacia de una terapia con CAR. Hay muchas maneras en las que se pueden regular las actividades de CAR. Por ejemplo, la apoptosis inducible utilizando, por ejemplo, una caspasa condensada a un dominio de dimerización (véase, por ejemplo, Di Stasa et al., N Engl. J. Med. 3 de noviembre de 2011; 365(18):1673-1683), se puede utilizar como un interruptor de seguridad en la terapia con CAR de la presente divulgación. En una realización, las células (por ejemplo células T o células NK) que expresan un CAR para su uso en la presente invención comprenden además un interruptor de apoptosis inducible, en donde una caspasa humana (por ejemplo caspasa 9) o una versión modificada se fusiona con una modificación de la Proteína FKB humana que permite la dimerización condicional. En presencia de una molécula de bajo peso molecular, tal como un rapálogo (por ejemplo AP 1903, AP20187), la caspasa inducible (por ejemplo caspasa 9) se activa y conduce a la rápida apoptosis y muerte de las células (por ejemplo células T o células NK) que expresan un CAR para su uso en la presente invención. Se han descrito ejemplos de un interruptor de la apoptosis inducible basado en caspasa (o uno o más aspectos de dicho interruptor), por ejemplo, en los documentos US2004040047; US20110286980; US20140255360; WO1997031899; WO2014151960; WO2014164348; WO2014197638; WO2014197638.

[0519] En otro ejemplo, las células que expresan CAR también pueden expresar una molécula inducible de Caspasa-9 (iCaspasa-9) que, tras la administración de un fármaco dimerizador (por ejemplo rimiducida (también llamado AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) o AP20187 (Ariad)) conduce a la activación de Caspasa-9 y a la apoptosis de las células. La molécula de iCaspasa-9 contiene un dominio de unión químico inductor de dimerización (CID) que media la dimerización en presencia de un CID. Esto da lugar a una depleción inducida y selectiva de células que expresan CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 está codificada por la misma molécula de ácido nucleico que el (los) vector(es) que codifican el CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 está codificada por la misma molécula de ácido nucleico que el vector que codifica el CAR. La iCaspasa-9 puede proporcionar un interruptor de seguridad para evitar cualquier toxicidad de las células que expresan CAR. Véase, por ejemplo, Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. Nº NCT02107963; y Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83.

[0520] Las estrategias alternativas para regular la terapia con CAR de la presente invención incluyen utilizar moléculas pequeñas o anticuerpos que desactivan o deshabilitan la actividad de CAR, por ejemplo mediante deleción de células de expresión de CAR, por ejemplo mediante inducción de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un antígeno que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, por ejemplo ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un receptor capaz de ser diana para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de tales receptores incluyen EpCAM, VEGFR, integrinas (por ejemplo integrinas αvβ3, α4, αI¾β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), miembros de la superfamilia de receptor de TNF (por ejemplo TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1 1, CD1 1a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/receptor de IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41 , CD44, CD51 , CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 y EGFR, y versiones truncadas de estos (por ejemplo, versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

[0521] Por ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede expresar también un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFR) que carece de capacidad de señalización pero conserva el epítopo que es reconocido por moléculas capaces de inducir ADCC, por ejemplo cetuximab (ERBITUX®), como la administración de cetuximab induce ADCC y la posterior depleción de células que expresan CAR (véase, por ejemplo, el documento WO2011/056894 y Jonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860). Otra estrategia incluye la expresión de un gen marcador/suicida altamente compacto que combina epítopos diana de los antígenos

CD32 y CD20 en las células que expresan CAR descritas en el presente documento, que se une a rituximab, dando lugar a la depleción selectiva de células que expresan CAR, por ejemplo mediante ADCC (véase, por ejemplo, Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287). Otros métodos de depleción de células que expresan CAR descritos en el presente documento incluyen la administración de CAMPATH, un anticuerpo anti-CD52 monoclonal que se une selectivamente y se dirige selectivamente a linfocitos maduros, por ejemplo células que expresan CAR, para la destrucción, por ejemplo mediante inducción de ADCC. En otras realizaciones, la célula que expresa CAR puede ser dirigida selectivamente utilizando un ligando CAR, por ejemplo un anticuerpo anti-idiotípico. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiidiotípico puede causar actividad de células efectoras, por ejemplo actividades de ADCC o ADC, y reducir de este modo el número de células que expresan CAR. En otras realizaciones, el ligando de CAR, por ejemplo, el anticuerpo antiidiotípico, se puede acoplar a un agente que induce la muerte celular, por ejemplo una toxina, y reducir de este modo el número de células que expresan CAR. Como alternativa, las propias moléculas CAR se pueden configurar de manera que la actividad se pueda regular, por ejemplo activar y desactivar, como se describe más adelante.

[0522] En otras realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento también puede expresar una proteína reconocida por el agente de depleción de células T. En una realización, la proteína diana es CD20 y el agente de depleción de células T es un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo rituximab. En dicha realización, el agente de depleción de células T se administra una vez que es deseable reducir o eliminar la célula que expresa CAR, por ejemplo, para mitigar la toxicidad inducida por CAR. En otras realizaciones, el agente de depleción de células T es un anticuerpo anti-CD52, por ejemplo alemtuzumab, como se describe en los Ejemplos del presente documento.

[0523] En otras realizaciones, un RCAR comprende un conjunto de polipéptidos, normalmente dos en las realizaciones más simples, en las que los componentes de un CAR estándar descrito en el presente documento, por ejemplo un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular, se dividen en polipéptidos o miembros separados. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, por ejemplo, puede acoplar un dominio de unión al antígeno a un dominio de señalización intracelular. En una realización, un CAR para su uso en la presente invención utilizan un interruptor de la dimerización como los descritos, por ejemplo, en el documento WO2014127261. Se proporcionan una descripción adicional y configuraciones ejemplares de CAR regulables de este tipo en el presente documento y en, por ejemplo, los párrafos 527-551 de la Publicación Internacional N.º WO 2015/090229 presentada el 13 de marzo de 2015. En algunas realizaciones, un RCAR implica un dominio de conmutación, por ejemplo, un dominio de conmutación de FKBP, como se recoge en la SEQ ID NO: 114, o comprende un fragmento de FKBP que tiene la capacidad de unirse con FRB, por ejemplo, como se recoge en la SEQ ID NO: 115. En algunas realizaciones, el RCAR implica un dominio de conmutación que comprende una secuencia de FBR, por ejemplo, como se recoge en la SEQ ID NO: 116, o una secuencia de FRB mutante, por ejemplo, tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID Nº 117-122.

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGML
EDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATG
HPGIIPPHATLVFDVELLKLETSY (SEQ ID NO: 114)

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQ
EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS
(SEQ ID NO: 115)

ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN
QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISK (SEQ ID NO: 116)

Tabla 13. FRB mutante ejemplar que tiene una mayor afinidad por una molécula de dimerización.

Mutante de FRB	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Mutante E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	117

Mutante de FRB	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Mutante E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	118
Mutante T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	119
Mutante E2032, T2098	ILWHEMWHEGL**X**EASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDL**X**QAWDLYYHVFRRISKTS	120
Mutante E2032I, T2098L	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	121
Mutante E2032L, T2098L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYG RDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	122

Transfección de ARN

[0524] En el presente documento se divulgan métodos para producir un ARN CAR transcrito in vitro. Se describe ARN CAR y métodos de uso del mismo, por ejemplo, en los párrafos 553-570 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

[0525] Una célula efectora murina puede incluir un CAR codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica un CAR descrito en el presente documento se introduce en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo que se ha preparado mediante un método descrito en el presente documento, para la producción de una célula que expresa CAR.

[0526] En una realización, el ARN CAR transcrito *in vitro* se puede introducir en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce mediante transcripción *in vitro* usando una plantilla generada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente mediante PCR en una plantilla para síntesis de ARNm in vitro utilizando cebadores apropiados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. La plantilla deseada para la transcripción *in vitro* es un CAR descrito en el presente documento. Por ejemplo, la plantilla para el ARN del CAR comprende una región extracelular que comprende un dominio variable de cadena sencilla de un anticuerpo contra un antígeno asociado a un tumor descrito en el presente documento; una región bisagra (por ejemplo una región bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (por ejemplo un dominio transmembrana descrito en el presente documento tal como un dominio transmembrana de CD8a); y una región citoplasmática que incluye un dominio de señalización intracelular, por ejemplo un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento, por ejemplo, que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB.

[0527] En una realización, el ADN a utilizar para PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN que se produce naturalmente a partir del genoma de un organismo. En una realización, el ácido nucleico puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas (UTR) en 5' y/o 3'. El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. En una realización, el ADN que se va a usar para PCR es una secuencia de ácido nucleico humano. En otra realización, el ADN que se va a usar para PCR es una secuencia de ácido nucleico humano que incluye las

UTR en 5' y 3'. El ADN puede ser alternativamente una secuencia de ADN artificial que no se expresa normalmente en un organismo que se produce naturalmente. Una secuencia de ADN artificial ejemplar es una que contiene porciones de genes que están ligadas conjuntamente para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que están ligadas conjuntamente pueden ser de un organismo único o de más de un organismo.

[0528] Para generar una plantilla para transcripción in vitro de ARNm que se utiliza para transfección se utiliza PCR. Los métodos para realizar la PCR son muy conocidos en la técnica. Los cebadores para uso en PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a regiones de ADN a utilizar como plantilla para la PCR. "Sustancialmente complementario", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde una mayoría o la totalidad de bases en la secuencia de cebador son complementarias o una o más bases son no complementarias o están desemparejadas. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de anelarse o hibridarse con la diana de ADN deseada bajo condiciones de anelación utilizadas para PCR. Los cebadores pueden diseñarse para ser sustancialmente complementarios a cualquier porción de la plantilla de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse para amplificar la porción de un ácido nucleico que se transcribe normalmente en células (el marco de lectura abierto), incluyendo UTR en 5' y 3'. Los cebadores también pueden diseñarse para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo la totalidad o porciones de las UTRs en 5' y 3'. Los cebadores útiles para PCR se pueden generar mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. "Cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a nucleótidos de la plantilla de ADN que están aguas arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Aguas arriba" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 5 en la secuencia de ADN que se va a amplificar respecto a la cadena codificante. "Cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a nucleótidos de la plantilla de ADN que están aguas abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Aguas abajo" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 3' en la secuencia de ADN que se va a amplificar respecto a la cadena codificante.

[0529] En los métodos divulgados en el presente documento se puede utilizar cualquier ADN polimerasa útil para PCR. Los reactivos y polimerasa están disponibles comercialmente a partir de una serie de fuentes.

[0530] También se pueden utilizar estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad o la eficiencia de traducción. El ARN en las realizaciones tiene UTR en 5' y 3'. En una realización, la UTR en 5' tiene una longitud de entre uno y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias de UTR en 5' y 3' a añadir a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, entre otros, diseño de cebadores para PCR que se anelan en diferentes regiones de las UTR. Utilizando este enfoque, un experto en la materia puede modificar las longitudes de UTR en 5' y 3' requeridas para obtener una eficiencia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

[0531] Las UTR en 5' y 3' pueden ser las UTR en 5' y 3' endógenas que se producen naturalmente para el ácido nucleico de interés. Alternativamente, las secuencias de UTR que no son endógenas al ácido nucleico se pueden añadir mediante incorporación de las secuencias de UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de secuencias de UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés pueden ser útiles para modifica la estabilidad y/o la eficiencia de traslación del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en secuencias de UTR en 3' pueden disminuir la estabilidad de ARNm. Por lo tanto, las UTR en 3' se pueden seleccionar o diseñar para aumentar la estabilidad de ARN transcrito en base a las propiedades de las UTR, que son bien conocidas en la técnica.

[0532] En una realización, la UTR en 5' puede contener la secuencia Kozak del ácido nucleico endógeno. Alternativamente, cuando se agrega una UTR en 5' que no es endógena al ácido nucleico a añadir mediante PCR como se describe anteriormente, se puede rediseñar una secuencia Kozak de consenso mediante adición de la secuencia de UTR en 5'. Las secuencias Kozak pueden aumentar la eficiencia de traducción de algunos transcritos de ARN, pero no parecen ser necesarias para que todos los ARN permitan una traducción eficiente. El requisito de secuencias Kozak para muchos ARN es conocido en la técnica. En otras realizaciones, la UTR en 5' puede ser una UTR en 5' de un virus de ARN, cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden usar diversos análogos de nucleótidos en la UTR en 3' o 5' para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

[0533] Para permitir la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN sin necesidad de clonación de genes, se debe adherir un promotor de transcripción a la plantilla de ADN aguas arriba de la secuencia a transcribir. Cuando se añade una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador directo, el promotor de ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR aguas arriba del marco de lectura abierto a transcribir. En una realización, el promotor es un promotor de polimerasa T7, como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, entre otros, promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de nucleótidos de consenso para promotores T7, T3 y SP6 son conocidas en la técnica.

[0534] En una realización, el ARNm tiene una caperuza tanto en el extremo 5' como en la cola de poli(A) 3' que determina la unión al ribosoma, la iniciación de la traducción y la estabilidad de ARNm en la célula. En una plantilla de

ADN circular, por ejemplo el ADN plasmídico, la ARN polimerasa, produce un producto concatámero largo que no es adecuado para expresión en células eucariotas. La transcripción de ADN plasmídico linealizado en el extremo de la UTR en 3' da lugar a un ARNm de tamaño normal que no es efectivo en transfección eucariota, incluso si está poliadenilado tras la transcripción.

[0535] En una plantilla de ADN lineal, la ARN polimerasa de fago T7 puede extender el extremo 3' del transcrito más allá de la última base de la plantilla (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003).

[0536] El método convencional de integración de estiramientos poliA/T en una plantilla de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede causar inestabilidad del plásmido, por lo que las plantillas de ADN plasmídico obtenidas a partir de células bacterianas están frecuentemente contaminadas con deleciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y largos, sino que a menudo no sean fiables. Es por este motivo que es muy deseable un método que permita la construcción de plantillas de ADN con estiramiento poliA/T 3' sin clonación.

[0537] El segmento poliA/T de la plantilla de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un cegador inverso que contiene una cola de poliT, como una cola de 100T (SEQ ID NO: 123) (el tamaño puede ser 50-5000 T (SEQ ID NO: 32)), o después de PCR mediante cualquier otro método, incluyendo, entre otros, ligadura de ADN o recombinación in vitro. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas (por ejemplo SEQ ID NO: 33).

[0538] La colas de poli(A) de los ARN se pueden extender adicionalmente después de la transcripción in vitro con el uso de poli(A) polimerasa, como poli(A) polimerasa de E. coli (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 34) da lugar a un aumento de aproximadamente dos veces en la eficiencia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Una unión de este tipo puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, se pueden incorporar análogos de ATP en la cola de poli(A) utilizando poli(A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar adicionalmente la estabilidad del ARN.

[0539] Las caperuzas 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización, los ARN producidos por los métodos desvelados en el presente documento incluyen una caperuza 5'. La caperuza 5' se proporciona utilizando técnicas conocidas en la técnica y descritas en el presente documento (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[0540] Los ARN producidos mediante los métodos divulgados en el presente documento también pueden contener un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). La secuencia IRES puede ser cualquier secuencia viral, cromosómica o diseñada artificialmente que inicia la unión del ribosoma al ARNm independiente de la caperuza y facilita la iniciación de la traducción. Se puede incluir cualquier soluto adecuado para electroporación celular que pueda contener factores que faciliten la permeabilidad celular, como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

[0541] el ARN se puede introducir en las células diana utilizando cualquiera de una serie de métodos diferentes, por ejemplo métodos disponibles comercialmente que incluyen, entre otros, electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendort, Hamburgo, Alemania), transfección mediada por liposomas mediante lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos o sistemas de administración de partículas biolísticas como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8): 861-70 (2001).

Métodos de suministro no virales

[0542] En algunos aspectos, se pueden utilizar métodos no virales para suministrar un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento en una célula o tejido de un sujeto.

[0543] En algunas realizaciones, el método no viral incluye el uso de un transposón (también llamado un elemento transponible). En algunas realizaciones, un transposón es un trozo de ADN que puede insertarse por sí mismo en una ubicación de un genoma, por ejemplo un trozo de ADN que es capaz de autorreplicarse e insertar su copia en un genoma o un trozo de ADN que se puede cortar de un ácido nucleico más largo e insertarse en otro lugar de un genoma. Por ejemplo, un transposón comprende una secuencia de ADN formada por repeticiones invertidas que flanquean genes para la transposición.

[0544] Los métodos ejemplares de suministro de ácido nucleico utilizando un transposón incluyen un sistema transposón de la Bella Durmiente (SBTS) y un sistema transposón piggyBac (PB). Véase, por ejemplo, Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther.

16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al Blood. 122.21 (2013): 166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; y Ding et al. Cell. 122.3(2005):473-83.

[0545] El SBTS incluye dos componentes: 1) un transposón que contiene un transgén y 2) una fuente de enzima transposasa. La transposasa puede transponer el transposón de un plásmido portador (u otro ADN donante) a un ADN diana, como el cromosoma/genoma de una célula hospedante. Por ejemplo, la transposasa se une al plásmido portador/ADN donante, corta el transposón (incluidos el (los) transgén (transgenes)) del plásmido y lo inserta en el genoma de la célula hospedante. Véase, por ejemplo, Aronovich et al. *supra.*

[0546] Los transposones ejemplares incluyen un transposón basado en pT2. Véase, por ejemplo, Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; y Singh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971. Las transposasas ejemplares incluyen una transposasa de tipo Tc1/mariner, por ejemplo la transposasa SB10 o la transposasa SB11 (una transposasa hiperactiva que se puede expresar a partir de un promotor de citomegalovirus). Véase, por ejemplo, Aronovich et al.; Kebriaei et al.; y Grabundzija et al..

[0547] El uso de SBTS permite la integración y expresión eficiente de un transgén, por ejemplo un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento. En el presente documento se proporcionan métodos de generación de una célula, por ejemplo célula T o célula NK, que exprese de manera estable un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo utilizando un sistema de transposones como SBTS.

[0548] Según los métodos descritos en el presente documento, en algunas realizaciones, uno o más ácidos nucleicos, por ejemplo plásmidos que contienen los componentes SBTS se suministran a una célula (por ejemplo célula T o célula NK). Por ejemplo, se suministra(n) ácido(s) nucleico(s) mediante métodos estándar de suministro de ácido nucleico (por ejemplo ADN plasmídico), por ejemplo métodos descritos en el presente documento, por ejemplo electroporación, transfección o lipofección. En algunas realizaciones, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén, por ejemplo un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén (por ejemplo un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento), así como una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. En otras realizaciones, se proporciona un sistema con dos ácidos nucleicos, por ejemplo un sistema de plásmido doble, por ejemplo, donde un primer plásmido contiene un transposón que comprende un transgén y un segundo plásmido contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. Por ejemplo, el primer y el segundo ácidos nucleicos se suministran conjuntamente a una célula hospedante.

[0549] En algunas realizaciones se generan células, por ejemplo células T o NK, que expresan un CAR descrito en el presente documento mediante uso de una combinación de inserción de genes utilizando el STBS y edición genética utilizando una nucleasa (por ejemplo nucleasas con dedos de Zinc (ZFN), Nucleasas Efectoras Similares a Activador de Transcripción (TALEN), el sistema CRISPR/Cas o endonucleasas homing modificadas de nuevo por ingeniería genética de meganucleasa modificada por ingeniería genética).

[0550] En algunas realizaciones, el uso de un método no viral de suministro permite la reprogramación de células, por ejemplo células T o NK, y la infusión directa de las células en un sujeto. Las ventajas de los vectores no virales incluyen, entre otras, la facilidad y el coste relativamente bajo de producción de las cantidades suficientes necesarias para satisfacer una población de pacientes, la estabilidad durante el almacenamiento y la falta de inmunogenicidad.

Métodos de fabricación/producción

[0551] Los métodos divulgados en el presente documento incluyen la administración de un agente de depleción de células T después del tratamiento con la célula (por ejemplo una célula efectora inmunitaria como se describe en el presente documento), reduciendo de este modo (por ejemplo depletando) las células que expresan CAR (por ejemplo las células que expresan CAR de CD19). Pueden utilizarse agentes de depleción de células T de este tipo eficazmente para provocar la depleción de células que expresan CAR (por ejemplo células que expresan CAR de CD19) para mitigar la toxicidad. Las células que expresan CAR se pueden haber fabricado según un método del presente documento, por ejemplo se pueden haber ensayado (por ejemplo antes o después de transfección o transducción) según un método descrito en el presente documento.

[0552] El agente de depleción de células T se puede administrar una, dos, tres, cuatro o cinco semanas después de administración de la célula, por ejemplo la población de células efectoras inmunes descrita en el presente documento.

[0553] El agente de depleción de células T puede ser un agente que depleta las células que expresan CAR, por ejemplo mediante inducción de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un antígeno (por ejemplo un antígeno diana) que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, por ejemplo ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar una proteína diana (por ejemplo un receptor) capaz de ser diana para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de tales proteínas diana

incluyen, entre otros, EpCAM, VEGFR, integrinas (por ejemplo integrinas αvβ3, α4, αl3/4β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), miembros de la superfamilia de receptor de TNF (por ejemplo TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11 , CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/receptor de IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41 , CD44, CD51 , CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 y EGFR, y versiones truncadas de estos (por ejemplo, versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

[0554] La célula que expresa CAR puede coexpresar el CAR y la proteína diana, por ejemplo expresa naturalmente la proteína diana o está diseñada para expresar la proteína diana. Por ejemplo, la célula, por ejemplo la población de células efectoras inmunitarias puede incluir un ácido nucleico (por ejemplo vector) que comprende el ácido nucleico del CAR (por ejemplo un ácido nucleico del CAR como se describe en el presente documento) y un ácido nucleico que codifica la proteína diana.

[0555] El agente de depleción de células T puede ser un inhibidor de CD52, por ejemplo una molécula de anticuerpo anti-CD52, por ejemplo alemtuzumab.

[0556] La célula, por ejemplo la población de células efectoras inmunitarias, puede expresar una molécula de CAR como se describe en el presente documento (por ejemplo CAR de CD19) y la proteína diana reconocida por el agente de depleción de células T. La proteína diana puede ser CD20. Cuando la proteína diana es CD20, el agente de depleción de células T puede ser un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo rituximab.

[0557] Los métodos pueden incluir además el trasplante de una célula, por ejemplo una célula madre hematopoyética o una médula ósea en el mamífero.

[0558] En el presente documento se divulga también un método para acondicionar un mamífero antes del trasplante de células. El método incluye administrar al mamífero una cantidad eficaz de la célula que comprende un ácido nucleico o polipéptido de CAR, por ejemplo un ácido nucleico o polipéptido de CAR de CD19. El trasplante de células puede ser un trasplante de células madre, por ejemplo un trasplante de células madre hematopoyéticas o un trasplante de médula ósea. El acondicionamiento de un sujeto antes del trasplante de células puede incluir la reducción del número de células que expresan diana en un sujeto, por ejemplo células normales que expresan CD19 o células cancerosas que expresan CD19.

Activación y Expansión de Células Efectoras Inmunitarias (por ejemplo células T)

[0559] Las células efectoras inmunitarias, como células T generadas o enriquecidas mediante los métodos descritos en el presente documento, se pueden activar y expandir generalmente utilizando métodos como los descritos, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 20060121005.

[0560] Generalmente, una población de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células con depleción de células T reguladoras, se puede expandir por contacto con una superficie que haya adherido en estas un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T se pueden estimular como se describe en el presente documento, por ejemplo mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o mediante el contacto con un activador de proteína quinasa C (por ejemplo briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, se puede poner en contacto una población de células T con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 bajo condiciones apropiadas para estimular la proliferación de células T. Para estimular la proliferación de células T CD4+ o células T CD8+ se puede utilizar un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Se pueden utilizar ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 que incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia), al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[0561] En ciertos aspectos, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para la célula T se pueden proporcionar mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada una de las señales pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (por ejemplo en formación "cis") o a superficies separadas (por ejemplo en formación "trans"). Como alternativa, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a la superficie de una célula y el agente que proporciona la activación primaria está en solución o acoplado a la superficie. En determinados aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En un aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble y entonces reticulados en una superficie, como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a

los agentes. A este respecto, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 20040101519 y 20060034810 para células que presentan antígenos artificiales (aAPC) que están contemplados para uso en la activación y la expansión de células T en la presente invención.

[0562] En un aspecto, los dos agentes están inmovilizados en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis" o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; y ambos agentes están coinmovilizados en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se utiliza una relación 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para expansión de células T CD4+ y crecimiento de células T. En ciertos aspectos de la presente invención, se utiliza una relación de anticuerpos anti CD3 :CD28 unidos a las perlas de modo que se observa un aumento en la expansión de células T en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de alrededor de 1 a alrededor de 3 en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas oscila de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros intermedios. En un aspecto, a las perlas está unido más anticuerpo anti-CD28 que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En ciertos aspectos, la relación de anticuerpo anti CD28 respecto a anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En un aspecto particular, se utiliza una relación CD3:CD28 1:100 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:75 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto adicional, se utiliza una relación CD3:CD28 1:50 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:30 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:10 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:3 de anticuerpos unidos a perlas. En otro aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 3:1 de anticuerpo unido a perlas.

[0563] Las relaciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio se pueden utilizar para estimular las células T u otras células diana. Como pueden apreciar fácilmente los expertos en la materia, la relación de partículas a células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. Por ejemplo, las perlas de pequeño tamaño podrían unir solo unas pocas células, mientras que perlas más grandes podrían unir muchas. En ciertos aspectos, la relación de células a partículas oscila de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y, en aspectos adicionales, la relación comprende 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio también se puede utilizar para estimular células T. La relación de partículas acopladas anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a células T que dan lugar a la estimulación de células T puede variar como se indicó anteriormente, sin embargo, determinados valores adecuados incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1 siendo una relación adecuada al menos 1:1 de partículas por célula T. En un aspecto, se utiliza una relación de partículas con respecto a células de 1:1 o menos. En un aspecto particular, una relación adecuada de partículas:células es 1:5. En aspectos adicionales, la relación de partículas con respecto a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células todos los días o cada dos días a partir de entonces durante un máximo de 10 días, en relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basadas en recuentos de células el día de la adición). En un aspecto particular, la relación de partículas respecto a células es 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y el quinto días de estimulación. En un aspecto, se añaden partículas diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:5 el tercer y el quinto días de estimulación. En un aspecto, la relación de partículas respecto a células es 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y el quinto días de estimulación. En un aspecto, se añaden partículas diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:10 el tercer y el quinto días de estimulación. Un experto en la materia apreciará que una variedad de otras relaciones pueden ser adecuadas para uso en la presente invención. En particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula. En un aspecto, la relaciones más típicas para uso están en la proximidad de 1:1, 2:1 y 3:1 el primer día.

[0564] En otros aspectos, las células, como células T, se combinan con perlas revestidas de agente, posteriormente las perlas y las células se separan y entonces se cultivan las células. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las perlas revestidas de agente y las células no se separan pero se cultivan conjuntamente. En un aspecto adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante aplicación de una fuerza, como una fuerza magnética, lo que da lugar a una ligadura aumentada de marcadores de superficie celular, induciendo de este modo la estimulación celular.

[0565] A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular se pueden ligar permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (perlas de 3x28) entren en contacto con las células T. En un aspecto, las células (por ejemplo 10^4 a 10^9 células T) y las perlas (por ejemplo perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo PBS (sin cationes divalentes como calcio y magnesio). Nuevamente, los expertos en la materia podrán apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo 0,01% de la muestra o la muestra entera (es decir, el 100%) puede comprender la célula diana de interés. En consecuencia, cualquier número de células está en el contexto de la presente invención. En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (por ejemplo aumentar la concentración de células) para asegurar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, en un aspecto se utiliza una concentración de 10 billones de células/ml, 9 billones/ml, 8 billones/ml, 7 billones/ml, 6

billones/ml, 5 billones/ml o 2 billones/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones elevadas puede dar lugar a un rendimiento celular, una activación celular y una expansión celular aumentadas. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite una captura de células más eficiente, que puede expresar débilmente antígenos diana de interés, como células T CD28-negativas. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertos aspectos. Por ejemplo, el uso de una concentración elevada de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[0566] En una realización, las células transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo un CAR descrito en el presente documento, por ejemplo un CAR de CD19 descrito en el presente documento, se expanden, por ejemplo, mediante un método descrito en el presente documento. En una realización, las células se expanden en cultivo durante un periodo de varias horas (por ejemplo alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) a alrededor de 14 días (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). En una realización, las células se expanden durante un periodo de 4 a 9 días. En una realización, las células se expanden durante un periodo de 8 días o menos, por ejemplo 7, 6 o 5 días. En una realización, las células se expanden en cultivo durante 5 días y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días bajo las mismas condiciones de cultivo. La potencia se puede definir, por ejemplo, mediante varias funciones de células T, por ejemplo proliferación, muerte de células diana, producción de citoquinas, activación, migración o combinaciones de las mismas. En una realización, las células, por ejemplo una célula CAR de CD19 descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en duplicaciones celulares tras la estimulación con antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células, por ejemplo las células que expresan un CAR de CD19 descrito en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes presentan una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo niveles de IFN-γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células, por ejemplo una célula CAR de CD19 descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran un aumento de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/ml de producción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN-γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

[0567] También se pueden desear varios ciclos de estimulación, de modo que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser 60 días o más. Condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo Medio Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640 o X-vivo 15, (Lonza)), que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo suero bovino o humano fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ y TNF-α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el artesano experto. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, entre otros, tensioactivos, plasmas y agentes reductores como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, exentas de suero o suplementadas con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas y/o una cantidad de citoquina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de células T. Los antibióticos, por ejemplo penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir a un sujeto. Las células diana se mantienen bajo condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo una temperatura apropiada (por ejemplo 37° C) y atmósfera (por ejemplo aire más 5% de CO_2).

[0568] En una realización, las células se expanden en un medio apropiado (por ejemplo el medio descrito en el presente documento), que incluye una o más interleucinas que dan lugar a un aumento de al menos 200 veces (por ejemplo 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) en las células durante un periodo de expansión de 14 días, por ejemplo según lo medido mediante un método descrito en el presente documento, como citometría de flujo. En una realización, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (por ejemplo IL-15 e IL-7).

[0569] En realizaciones, los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo métodos de fabricación de células que expresan CAR, comprenden eliminar células T reguladoras, por ejemplo células T CD25+, de una población celular, por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-CD25 o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. En el presente documento se describen métodos de eliminación de células T reguladoras, por ejemplo células T CD25+, de una población celular. En realizaciones, los métodos, por ejemplo métodos de fabricación, comprenden además poner en contacto una población celular (por ejemplo una población celular en la que se han depletado células T reguladoras, como células T CD25+; o una población celular que se ha puesto en contacto previamente con un anticuerpo anti-CD25, un fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25) con IL-15 y/o IL-7. Por ejemplo, la población celular (por ejemplo que se ha puesto en contacto previamente con un anticuerpo anti-CD25, un fragmento del mismo o un ligando de unión a CD25) se expande en presencia de IL-15 y/o IL-7.

[0570] En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de interleucina-15 (IL-15), un polipéptido del receptor alfa de interleucina-15 (IL-15Ra) o una combinación de ambos, un polipéptido de IL-15 y un polipéptido de IL-15Ra, por ejemplo hetIL-15, durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo ex vivo. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende una combinación tanto de un polipéptido IL-15 como de un polipéptido IL-15 Ra durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo.

[0571] En una realización la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la expansión ex vivo. En una realización, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la expansión ex vivo. En una realización, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se pone en contacto con una composición que comprende tanto un polipéptido de IL-15 como un polipéptido de IL-15Ra durante la expansión ex vivo. En una realización, el contacto da lugar a la supervivencia y proliferación de una subpoblación de linfocitos, por ejemplo células T CD8+.

[0572] Las células T que se han expuesto a tiempos de estimulación variados pueden exhibir diferentes características. Por ejemplo, los productos de células mononucleares de sangre típica o sangre periférica de aféresis tienen una población de células T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (TC, CD8+). La expansión ex vivo de células T mediante estimulación de receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de los días 8-9 consiste predominantemente en células TH, mientras que después de los días 8-9 la población de células T comprende una población de células TC cada vez mayor. En consecuencia, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir a un sujeto una población de células T compuesta predominantemente por células TH. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto de células TC específico del antígeno, puede ser beneficioso expandir este subconjunto a un mayor grado.

[0573] Además de marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, tal reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de células T activado para fines específicos.

[0574] Una vez que se construye un CAR descrito en el presente documento, se pueden utilizar varios ensayos para evaluar la actividad de la molécula, como la capacidad de expandir las células T después de la estimulación del antígeno, mantener la expansión de células T en ausencia de reestimulación y las actividades anticancerosas en modelos in vitro y animales apropiados. Los ensayos para evaluar los efectos de un CAR para su uso en la presente invención se describen con más detalle a continuación

[0575] Los análisis Western blot de la expresión de CAR en células T primarias se puede utilizar para detectar la presencia de monómeros y dímeros, por ejemplo como se describe en el párrafo 695 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

[0576] La expansión *In vitro* de células T con CAR^+ después de la estimulación del antígeno se puede medir mediante citometría de flujo. Por ejemplo, una mezcla de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ se estimula con αCD3/αCD28 aAPC seguida de transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores a analizar. Promotores ejemplares incluyen los genes CMV IE, EF-1α, ubiquitina C o promotores de fosfogliceroquinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa el día 6 de cultivo en los subconjuntos de células T $CD4^+$ y/o $CD8^+$ mediante citometría de flujo. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Alternativamente, una mezcla de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ se estimula con perlas magnéticas revestidas con αCD3/αCD28 el día 0 y se transducen con CAR el día 1 utilizando un vector lentiviral bicistrónico que expresa CAR vector utilizando una secuencia de omisión ribosómica 2A. Los cultivos se reestimulan con células K562 con un antígeno asociado al cáncer como se describe en la $presente^+$ (K562-que expresan un antígeno asociado al cáncer como se describe en la presente), células K562 de tipo salvaje (K562 de tipo salvaje) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se añaden 100 U/mL de IL-2 exógena a los cultivos en días alternos. Las células T GFP^+ se enumeran por citometría de flujo utilizando un recuento basado en las perlas. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

[0577] También puede medirse la expansión sostenida de células T con CAR^+ en ausencia de reestimulación. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Brevemente, el volumen medio de células T (fl) se mide el día 8 de cultivo utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer III, un Nexcelom Cellometer Vision o Millipore Scepter, después de estimulación con perlas magnéticas revestidas con αCD3/αCD28 el día 0 y transducción con el CAR indicado el día 1.

[0578] También se pueden utilizar modelos animales para medir una actividad de células que expresan CAR, por ejemplo como se describe en el párrafo 698 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

[0579] La respuesta al tratamiento con CAR dependiente de la dosis se puede evaluar, por ejemplo, como se describe en el párrafo 699 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

[0580] Previamente se ha descrito la evaluación de la proliferación celular y la producción de citoquina, como se describe en el párrafo 700 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

[0581] La citotoxicidad se puede evaluar mediante un ensayo de liberación de 51Cr, por ejemplo como se describe en el párrafo 701 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

[0582] La citotoxicidad también se puede evaluar mediante medición de cambios en la impedancia eléctrica de la célula adherente, por ejemplo utilizando un analizador celular en tiempo real xCELLigence (RTCA). En algunas realizaciones, se mide la citotoxicidad en múltiples puntos temporales.

[0583] Para evaluar el tráfico específico y la proliferación de los CAR en modelos animales portadores de tumores se pueden utilizar tecnologías de generación de imágenes, por ejemplo como se describe en el párrafo 702 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

[0584] Para evaluar los CAR descritos en el presente documento se pueden utilizar otros ensayos, incluyendo los descritos en la sección de Ejemplos del presente documento, así como los conocidos en la técnica.

[0585] Alternativamente o en combinación con los métodos divulgados en el presente documento, se divulgan métodos y composiciones para una o más de: detección y/o cuantificación de células que expresan CAR (por ejemplo in vitro o in vivo (por ejemplo seguimiento clínico)); expansión de células inmunitarias y/o activación; y/o selección específica de CAR, que implica el uso de un ligando CAR. En una realización ejemplar, el ligando de CAR es un anticuerpo que se une a la molécula CAR, por ejemplo se une al dominio de unión al antígeno extracelular de CAR (por ejemplo un anticuerpo que se une al dominio de unión al antígeno, por ejemplo un anticuerpo antiidiotípico; o un anticuerpo que se une a una región constante del dominio de unión extracelular). En otros casos, el ligando de CAR es una molécula para antigénica para el CAR (por ejemplo una molécula antigénica para el CAR como se describe en el presente documento).

[0586] En un aspecto, se divulga un método para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR. Por ejemplo, el ligando de CAR puede utilizarse para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR in vitro o in vivo (por ejemplo, monitorización clínica de células que expresan CAR en un paciente o administración a un paciente). El método incluye:

proporcionar el ligando CAR (opcionalmente un ligando CAR marcado, por ejemplo un ligando CAR que incluye una marca, una perla, una etiqueta radioactiva o fluorescente);

adquirir la célula que expresa CAR (por ejemplo adquirir una muestra que contiene células que expresan CAR, como una muestra de fabricación o una muestra clínica);

poner en contacto la célula que expresa CAR con el ligando CAR bajo condiciones en las que se produce la unión, detectando de este modo el nivel (por ejemplo la cantidad) de células que expresan CAR presentes. La unión de la célula que expresa CAR con el ligando CAR se puede detectar utilizando técnicas estándar, como FACS, ELISA y similares.

[0587] En otro aspecto, se divulga un método de expansión y/o activación de células (por ejemplo células efectoras inmunitarias). El método incluye:

proporcionar una célula que expresa CAR (por ejemplo una primera célula que expresa CAR o una célula de CAR que expresa de manera transitoria);

poner en contacto dicha célula que expresa CAR con un ligando CAR, por ejemplo un ligando CAR como se describe en el presente documento), en condiciones en las que se produce expansión y/o proliferación de células inmunitarias, produciendo de este modo la población de células activada y/o expandida.

[0588] En ciertas realizaciones, el ligando CAR está presente en un sustrato (por ejemplo está inmovilizado o adherido a un sustrato, por ejemplo un sustrato que no se produce naturalmente). En algunos casos, el sustrato es un sustrato no celular. El sustrato no celular puede ser un soporte sólido elegido entre, por ejemplo, una placa (por ejemplo una placa de microtitulación), una membrana (por ejemplo una membrana de nitrocelulosa), una matriz, un chip o una perla. En las realizaciones, el ligando de CAR está presente en el sustrato (por ejemplo en la superficie del sustrato). El ligando de CAR se puede inmovilizar, unir o asociar covalente o no covalentemente (por ejemplo entrecruzar) al sustrato. En un caso, el ligando de CAR se une (por ejemplo se une covalentemente) a una perla. En las realizaciones

mencionadas anteriormente, la población de células inmunitarias se puede expandir in vitro o ex vivo. El método puede incluir además cultivar la población de células inmunitarias en presencia del ligando de la molécula CAR, por ejemplo, utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

[0589] En otras realizaciones, el método de expansión y/o activación de las células comprende además la adición de una segunda molécula estimuladora, por ejemplo CD28. Por ejemplo, el ligando CAR y la segunda molécula estimuladora se pueden inmovilizar en un sustrato, por ejemplo una o más perlas, proporcionando de este modo una expansión y/o activación celular aumentada.

[0590] En otro aspecto, se proporciona un método para seleccionar o enriquecer una célula que expresa CAR. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando CAR como se describe en el presente documento; y seleccionar la célula sobre la base de la unión del ligando CAR.

[0591] También se divulga un método para depletar, reducir y/o matar una célula que expresa CAR. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando CAR como se describe en el presente documento; y dirigir a la célula sobre la base de la unión del ligando CAR, reduciendo de este modo el número, y/o matar la célula que expresa CAR. El ligando CAR puede estar acoplado a un agente tóxico (por ejemplo una toxina o un fármaco ablativo celular). El anticuerpo anti-idiotípico puede causar actividad de célula efectora, por ejemplo actividades de ADCC o ADC.

[0592] Se describen ejemplos de anticuerpos anti-CAR que se pueden utilizar en los métodos divulgados en el presente documento, por ejemplo en el documento WO 2014/190273 y por Jena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS marzo de 2013 8:3 e57838.

[0593] En algunos aspectos y realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención están optimizados para un subconjunto específico de células T, por ejemplo como se describe en el Nº de Serie de EE.UU. PCT/US2015/043219 presentado el 31 de julio de 2015. En algunas realizaciones, los subconjuntos optimizados de células T muestran una persistencia mejorada en comparación con una célula T de control, por ejemplo una célula T de un tipo diferente (por ejemplo CD8+ o CD4+) que expresa la misma construcción.

[0594] En algunas realizaciones, una célula T CD4+ comprende un CAR descrito en el presente documento, comprendiendo el CAR un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo optimizado, por ejemplo que conduce a una persistencia potenciada en) una célula T CD4+, por ejemplo un dominio de ICOS. En algunas realizaciones, una célula T CD8+ comprende un CAR descrito en el presente documento, donde el CAR comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo optimizado para, por ejemplo, que da lugar a una persistencia mejorada de) una célula T CD8+, por ejemplo un dominio de 4-1BB, un dominio de CD28, u otro dominio coestimulador diferente de un dominio de ICOS. En algunas realizaciones, el CAR descrito en el presente documento comprende un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento, por ejemplo, un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno.

Métodos de suministro de biopolímeros

[0595] Una o más células que expresan CAR, como se divulga en el presente documento, se pueden administrar o suministrar al sujeto a través de un armazón biopolimérico, por ejemplo un implante biopolimérico. Los armazones biopoliméricos pueden apoyar o potenciar el suministro, la expansión y/o la dispersión de las células que expresan CAR descritas en el presente documento. Un armazón biopolimérico comprende una polímero biocompatible (por ejemplo que no induce sustancialmente una respuesta inflamatoria o inmunitaria) y/o biodegradable que puede ser natural o sintético. Se describen biopolímeros ilustrativos, por ejemplo, en los párrafos 1004-1006 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Composiciones farmacéuticas y tratamientos

[0596] Las células que expresan CAR producidas por la invención se pueden utilizar en un método de tratamiento de un paciente, que comprende la administración de células que expresan CAR producidas por la invención, opcionalmente en combinación con una o más terapias. Un método de tratamiento de un paciente puede comprender la recepción de una célula que expresa CAR que se produjo como se describe en el presente documento, y además comprende la administración de la célula que expresa CAR al paciente, opcionalmente en combinación con una o más terapias diferentes. Un método de tratamiento de un paciente puede comprender la producción de una célula que expresa CAR como se describe en el presente documento, y además comprende la administración de la célula que expresa CAR al paciente, opcionalmente en combinación con una o más terapias diferentes. La otra terapia puede ser, por ejemplo, una terapia contra el cáncer, como quimioterapia.

[0597] Las células que expresan CAR descritas en el presente documento se pueden administrar a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de células Treg. Los métodos que disminuyen el número de (por ejemplo depletan) células Treg son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, depleción de CD25,

administración de ciclofosfamida, modulación de la función de GITR. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la reducción del número de células Treg en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento reduce el número de células inmunitarias no deseadas (por ejemplo Tregs) en el microentorno tumoral y reduce el riesgo de recaída del sujeto.

[0598] Una terapia descrita en el presente documento, por ejemplo una célula que expresa CAR, se puede administrar a un sujeto en combinación con una molécula que se dirige a GITR y/o que modula funciones de GITR, como un agonista GITR y/o anticuerpo GITR que depleta células T reguladoras (Tregs). Las células que expresan un CAR descritas en el presente documento se pueden administrar a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. Las moléculas de unión a GITR y/o las moléculas que modulan las funciones de GITR (por ejemplo agonista GITR y/o anticuerpos GITR de depleción de Treg) se pueden administrar antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, un agonista GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. Se puede administrar ciclofosfamida al sujeto antes de la administración (por ejemplo infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. Se puede administrar ciclofosfamida y un anticuerpo anti-GITR al sujeto antes de la administración (por ejemplo infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. El sujeto puede tener cáncer (por ejemplo un cáncer sólido o un cáncer hematológico como ALL o CLL). El sujeto puede tener CLL o ALL. El sujeto puede tener un cáncer sólido, por ejemplo un cáncer sólido descrito en el presente documento. Agonistas de GITR ejemplares incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de GITR y anticuerpos anti-GITR (por ejemplos anticuerpos anti-GITR bivalentes) como por ejemplo una proteína de fusión de GITR descrita en la Patente de EE.UU. Nº: 6,111,090, Patente Europea Nº: 090505B1, U.S Patent Nº: 8,586,023, PCT Nº de Publicación.: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nº: 7,025,962, Patente Europea Nº: 1947183B1, Patente de EE.UU. Nº: 7,812,135, Patente de EE.UU. Nº: 8,388,967, Patente de EE.UU. Nº: 8,591,886, Patente Europea Nº: EP 1866339, Publicación PCT Nº: WO 2011/028683, Publicación PCT Nº: WO 2013/039954, Publicación PCT Nº: WO2005/007190, Publicación PCT Nº: WO 2007/133822, Publicación PCT Nº: WO2005/055808, Publicación PCT Nº: WO 99/40196, Publicación PCT Nº: WO 2001/03720, Publicación PCT Nº: WO99/20758, Publicación PCT Nº: WO2006/083289, Publicación PCT Nº: WO 2005/115451, Patente de EE. UU. Nº: 7 618 632 y Publicación PCT Nº: WO 2011/051726.

[0599] Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se puede administrar a un sujeto en combinación con un agonista GITR, por ejemplo un agonista GITR descrito en el presente documento. El agonista GITR se puede administrar antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, el agonista GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. El sujeto puede tener CLL.

[0600] Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además la formulación de una célula que expresa CAR en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una célula que expresa CAR, por ejemplo una pluralidad de células que expresan CAR, como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones, tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones se pueden formular, por ejemplo, para la administración intravenosa.

[0601] En una realización, la composición farmacéutica está sustancialmente exenta de contaminante, por ejemplo no hay niveles detectables del mismo, por ejemplo seleccionado a partir del grupo formado por endotoxina, micoplasma, lentivirus competente de replicación (RCL), p24, ácido nucleico VSV-G, gag de VIH, perlas revestidas de anti-CD3/anti-CD28 residual, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina sérica bovina, suero bovino, componentes de medios de cultivo, componentes celulares o plasmídicos de empaquetamiento vectorial, una bacteria y un hongo. En una realización, la bacteria se selecciona al menos a partir del grupo formado por Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenza, Neisseria meningitides, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia y Streptococcus pyogenes grupo A.

[0602] Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente efectiva", "una cantidad anticancerígena efectiva", "una cantidad inhibidora de cáncer efectiva" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones a administrar se puede determinar por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión o infección o metástasis y afección del paciente (sujeto). Generalmente, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) descrita en el presente documento se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de estos intervalos. Las composiciones de células T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosificaciones. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988).

[0603] En algunas realizaciones, una dosis de células de CAR (por ejemplo células de CAR de CD19) comprende alrededor de 1×10^6, $1{,}1 \times 10^6$, 2×10^6, $3{,}6 \times 10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8 \times 10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células de CAR (por ejemplo células de CAR de CD19)

comprende al menos alrededor de 1×10^6, $1{,}1 \times 10^6$, 2×10^6, $3{,}6 \times 10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8 \times 10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células de CAR (por ejemplo células de CAR de CD19) comprende hasta alrededor de 1×10^6, $1{,}1 \times 10^6$, 2×10^6, $3{,}6 \times 10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8 \times 10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células de CAR (por ejemplo células de CAR de CD19) comprende alrededor de $1{,}1 \times 10^6$ - $1{,}8 \times 10^7$ células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células de CAR (por ejemplo células de CAR de CD19) comprende alrededor de 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 o 5×10^9 células. En algunas realizaciones, una dosis de células de CAR (por ejemplo células de CAR de CD19) comprende al menos alrededor de 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 o 5×10^9 células. En algunas realizaciones, una dosis de células de CAR (por ejemplo células de CAR de CD19) comprende hasta alrededor de 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 o 5×10^9 células.

[0604] En ciertos aspectos, puede ser deseable administrar células efectoras inmunitarias activadas (por ejemplo células T, células NK) a un sujeto y posteriormente reextraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK), e infundir de nuevo al paciente estas células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK). Este proceso se puede llevar a cabo múltiples veces a las pocas semanas. En ciertos aspectos, las células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En ciertos aspectos, las células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) se activan a partir de extracciones de sangre de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc o 100cc.

[0605] La administración de las composiciones del sujeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal, por ejemplo por inyección intradérmica o subcutánea. Las composiciones de células efectoras inmunitarias (por ejemplo células T, células NK) se pueden inyectar directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

EJEMPLOS

[0606] La invención se describe adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes, a menos que se especifique lo contrario. Por tanto, no se debe considerar que la invención se limite de ningún modo a los siguientes ejemplos, sino que más bien, se debe considerar que abarca todas y cada una de las variaciones que resultan evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente.

Ejemplo 1: Identificación de atributos del material de aféresis que se correlacionan con el éxito de la fabricación y la calidad del producto

[0607] Los monocitos han sido identificados como un subtipo celular que afecta negativamente la fabricación de CART y la calidad del producto final. Los monocitos pueden afectar negativamente sobre la activación y la transducción de células T al ser una fuente de factores inhibidores, unirse/envolver no manera inespecífica las perlas revestidas de anticuerpo anti-CD3/CD28 y reducir la eficiencia de transducción de genes al servir como disipador para el vector de genes virales (Powell et al. 2009). La presencia de monocitos en el material de leucoféresis del paciente, después de descongelación, ya sea solo o en presencia de blastocitos, reduce la duplicación acumulada de población (cPDL) de una media de 5,5 con lotes sin presencia significativa de monocitos (<20% de WBC) a una cPDL media de 2,7 (monocitos >20% de WBC). Cualquier lote con cPDL <4,5 se clasificó como "subóptimo" debido a la incapacidad de alcanzar una dosis predeterminada (número de células T transducidas), una eficiencia de transducción comprometida (<2%) y/o una potencia no mensurable (fondo <5x). Una proporción significativa de lotes de fabricación (33%) han presentado desafíos de fabricación.

[0608] A continuación se muestran varios ejemplos de malos resultados cuando las muestras de leukopak descongeladas que contienen una gran cantidad de monocitos o blastocitos de células B se someten al actual protocolo de fabricación de células CART estándar (Proceso B). Debido a que el número total de glóbulos blancos es fijo, una consecuencia directa de los lotes de pacientes con un porcentaje relativamente alto de monocitos o blastos de células B CD19+ significa que se puede sembrar un número de células T el día 0.

[0609] Además, un porcentaje tan elevado de monocitos o blastos de células B en la muestra que posteriormente se estimula con perlas, se transduce lentiviralmente y se expande durante varios días en cultivo, actúa para comprometer la activación de células T y el potencial de expansión. Es probable que a medida que las células no T sufren apoptosis y muerte celular, el medio de cultivo celular se vea comprometido y toxificado por desechos celulares y sea menos capaz de apoyar la expansión selectiva de células T sanas.

[0610] Los resultados mostrados en la Tabla 5 a continuación demuestran los problemas y cuestiones que surgen cuando el material de aféresis descongelado que contiene altos niveles de monocitos y células B se coloca en el actual protocolo estándar de fabricación de células T con CAR (Proceso B). Por ejemplo, la muestra de leukopak del Paciente

F1 contenía 47,1% de monocitos CD14+ después de la descongelación. Esta muestra experimentó crecimiento celular subóptimo y estaba fuera de especificación (OOS) en la cosecha del Día 11.

Tabla 5. Ejemplos de materiales de aféresis de pacientes que contienen una cantidad elevada de monocitos o células de o blastocitos B CD19+ y el impacto en la expansión y la función celular

Ejemplos seleccionados de lotes de Pacientes	(Linfoblasto potencial) CD45 (Dim-)	Mono CD14+ of CD45+	Células B CD3-/CD19&20+ de CD45+	Células T CD3+ CD19&20- de CD45+	Grans CD15+ de CD45+	Números
Paciente F1	1,9	47,1	0,8	32,3	0,1	Crecimiento celular subóptimo; cosecha Día 11 (OOS); baja recuperación post-descongelación
Paciente G1	81,5	1,3	81,1	16,2	0,1	Crecimiento celular subóptimo
Paciente H1/H2	67,3	1,2	48,6	25,6	1,4	Crecimiento celular subóptimo; H1 terminado en PU, H2 cosechado el Día 11; no cumple potencia ni dosis (OOS)
Paciente J1	61,0	0,2	54,7	42,5	0,8	Crecimiento celular subóptimo
Paciente L1	N/A	50,2	N/A	32,9	3,1	Crecimiento celular subóptimo
Paciente N1	23,9	29,2	27,0	42,1	0,0	Baja recuperación de células D3 y crecimiento celular subóptimo
Paciente P1	55,5	0,5	63,5	30,3	0,0	Baja recuperación de células D3 y crecimiento celular subóptimo; no cumpliría el requisito de dosis NVS Crecimiento celular subóptimo; no cumple dosis (OOS)
Paciente S1	N/A	56,5	N/A	32,3	10,6	

La muestra de leukopak del Paciente P1 comenzó con 55,5% de blastocitos (células leucémicas CD19+) y mostró crecimiento celular subóptimo y recuperación de células T y no cumpliría los actuales requerimientos de dosis para uso clínico.

Ejemplo 2: Comparación de Métodos de Elutriación

[0611] Como ejemplo del programa de elutriación modificado, se ha demostrado que los ajustes de elutriación enumerados en la **Tabla 6** a continuación son capaces de separar linfocitos de monocitos. En resumen, los materiales de aféresis congelados se descongelaron, se diluyeron con PBS y después se conectaron al dispositivo de elutriación donde se conectaron todos los medios de elutriación requeridos. El sistema se ceba, seguido de introducción de las células en la cámara. Mientras tanto, también se introducen medios de elutriación en la cámara para proporcionar el contraflujo y conseguir la separación de tipos de células. Normalmente, la Fracción 3 (F3) o una combinación de las Fracciones 3 y 4 (F3+F4) contiene la población de linfocitos diana con la mínima cantidad de monocitos, granulocitos y otras células no linfocíticas.

Tabla 6: Ajustes de Elutriación de Muestra

Fracción	Tasa de Flujo (mL/min)	Centrifugación (rpm)	Volumen (ml)
F1	30,0	2400	900
F2	30,0	2400	500
F3	70,0	2400	975
F4	72,0	2400	400
F5	82,0	0	250

[0612] Se realizó una comparación directa entre el actual proceso estándar de Ficoll (Proceso B) y el programa de elutriación modificado (Elutriación) para determinar la respectiva capacidad de procesar materiales de aféresis que contienen cantidades elevadas de monocitos. Después de la descongelación, las muestras de leukopak de 5 donantes

normales diferentes se dividieron por la mitad y se procesó un brazo utilizando métodos estándar (Proceso B) y se procesó el otro con elutriación modificada. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7.**

Tabla 7: Ejemplos seleccionados de materiales de aféresis de donantes sanos procesados mediante el paso de Ficoll en el actual Proceso B o mediante programa de elutriación modificada.

Número de lote	Proceso Post-Descongelación	% de Monocitos en aféresis	% de Monocitos post elutriación	% de Células T post elutriación	% de CAR
4841	Elutriación	24	2	91	ND
	Sin elutriación (Proceso B)	24	44	38	ND
4883	Elutriación	25	10	70	13
	Sin elutriación (Proceso B)	25	33	30	12
5049	Elutriación	26	1	65	21
	Sin elutriación (Proceso B)	26	26	25	26
5131	Elutriación	31	1	62	16
	Sin elutriación (Proceso B)	31	50	41	20
5252	Elutriación	29	1	85	32
	Sin elutriación (Proceso B)	29	52	13	23

[0613] Los resultados mostrados en la **Tabla 7** anterior muestran claramente la efectividad del nuevo proceso Elutra en la eliminación de monocitos de las muestras celulares el Día 0 antes de iniciar posteriores pasos de fabricación. Por ejemplo, se detectó que el Donante 4841 contenía un 24% de monocitos en la muestra de aféresis descongelada. Después de procesar la mitad de la muestra con el protocolo estándar (Proceso B), las células del Día 0 contenían un 44% de monocitos. Una cantidad tan elevada de células no T afectó negativamente sobre los rendimientos de células T en las células cosechadas al final del proceso de fabricación (solo el 38% de células cosechadas eran células T). Por el contrario, la mitad de la muestra que se fabricó utilizando el proceso Elutra modificado, como se describe en esta divulgación, mostró solo un 2% de 'contaminación' de monocitos el Día 0, con un rendimiento y una recuperación de células T muy mejorados (el 91% de células cosechadas eran células T). Esta eficiencia de separación se demostró también en el procesamiento de materiales de leucoféresis en pacientes con linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), que contenían un porcentaje elevado de monocitos, como se observa en la **Tabla 8** a continuación.

Tabla 8: Elutriación de material de leucoféresis del paciente de DLBCL descongelado, previamente criopreservado

Número de lote de paciente	% de Monocitos		% de células T	
	Leucoféresis	Recogida Post-Elutra	Leucoféresis	Recogida Post-Elutra
Paciente 51	67,9	2,0	3,0	82,0
Paciente At	48,7	3,0	52,6	66,3
Paciente B1	38,9	1,5	46,2	67,8
Paciente C1	49,0	2,0	55,8	91,9

Ejemplo 3: El Paso de Lavado Modificado Reduce y Estabiliza Células y Reduce la Aglutinación

[0614] En el actual Proceso B de fabricación, el material de leucoféresis celular del paciente se descongela en Plasmatherm (Genesis), se lava utilizando el instrumento CellSaver 5+ (Haemonetics) y después se resuspende en un medio de expansión celular basado en medio X-VIVO15 (Lonza), llamado 'Medio Modificado' (MM) o en solución salina isotónica tamponada como solución salina tamponada con fosfato (PBS) para la posterior selección de linfocitos de Ficoll. El Medio Modificado se prepara según los componentes proporcionados en la **Tabla 9** a continuación.

Tabla 9 Componentes del Medio Modificado

Componente	Concentración Final	Descripción de Reactivo
X-VIVO 15	N/A (medio base)	Medio X-VIVO 15 químicamente definido exento de suero, sin gentamicina o rojo de fenol, Lonza Cat# 04-744Q o equivalente
HEPES	20 mM	1 M HEPES, Lonza, Cat # 17-737E o equivalente
GlutaMAX	2 mM	Suplemento de medio GlutaMAX, Life Technologies, Cat#35050-061 o equivalente
N-Acetilcisteína (NAC)	10 mM	N-Acetilcisteína, APP Pharmaceuticals, LLC, Cat#963030 o equivalente
Mezcla de vitaminas MEM	1%	Mezcla de Vitaminas Esenciales MEM, Lonza, Cat # 13-607C o equivalente
Piruvato de Sodio	1 mM	Lonza, Cat # 13-115E o equivalente
IL-2	100 IU/mL	IL2 (Proleucina), Novartis, NDC 65483-116-07 o equivalente
Suero Humano	5%	Suero humano AB+ inactivado por calor

[0615] La transferencia de células descongeladas a Medio Modificado o a solución de PBS puede provocar que las células se aglomeren. Para mitigar esto, se investigaron tampones de resuspensión celular alternativos. Se descubrió que una solución acuosa con 5% de dextrosa y 0,45% de cloruro de sodio (denominada indistintamente Dextrosa/NaCl, 'D5' o D5 1/2 NS en el presente documento) estabiliza la suspensión celular y evita la aglomeración. Las células suspendidas en D5 son estables y no se aglomeran cuando se mantienen a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. La solución D5 también es compatible con los posteriores pasos de fabricación, incluyendo la selección positiva de células T mediante estimulación con Dynabeads anti-CD3/CD28 CTS (Thermo Fisher).

[0616] Se utilizó el dispositivo Sepax 2 RM (Biosafe) para lavar células leukopak descongeladas para eliminar desechos subcelulares, hemoglobina libre y crioprotectores, para conseguir reducción de volumen y para permitir la posterior separación por gradiente de densidad de Ficoll. Para reducir la contaminación de monocitos, evitando al mismo tiempo la aglomeración de células, se realizó el protocolo Sepax 2 SmartWash utilizando medio D5 en lugar de Medio Modificado. La **FIG. 15A y 15B** muestra fotografías que documentan aglomeración extensa de células después de 2 horas en Medio Modificado (FIG. 15A), mientras que las células mantenidas en solución D5 durante el mismo periodo de tiempo muestran poca o nula aglomeración (FIG. 15B).

[0617] Se proporcionan detalles técnicos adicionales de cómo realizar el proceso modificado que implica Seax SmartWash en solución acuosa D5. El operario abre el kit de procesamiento celular de un solo uso Sepax dentro de la vitrina de bioseguridad (BSC) y adhiere la bolsa de células de leucoféresis descongeladas y la bolsa de medios al kit desechable. Se instala el kit en el dispositivo Sepax 2 y se selecciona el procedimiento SmartWash, con un volumen de salida de 115mL. El procedimiento de centrifugación SmartWash granula las células que se resuspenden entonces con solución D5 hasta el volumen final de 115mL.

[0618] A continuación se detalla paso a paso el proceso de fabricación utilizando solución D5:

Paso 1. Se descongela leukopak y se mezcla con solución acuosa de 5% de dextrosa y 0,45% de cloruro de sodio (7-10 volúmenes de solución respecto a un volumen de leukopak).

Paso 2. Se deja que las células se equilibren durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Paso 3. Se eliminan medios criogénicos y desechos con el lavado celular Sepax 2 utilizando el programa SmartWash en solución D5.

Paso 4. Las células se resuspenden en la solución acuosa D5.

Paso 5. Se realiza la selección positiva de células T en la solución acuosa D5 en lugar de utilizar el Medio Modificado.

Paso 6. Cuando se completa la selección positiva en solución D5 se elimina la fracción negativa (células no T) y se resuspende la fracción positiva (células T) en el Medio Modificado para los posteriores pasos de expansión celular.

Este protocolo revisado que utiliza solución acuosa D5 para preparar células de aféresis descongeladas para la fabricación de células T con CAR se puede realizar directamente en el dispositivo Sepax y evita la necesidad de utilizar el instrumento CellSaver 5 Plus (CSS+) (Haemonetics) para lavar las células. Los resultados presentados en la **FIG.**

16A a continuación demuestran que el procedimiento Sepax SmartWash proporciona un mejor rendimiento celular en comparación con el lavado con CS5+.

[0619] Como se discutió anteriormente, el uso de la solución acuosa D5 (5% de dextrosa y 0,45% de cloruro de sodio) actúa para evitar la aglomeración indeseable de materiales de células de aféresis descongelados, especialmente cuando están presentes porcentajes elevados de granulocitos (por ejemplo neutrófilos). Los resultados presentados en la **FIG. 16A** anterior muestran la superioridad del protocolo Sepax SmartWash sobre el lavado con CSS+, incluso cuando ambos protocolos se realizan utilizando solución acuosa D5.

[0620] La **FIG. 16B** a continuación demuestra que el uso de la solución acuosa D5 evita pérdidas celulares después de un lavado celular con CSS+ y una incubación de 2 horas a temperatura ambiente en comparación con pérdidas celulares de casi el 50% cuando se utiliza Medio Modificado en lugar de D5.

Ejemplo 4: Comparación de Centrifugación por Gradiente de Densidad

[0621] En este ejemplo se compararon simultáneamente cinco series de comparación utilizando materiales de aféresis de donantes normales criopreservados y después descongelados para determinar si el proceso que implica la purificación del medio de gradiente de densidad OptiPrep representa un avance técnico. Los operarios realizaron el protocolo Sepax 2 NeatCell y cuando el protocolo requería Ficoll, se reemplazó con OptiPrep. La **FIG. 18** muestra un esquema de cómo se configura el kit de tuberías desechables de un solo uso Sepax 2 NeatCell (Biosafe CS900.2) con las bolsas de células y medios.

[0622] Después de la descongelación de Plasmatherm, se procesó la mitad de cada muestra normal de leukopak derivada de un donante según el protocolo de Proceso B (lavado con CSS+, reducción de volumen de Sepax 2 y purificación por gradiente de Ficoll). La otra mitad de cada muestra de leukopak descongelada se procesó utilizando el método Sepax con OptiPrep que hemos desarrollado. Los materiales celulares purificados por los 2 métodos diferentes se sometieron por separado a los mismos pasos posteriores en el proceso de fabricación de células T con CAR (estimulación de perlas anti-CD3/CD28, transducción LV, lavado de vector y expansión celular). Los productos celulares se cosecharon el Día 9 y se sometieron a citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos de marcadores de superficie celular (anti-CD3, anti-CD19, anti-CD14) para cuantificar fenotipos celulares relativos y composiciones de subconjuntos. El archivo Excel adjunto/insertado "Tablas de Datos Sepax con OptiPrep" contiene el archivo de datos completo de estos análisis, con resultados generales resumidos en la **Tabla 10** a continuación.

Tabla 10. Resumen de los resultados comparando perfiles de productos de material de aféresis donante normal descongelado preparado utilizando el Proceso B (Ficoll) o mediante el 'método Sepax con OptiPrep'

Resultados: Media/Desviación Estándar para las cinco ejecuciones directas						
	Leukopak		**Producto Ficoll**		**Producto OptiPrep**	
	MEDIA	**DE**	**MEDIA**	**DE**	**MEDIA**	**DE**
WBC total	4,43E+09	7,69E+08	1,01E+09	4,49E+08	1,26E+09	6,11E+08
Abs CD3	1,95E+09	7,32E+08	2,29E+08	1,03E+08	8,25E+08	4,06E+08
Abs CD19	7,89E+08	3,15E+08	2,15E+08	1,31E+08	8,45E+07	4,08E+07
Abs CD14	6,39E+08	3,58E+08	2,78E+08	2,44E+08	1,20E+08	8,64E+07
Abs Otros	8,59E+08	2,14E+08	2,37E+08	1,12E+08	2,11E+08	1,30E+08
Rendimiento de WBC total	N/A	N/A	25%	11%	28%	14%
CD3+ Rendimiento	N/A	N/A	15%	11%	46%	31%
CD19+ Rendimiento	N/A	N/A	41%	36%	10%	4%
CD 14+ Rendimiento	N/A	N/A	34%	23%	16%	7%
Otros Rendimientos	N/A	N/A	27%	13%	26%	14%
%CD3 de WBC	44,04	13,02	30,85	19,46	66,02	11,13
%CD19 de WBC	17,27	5,57	20,55	6,15	7,08	2,14
%CD14 de WBC	14,27	7,61	21,64	17,07	9,24	5,74
%Otros de WBC	20,13	7,02	22,68	6,74	16,15	5,17

[0623] Los resultados de estos análisis muestran que los productos preparados con el nuevo método Sepax con OptiPrep contienen significativamente más células T CD3+ (8,25x10e8 frente a 2,29x10e8), rendimientos mejorados de células CD+ (46% frente a 15%), menos células B CD19+ (10% frente a 41%) y menos monocitos CD14+ (16% frente a 34%). Además, el producto final generado mediante el método Sepax con OptiPrep contienen más del doble de la cantidad de células T CD3+ (66,02%) que están presentes en el producto preparado mediante el Proceso B (30,85%). Estos datos se presentan gráficamente en las **FIGs.19A, 19B, 19C, 19D y 19E.**

Ejemplo 5: Comparación de Métodos de Selección Positiva

[0624] Se realizaron tres experimentos comparando el uso de FAST con el actual protocolo de selección positiva, el Proceso B. Los resultados de estos experimentos exhiben enriquecimiento fiable de células T mediante el protocolo FAST optimizado, con purezas de células T del producto superiores al 90% independientemente de la composición de entrada. Los resultados también apuntan a una depleción muy eficiente de poblaciones de células no T mediante el enfoque FAST, incluyendo monocitos, células B y blastocitos (Nalm6).

[0625] Se implementó la selección positiva FAST para uso en pacientes como un protocolo de contingencia par muestras en las que el porcentaje de blastos excede el 20%. Hasta la fecha, se han procesado tres lotes utilizando FAST. Los tres lotes se expandieron con éxito para cumplir la dosis, siendo sus curvas de crecimiento comparables o superiores a las de los lotes del Proceso B. La **FIG. 22** proporciona una descripción general gráfica de las curvas de crecimiento de lotes clínicos FAST (blanco), comparándolos con los del Proceso B (negro). En particular, los lotes FAST proporcionaron una expansión comparable o superior, con una pérdida reducida de células entre el día 0 y el día 3 en comparación con el Proceso B. Todos los lotes clínicos FAST tenían > 70% de blastos en el material de partida.

Experimento 1:

[0626] Detalles del Experimento 1: El uso de la selección positiva FAST en lugar del actual proceso de selección positiva se probó por primera vez en el experimento FAST006. Este experimento consistía en dos brazos experimentales (**FIG. 23A**), que compartían un paso de lavado con CSS+. El brazo experimental 1 siguió al Proceso B utilizando el lavado con CSS+ seguido de enriquecimiento con Sepax 2-Ficoll, pero reemplazó la selección positiva por FAST. En el brazo experimental 2 se probó un enfoque alternativo en el que se omitió el enriquecimiento con Sepax 2-Ficoll y se realizó una selección positiva FAST directa. Se asignaron tres veces más células totales para el brazo experimental 1 (3x10e9 células totales) que para el brazo 2 (1x10e9 células totales), como se muestra en el esquema de la sección superior de la **FIG. 23A.**

[0627] Resultados del Experimento 1: Tanto en el brazo experimental 1 como en el 2, la selección positiva FAST optimizada proporcionó una pureza elevada de células T del producto final (94% en el brazo 1, 90% en el brazo 2), con una depleción elevada de todas las poblaciones de células no T. En el brazo experimental 1 (**FIG. 23B**), el porcentaje de células T CD45+/CD3+ recuperadas después de Sepax 2-Ficoll descendió al 41% (del 51% en el material donante original), pero la pureza de células T (94%) se restableció después de la selección positiva FAST. El brazo experimental 2 (**FIG. 23C**), a pesar de un número de células de entrada tres veces inferior, proporcionó el mayor número de células T en el producto final (aproximadamente 3 veces más células T), con una pureza final del 90%.

[0628] Resumen del Experimento 1: Este experimento consiguió resultados de prueba de concepto que justifican la sustitución del modo actual de selección positiva por un protocolo FAST modificado. La pureza de células T final después del protocolo FAST era del 90% o superior en ambos brazos experimentales. Se identificó la opción de omitir el paso de enriquecimiento Sepax 2-Ficoll, pero requiere validación adicional.

Experimento 2:

[0629] Detalles del Experimento 2: En este experimento se repitió el uso de la selección positiva FAST en lugar del actual proceso de selección positiva con una aféresis de un donante que contenía un alto porcentaje de monocitos. El experimento consistía en dos brazos experimentales (ver esquema en la parte superior). El brazo experimental 1 siguió al Proceso B utilizando el lavado con CS5+ seguido de enriquecimiento con Sepax 2-Ficoll, pero reemplazó la selección positiva por FAST. En el brazo experimental 2 se probó un enfoque alternativo en el que se realizó directamente un paso de lavado con CS5 seguido de selección positiva FAST. Se utilizó un cuarto de leukopak congelado (LKPK) para cada brazo.

[0630] Resultados del Experimento 2: Tanto en el brazo experimental 1 como en el 2, la selección positiva FAST optimizada proporcionó una pureza elevada de células T del producto final (95% en el brazo 1, 92% en el brazo 2), con una depleción elevada fiable de todas las poblaciones de células no T. En el brazo experimental 1 (lado izquierdo de la **FIG. 24A**), el porcentaje de células T CD45+/CD3+ recuperadas después del paso de Sepax 2-Ficoll descendió al 38% del 56% en el material donante original, el porcentaje de monocitos era 28%, mientras que las células B constituían el 18% de la muestra total. Después de la selección FAST se eliminaron casi todos los monocitos y las células B, con lo que se consiguió una pureza de células T final del 95% (**FIG. 24B**). En el brazo experimental 2 (lado derecho de la **FIG. 24A**), el lavado posterior con CS5+ se purificó directamente utilizando FAST, lo que proporcionó un

producto final completamente depletado de monocitos, con una pureza final de células T del 92%. También en este experimento, la implementación del protocolo modificado, en el que se omitió el enriquecimiento con Sepax 2-Ficoll, produjo el mayor número de células T en el producto final. Las células de esta etapa del experimento se volvieron a colocar en cultivo y fueron transducidas. Las células se cosecharán el día 10 después de la expansión de la ola.

[0631] Resumen del Experimento 2: Se repitió el uso de selección positiva FAST como reemplazo del actual protocolo de selección positiva. Tanto si se utiliza después del lavado con CS5+ o después de Sepax 2-Ficoll, el protocolo optimizado consiguió una elevada eliminación de poblaciones de células no T, eliminando casi todos los monocitos presentes en la muestra, y proporcionó un producto intermedio con alta pureza de células T. Se analizará y se presentará el rendimiento de células separadas por FAST, incluyendo transducción.

Experimento 3:

[0632] Detalles del Experimento 3: En este experimento, se analizó el uso de selección positiva FAST para purificar adicionalmente muestras posteriores a la elutriación con un donante de monocitos elevado. Además, se simuló una condición de blastocitos B elevada, observada frecuentemente cuando se procesan muestras de aféresis de pacientes portadores de tumores, mediante la introducción de células Nalm6 (CD45-/CD19+) en la muestra posterior a la elutriación.

[0633] Resultados del Experimento 3: Como se muestra en la **FIG. 25A,** el material de aféresis del donante normal que contenía 20% de células T y 43% de monocitos, se sometió a elutriación para reducir el porcentaje de monocitos en la muestra al 26% y para enriquecer el porcentaje en células T al 32%. En este punto, se introdujo un número de células Nalm6 comparable al de células T y monocitos, lo que dio lugar a una muestra que contenía 29% de células T, 20% de monocitos y 24% de blastos (Nalm6). El procesamiento de esta muestra adulterada intencionadamente mediante selección positiva FAST proporcionó un producto final depletado de casi todos los monocitos y células Nalm6, con una pureza de células T final del 95%.

[0634] Resumen del Experimento 3: La selección positiva FAST se puede implementar después de la elutriación y en este experimento se demostró que permite una elevada depleción fiable tanto de monocitos como de blastocitos (Nalm6). La pureza de células T final después de realizar la selección FAST en esta muestra difícil era del 95%, partiendo de una pureza de células T tras la elutriación del 29%.

Conclusiones

[0635] La selección positiva FAST se presentó en una serie de experimentos y se demostró que proporciona un enriquecimiento fiable de células T a través de una gama de material de muestra de entrada. El método se probó con números totales de células que oscilaban entre 1E8 y 2E9 células, purezas de células T de entrada del 20% al 50%, porcentaje de monocitos de entrada del 2% al 30%, y fracciones de blastos\Nalm6 del 2% al 100%. En todos los casos probados hasta la fecha, FAST proporcionó un producto final con una pureza de células T del 90% o superior. También se esbozó una estrategia alternativa en la que se elimina el paso de enriquecimiento con Sepax Ficoll para perseguir la selección positiva *FAST* inmediatamente después de CS5, lo que muestra potencial para proporcionar tanto un producto altamente puro como el máximo número de células T en el producto final.

Ejemplo 6: Depleción de células B CD19+ por Selección Negativa

[0636] Se probó la fiabilidad de depleción de CD19 a partir de muestras de aféresis. Se utilizaron muestras de aféresis de un donante sano y un paciente con ALL. Las muestras de aféresis se lavaron y después se realizó la selección negativa de CD19 mediante CliniMACs. Los resultados de la depleción de CD19 se muestran en la Figura 26A. Estos resultados muestran que la depleción de CD 19 mediante CliniMACs demostró ser capaz de eliminar células B de la aféresis de un donante sano. Además, la depleción de CD19 mediante CliniMACs pudo eliminar células B de una aféresis de un paciente con ALL en la que la muestra de aféresis tenía un % muy elevado de blastos. Específicamente, las células B en la muestra de aféresis del paciente con LLA se redujeron en gran medida del 77% a <0,1%.

[0637] A continuación, se probó la eficacia del enriquecimiento de células T mediante un protocolo que incluía un paso de depleción de CD19. Se comparó un protocolo de enriquecimiento que incluía un paso de selección negativa de depleción de CD19 con protocolos de enriquecimiento que no incluyen un paso de selección negativa e incluyen en su lugar un paso de selección positiva. El protocolo denominado TR149 comprende un paso de lavado, centrifugación por gradiente de densidad utilizando Ficoll y el dispositivo Sepax2, y un paso de selección positiva mediante Dynabeads CD3/CD28, también conocida como Proceso B. El protocolo denominado TR150 comprende elutriación, un paso de lavado y un paso de depleción de CD19 (por ejemplo selección negativa) mediante CliniMACs, el protocolo denominado TR151 comprende elutriación, un paso de lavado y un paso de selección positiva mediante Dynabeads CD3/CD28.

[0638] El porcentaje de células T, células B y monocitos en la aféresis, por ejemplo antes del protocolo de enriquecimiento y en las muestra resultante del protocolo de enriquecimiento (en el presente documento denominadas "células sembradas") se muestra en la Figura 26B.

[0639] La depleción de CD19 mediante selección negativa mediante CliniMACs (TR150) eliminó las células B (del 17,7% en la muestra de aféresis) al 0% en las células sembradas. La depleción de células B de la muestra de aféresis dio lugar a una mejora en el enriquecimiento de células T en comparación con otros protocolos que no incluían un paso de depleción de células B (por ejemplo el 80% de células T en las células sembradas para TR150 en comparación con el 20-30% de células T en las células sembradas para TR149 y TR151. Además, según los resultados de estudios previos, el paso de elutriación (por ejemplo en TR150 y TR151) redujo el porcentaje de monocitos del 15% en la muestra de aféresis a <1,5% en las células sembradas, manteniendo una buena recuperación de células T.

[0640] En conclusión, estos resultados demuestran que la depleción de CD19 pudo reducir el porcentaje de células B a <1% después de emplear el protocolo de enriquecimiento y permitió un rendimiento de células T elevado (>80%).

Ejemplo 7: Ensayos de potencia

[0641] Se utilizaron dos ensayos para evaluar la potencia de las células efectoras inmunitarias que expresan CAR y que se enriquecieron después de diferentes protocolos de enriquecimiento, con el fin de determinar si diferentes condiciones de enriquecimiento daban lugar a células efectoras inmunitarias con diferentes potencia dirigida a CAR. Se sometió la aféresis de dos donantes diferentes a diferentes protocolos de enriquecimiento como se muestra en la Tabla 11. A continuación, las células fueron estimuladas y transducidas para expresar un CAR de CD19.

Tabla 11: Resumen de Muestras y Condiciones de Enriquecimiento

Donante	Muestra	Condiciones
Donante 1	TR157	Elutriación
	TR158	Smartwash en D5 + 0,5 h de Selección Positiva
	TR159	Proceso B
	TR160	Lavado CS5 + Sepax-Optiprep con selección positiva
Donante 2	TR161	Elutriación
	TR162	0,5 h de selección positiva
	TR163	Proceso B
	TR164	Sepax-Optiprep solo

Ensayo de Liberación IFNgamma

[0642] Las células se cocultivan en presencia de células que expresan CD19 (células K562 que expresan CD19) como células diana, células que expresan mesotelina (células K562 que expresan mesotelina) como el control negativo o PMA como control positivo. Después de 24 horas se cosechó el sobrenadante del cocultivo y se cuantificaron los niveles de IFNγ mediante ELISA. La liberación de IFNγ se cuantificó como células pg/transducidas para corregir la variación en la eficiencia de transducción.

[0643] Los resultados muestran que la estimulación de CD19 dio lugar a la liberación de IFNγ como se muestra en la FIG. 29A, en la que el nivel de liberación de IFNγ estaba dentro del intervalo de liberación de IFNγ observado cuando las células se enriquecieron mediante protocolos estándar, por ejemplo el Proceso B. Como se esperaba, todas las muestras respondieron a PMA y liberaron IFNγ después de la estimulación de PMA (FIG. 29B). Los niveles más altos de IFNγ resultaron de células transducidas como resultado de la elutriación. Las muestras mostraron mínima respuesta y liberación de IFNγ después de la estimulación con mesotelina (Fig. 29C).

Ensayo de Citotoxicidad

[0644] La citotoxicidad de células que expresan CAR generadas a partir de las condiciones de enriquecimiento descritas en la Tabla 11 se probó mediante cocultivo de células C19 que expresan luciferasa (NALM6, células diana) con células que expresan CAR (células efectoras) en relaciones variables célula efectora:célula diana que oscilan de 1:10.000 a 10:1. Después de 24 horas, se midió la luminiscencia (unidades de luz relativa, RLU) en un lector de placas. La lisis específica (SpLy) se calculó como: 100-(RLU de muestra/RLUmáx)*100. La relación células efectoras:diana sembradas en placa se recalcula para establecer la relación entre células efectoras CTL y células diana mediante el % de células CAR+ (medido por citometría de flujo) para corregir la variación en las tasas de transducción.

[0645] Como se muestra en la FIG. 30A y 30B, todas las muestras alcanzaron la curva de muerte sigmoidea completa, lo que demuestra que se logró una destrucción específica. Las células con potencia de destrucción creciente tienen curvas que están más a la izquierda en el gráfico. Los resultados del ensayo de citotoxicidad se presentaron también como el valor recíproco de EC50. La EC50 se calculó a partir de un ajuste logístico de cuatro parámetros de la curva

para CTL E:T y % de lisis específica. La línea roja discontinua en el gráfico representa los niveles medios de 30 donantes sanos. Como se muestra en la FIG. 30C, todas las muestras tenían buena EC50rec, alrededor o por encima de los niveles medios. La EC50rec más alta procedía de muestras sometidas a elutriación.

Ejemplo 8: Dispositivo de Flujo-Continuo

[0646] El siguiente ejemplo se proporciona solo con fines ilustrativos y no pretende abarcar toda la invención. Los aspectos de este ejemplo se pueden combinar con otros aspectos de la invención descrita en el presente documento.

[0647] En este ejemplo, las células T se expandieron durante un periodo de 9 días en cultivo, después se cosecharon y se liberaron de perlas mediante un proceso de eliminación de perlas de flujo continuo según los anteriores procedimientos o un proceso de eliminación de perlas de flujo continuo según la presente divulgación. Las muestras tenían entre aproximadamente 1e8 células viales nucleadas y aproximadamente 3e10 células viables nucleadas. La relación de partículas paramagnéticas a células viables nucleadas estaba entre aproximadamente 3:1 y 1:3, exhibiendo proporciones más elevadas de partículas paramagnéticas a células viables nucleadas las con un total más bajo de células viables nucleadas. La relación de partícula a célula era un factor significativo en la recuperación de células. Una relación más elevada de partícula paramagnética a célula viable aumentó las posibilidades de que una célula viable nucleada se uniera a una partícula paramagnética y se perdiera durante el proceso de eliminación de partículas paramagnéticas.

[0648] En el proceso de eliminación de perlas de flujo continuo, la muestra se recogió en una bolsa de plaquetas de un litro (Terumo Medical Corp., Somerset, NJ) y se colocó estáticamente sobre una placa magnética de lecho plano (DYNAMAG™ CTS™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de 5 minutos a cero grados, seguidos de un minuto a 30 grados de inclinación. A continuación, el líquido de la bolsa que contenía la fracción no magnética se desvió de la bolsa para formar el producto final. La fracción magnética permaneció dentro de la bolsa como residuo.

[0649] En el proceso de eliminación de perlas de flujo continuo, la muestra se hizo fluir continuamente a través de una bolsa cónica CSD400Y9 CRYOSTORE™ (OriGen Biomedical, Austin, TX) colocada encima de una placa magnética de lecho plano (DYNAMAG™ CTS™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Debido al flujo continuo a través de la bolsa y sobre el imán, la muestra se liberó de perlas dinámicamente, desprendiéndose las partículas paramagnéticas de las células nucleadas viables al moverse a través de la bolsa. El líquido después de pasar por la bolsa durante algún tiempo formó el producto final. La fracción magnética permaneció dentro de la bolsa como residuo. Pocas células nucleadas viables quedaron atrapadas en la fracción magnética. Esto contrasta con el proceso de eliminación de perlas de flujo continuo, en el que las células nucleadas viables unidas a partículas paramagnéticas eran atraídas por el imán y se perdieron en el residuo.

[0650] El análisis de metadatos de treinta y ocho ejecuciones del proceso de eliminación de perlas de flujo continuo y treinta y seis ejecuciones del proceso de eliminación de perlas de flujo continuo mostraron aumentos significativos en la recuperación de células nucleadas viables cuando se utilizó el proceso de eliminación de perlas de flujo continuo. FIG. 31. El aumento en la recuperación de células nucleadas viables era particularmente significativo con menores números de células en la muestra (como menos de 1,6e9 de células nucleadas viables totales). Con tales números de células nucleadas viables totales, el proceso de eliminación de perlas de flujo continuo exhibió una recuperación promedio del 76% en comparación con solo el 34% de recuperación promedio para el proceso de eliminación de perlas de flujo no continuo. FIG. 32. También se observó un aumento del 10-20% en la recuperación con números de células más elevados en la muestra.

[0651] Esta diferencia en la recuperación se debe a la capacidad del proceso de eliminación de perlas de flujo continuo para eliminar dinámicamente partículas paramagnéticas de las células nucleadas viables, de modo que estas células no se pierden incluso si inicialmente estaban unidas a partículas para magnéticas antes de la cosecha.

Ejemplo 9: Métodos de selección positiva

[0652] La selección positiva FAST se puede realizar en leucoféresis recogida de pacientes con neoplasias hematológicas. La muestra del paciente puede comprender >20% de linfoblastos. Las células pueden estar presentes en un recipiente flexible, por ejemplo una bolsa de células, por ejemplo una bolsa rectangular Origen CS250, durante al menos una parte del procedimiento. En primer lugar, si la muestra de leucoféresis está congelada, se realiza un paso de descongelación. Después se pueden lavar las células, por ejemplo mediante un dispositivo CellSaver5+, por ejemplo a temperatura ambiente, por ejemplo 20-25°C. La solución de lavado puede comprender 5% de HABS (suero AB humano) MM, por ejemplo X-VIVO15. Las células se pueden poner en contacto con un reactivo de separación, que comprende una perla magnética o paramagnética y anticuerpos de unión a CD3 yo CD28. Las células se pueden rotar a continuación en un rotador, por ejemplo a 2-6 rpm, por ejemplo a 4 rpm, y la rotación puede durar, por ejemplo 10-30 minutos, por ejemplo 20 minutos. Durante la rotación, las células pueden estar a temperatura ambiente, por ejemplo entre 20 y 25 °C. Después se puede realizar selección positiva para enriquecer células que se unen al reactivo de separación, por ejemplo durante 30 s a 2 minutos, por ejemplo durante 1 minuto.

Ejemplo 10: Métodos de selección positiva

[0653] La selección positiva FAST se puede realizar en leucoféresis recogida de pacientes con neoplasias hematológicas. Las células pueden estar presentes en un recipiente flexible, por ejemplo una bolsa de células, por ejemplo una bolsa rectangular Origen CS250, durante al menos una parte del procedimiento. En primer lugar, si la muestra de leucoféresis está congelada, se realiza un paso de descongelación. Después se pueden lavar las células, por ejemplo mediante un dispositivo CellSaver5+, por ejemplo a temperatura ambiente, por ejemplo 20-25°C. La solución de lavado puede comprender 5% de dextrosa, 0,45% de cloruro de sodio (por ejemplo D5 1/2NS). Si hay una retención entre el paso de lavado y el paso posterior, la bolsa de células se puede colocar sobre un material aislante térmico, por ejemplo una pluralidad de capas que comprenden papel, por ejemplo toallas de papel o toallitas. Las células se pueden poner en contacto con un reactivo de separación, que comprende una perla magnética o paramagnética y anticuerpos de unión a CD3 yo CD28. Las células se pueden incubar a continuación, por ejemplo a 37°C, por ejemplo durante 5-15 minutos, por ejemplo 10 minutos. Las células se pueden rotar a continuación en un rotador, por ejemplo a 2-6 rpm, por ejemplo a 4 rpm, y la rotación puede durar, por ejemplo 10-30 minutos, por ejemplo 20 minutos. El material aislante térmico se puede colocar entre el recipiente flexible para las células y un lado de la placa de células del rotador. Durante la rotación, las células pueden estar a una temperatura superior a la temperatura ambiente, por ejemplo entre 20 y 37 °C. A continuación se puede realizar selección positiva para enriquecer en células que se unen al reactivo de separación, por ejemplo durante 30 a 2 minutos, por ejemplo durante 1 minuto.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una población de células efectoras inmunitarias humanas (por ejemplo células T) que se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), comprendiendo el método:
a) proporcionar una muestra de entrada congelada, por ejemplo una muestra de aféresis plasmática, que comprenda células efectoras inmunitarias, en donde la muestra de entrada procede de un paciente que tiene una enfermedad asociada a un antígeno tumoral, y en la que la enfermedad asociada a un antígeno tumoral es un cáncer o una enfermedad autoinmune,
b) descongelar la muestra de entrada congelada para producir una muestra descongelada, y
c) realizar la elutriación en la muestra descongelada y recoger células inmunitarias efectoras, produciendo así una muestra de salida que comprenda células inmunitarias efectoras que sean adecuadas para la expresión de un CAR, opcionalmente en donde:
(i) el método comprende un paso de ajuste de la viscosidad de la muestra descongelada, por ejemplo mediante adición de una solución isotónica, por ejemplo PBS, a la muestra descongelada; y/o
(ii) la elutriación se realiza:
1) utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30-82 mL/min o 50-80 mL/min y/o el volumen de recogida es alrededor de 250-1250 mL o 300-1000 mL para cada fracción, por ejemplo la elutriación se realiza utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30, 40, 50, 60, 70, 72 u 82 mL/min, por ejemplo alrededor de 70 o 72 mL/min;
2) utilizando un volumen de recogida de alrededor de 250, 400, 500, 900 o 975 mL, por ejemplo alrededor de 400 o 975 mL; y/o
3) a alrededor de 2400 rpm.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además uno, dos, tres o la totalidad de:
d) depleción de células CD19+ en condiciones de flujo;
e) realizar centrifugación por densidad utilizando un medio que contiene iodixanol, por ejemplo 60 % de iodixanol en agua, por ejemplo medio Optiprep, y/o que tiene una densidad mayor que Ficoll (por ejemplo mayor que 1,077 g/ml, por ejemplo alrededor de 1,32 g/ml));
f) realizar un paso de lavado (por ejemplo en la muestra descongelada) con un tampón que contiene dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5 (5 % de dextrosa y 0,45 % de cloruro de sodio), por ejemplo en donde el paso de lavado se realiza utilizando un instrumento CS5 (CellSaver5+); y
g) realizar una selección positiva de células CD3/CD28+ en condiciones de flujo.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la muestra de entrada comprende:
al menos 10%, 15%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 35% o 40% de monocitos;
al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de monocitos;
menos de 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% o 20% de células efectoras inmunitarias, por ejemplo células T;
al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células B; y/o
al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células tumorales, por ejemplo linfoblastos.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la muestra de salida comprende:
menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de monocitos;
menos de 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de porcentaje de monocitos en comparación con la muestra de entrada;
al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 99,9% de células T.
al menos 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de porcentaje de células T, en comparación con la muestra de entrada;
células T CD8+ y/o células T CD4+;
menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de células B;
al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% o 99,9% de células CD4+CD25+;
al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,7% o 99,9% de células CD8+CD25+;
menos de 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% o 0,1% de células tumorales; y/o
menos de 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de porcentaje de células tumorales en comparación con la muestra de entrada.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que tiene una recuperación de rendimiento de células T de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células T.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la muestra de salida se pone en contacto con un ácido nucleico que codifica un CAR, opcionalmente en donde el método comprende la transducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en una o más de las células efectoras inmunitarias en la muestra de salida, opcionalmente en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, por ejemplo que comprende un dominio de señalización primario y/o un dominio de señalización coestimulador, y opcionalmente en donde la transducción da lugar a una eficiencia de transducción al menos de alrededor de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50%.

7. El método de la reivindicación 6, en donde, después de poner en contacto la muestra de salida con un ácido nucleico que codifica un CAR, la muestra de salida:
comprende al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células de memoria central CAR+CD4+;
comprende al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% de células CAR+;
comprende al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de células de memoria central CAR+CD8+;
produce menos de 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 pg de IFN-gamma por célula transducida; y/o
comprende un nivel de citotoxicidad (por ejemplo una EC50rec) de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30.

8. El método de la reivindicación 6 o 7, que comprende además un paso de ensayo de eficiencia de transducción y/o realización de un paso de lavado en la muestra de entrada con un tampón que comprende dextrosa y/o cloruro de sodio, por ejemplo medio D5, por ejemplo utilizando un instrumento CS5+.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra de entrada es de un paciente que tiene cáncer.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la muestra de entrada es de un paciente que tiene un cáncer seleccionado del grupo formado por una o más leucemias agudas incluyendo leucemia linfoide aguda de células B / leucemia linfoblástica aguda de células B (BALL), leucemia linfoide aguda de células T / leucemia linfoblástica aguda de células T (TALL), leucemia linfoide aguda / leucemia linfoblástica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, entre otras, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos o afecciones hematológicas adicionales incluyendo leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmablástico, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenström, preleucemia, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas, y cualquier combinación de los mismos.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además:
un paso de ensayo de uno o más marcadores de superficie celular en células en la muestra de salida, por ejemplo CD45, CD19, CD3, CD28, CD25 o CD14; y/o
un paso de estimulación de células efectoras inmunitarias, por ejemplo mediante puesta en contacto de las células con un reactivo que une CD3 y/o CD28, por ejemplo un sustrato (como una perla) acoplado con anticuerpos CD3 y/o CD28, por ejemplo antes de la transducción.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además la recogida de cinco fracciones de la elutriación (por ejemplo una primera fracción, una segunda fracción, una tercera fracción, una cuarta fracción y una quinta fracción), opcionalmente en donde:
(i) la primera fracción se recoge utilizando una tasa de flujo de alrededor de 30-50 mL/min (por ejemplo alrededor de 30 mL/min),
la segunda fracción se recoge utilizando una tasa de flujo de alrededor de 0-50 mL/min (por ejemplo alrededor de 30 mL/min),
la tercera fracción se recoge utilizando una tasa de flujo de alrededor de 50-80 mL/min (por ejemplo alrededor de 70 mL/min),
la cuarta fracción se recoge utilizando una tasa de flujo de alrededor de 50-80 mL/min (por ejemplo alrededor de 72 mL/min), y/o
la quinta fracción se recoge utilizando una tasa de flujo de alrededor de 80-150 mL/min (por ejemplo alrededor de 82 mL/min);
(ii) la primera, tercera o cuarta fracción se recoge utilizando una centrifugación a alrededor de 1800-2400 rpm (por ejemplo alrededor de 2400 rpm) y/o
la cuarta fracción se recoge utilizando una centrifugación de alrededor de 0-2400 rpm (por ejemplo alrededor de 2400 rpm); y/o
(iii) la segunda fracción se recoge utilizando un volumen de recogida de alrededor de 900 mL,
la segunda fracción se recoge utilizando un volumen de recogida de alrededor de 500 mL,
la tercera fracción se recoge utilizando un volumen de recogida de alrededor de 975 mL,

la cuarta fracción se recoge utilizando un volumen de recogida de alrededor de 400 mL y/o
la segunda fracción se recoge utilizando un volumen de recogida de alrededor de 250 mL.

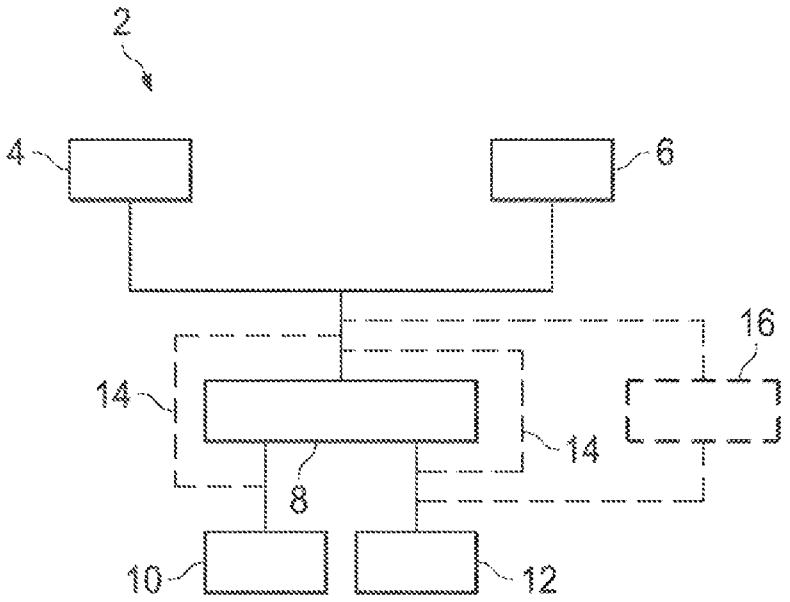


FIG. 1A

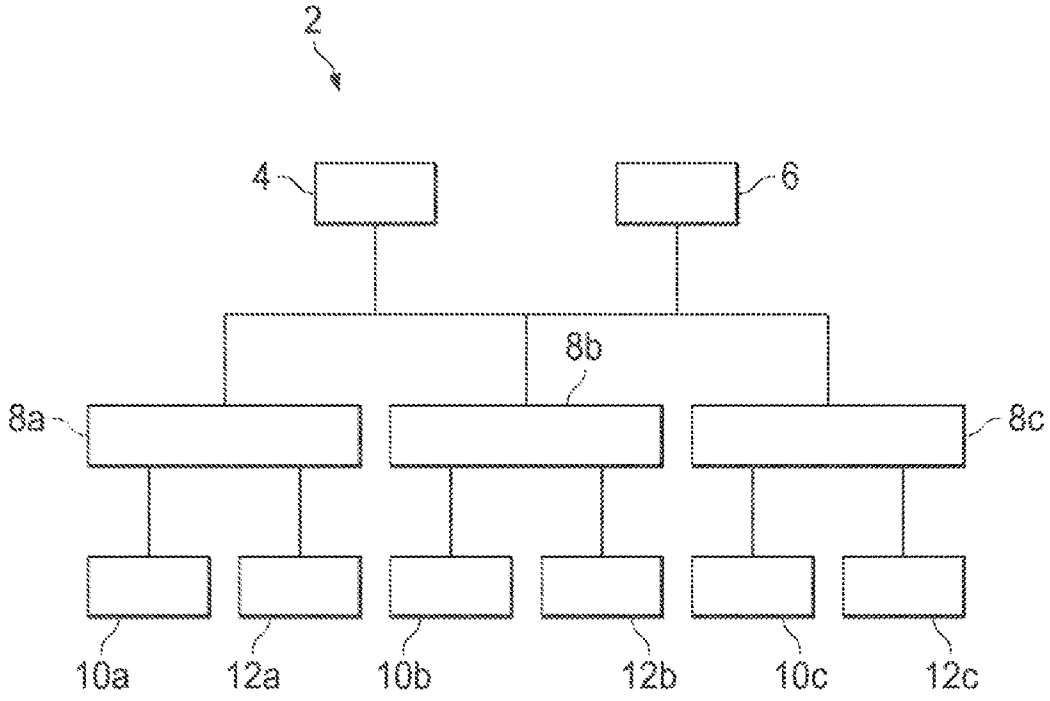


FIG. 1B

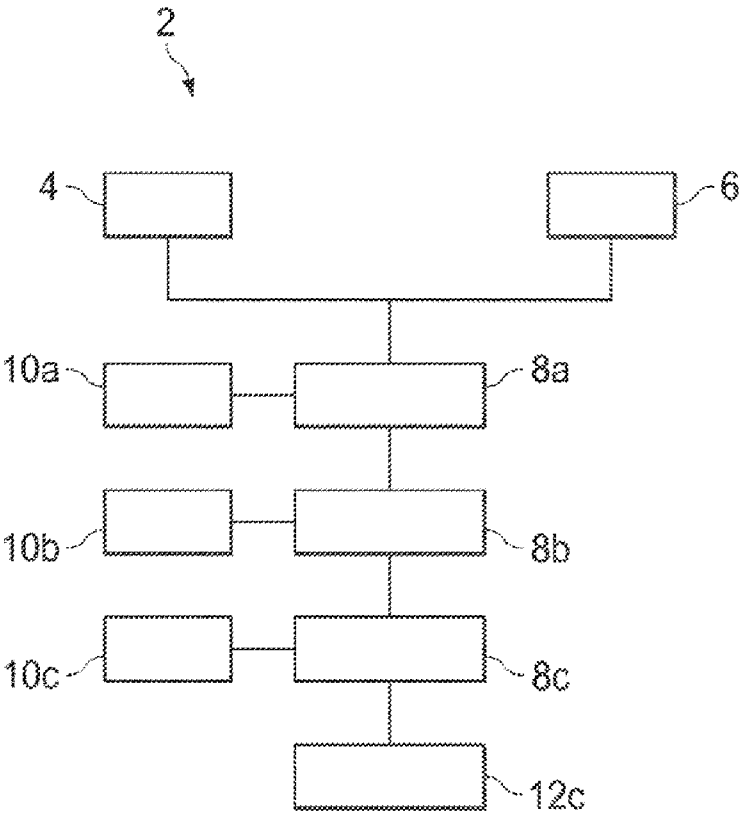


FIG. 1C

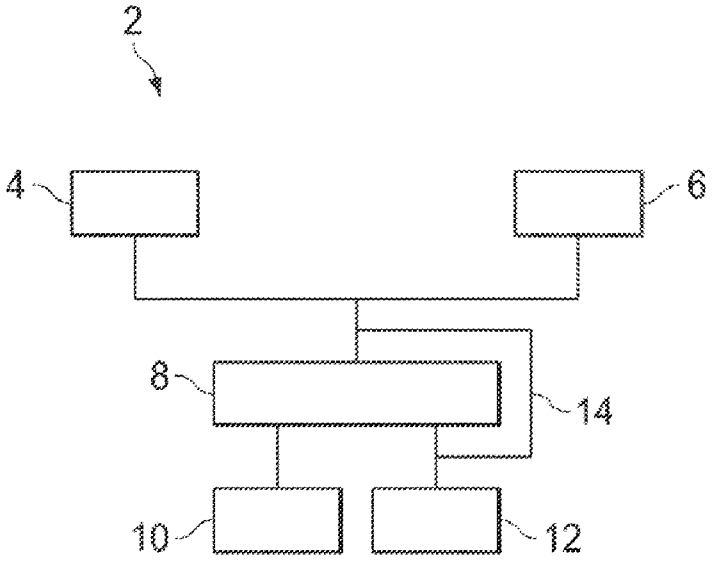


FIG. 1D

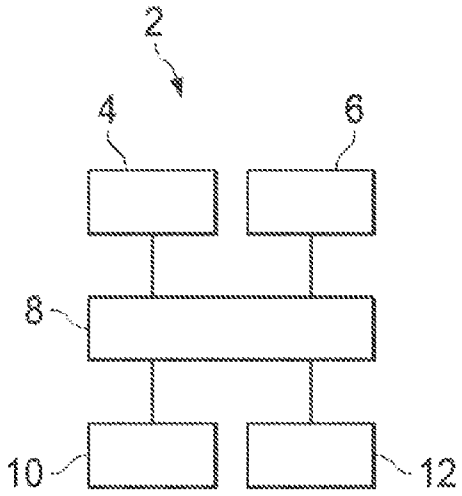


FIG. 1E

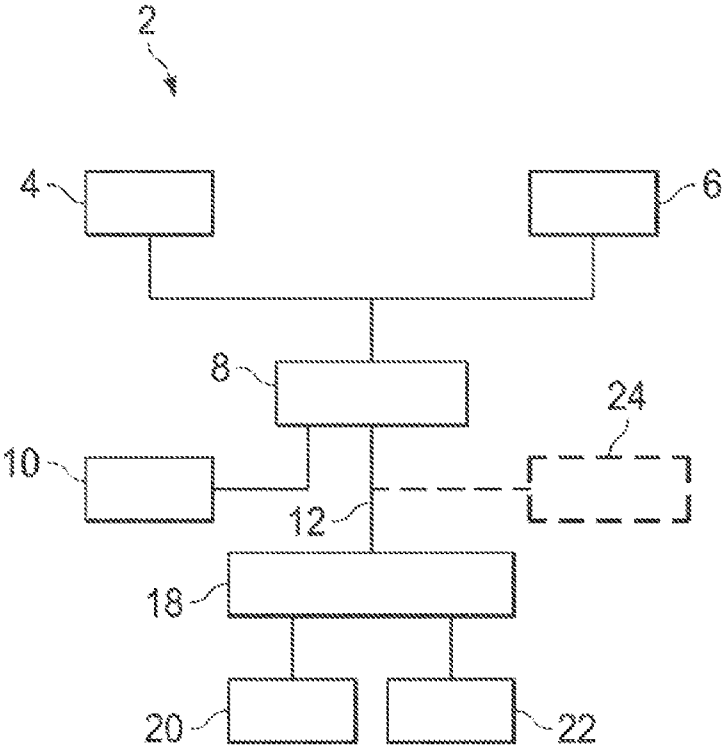


FIG. 1F

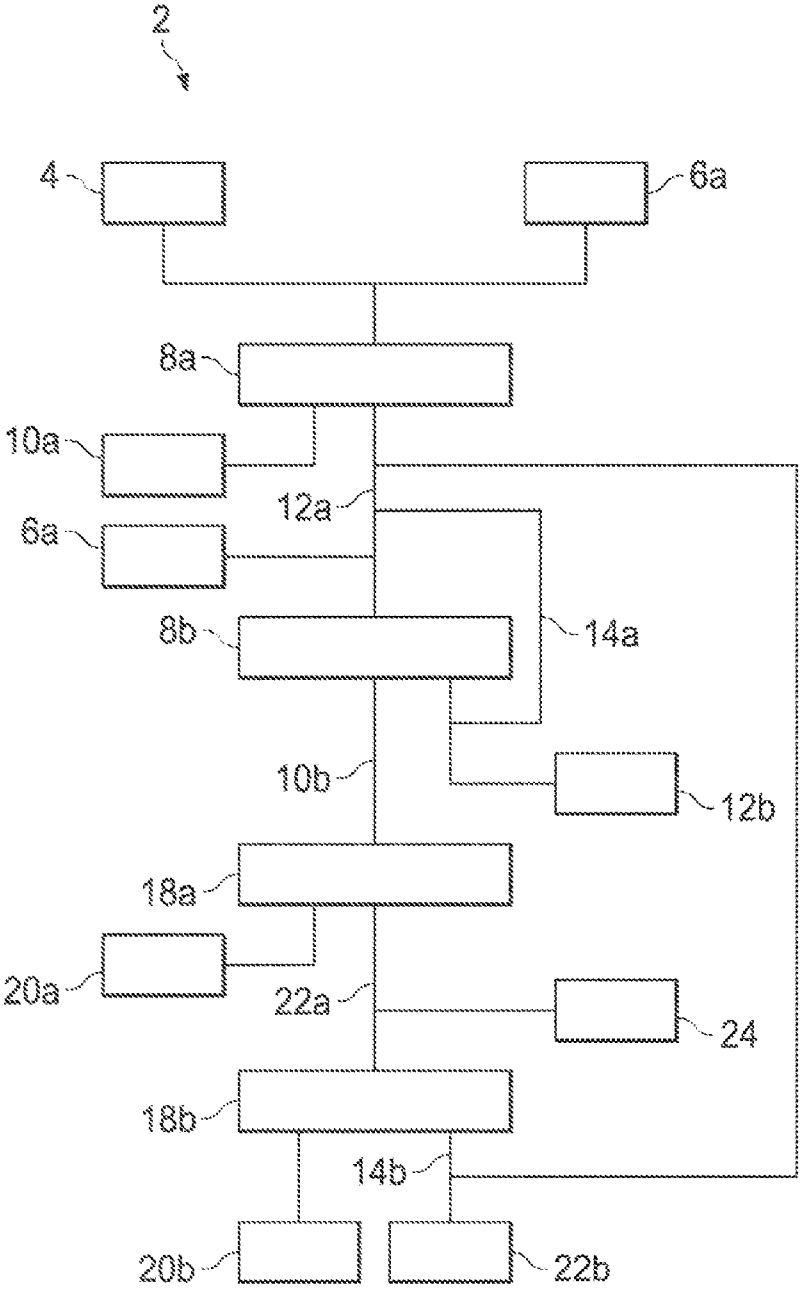


FIG. 1G

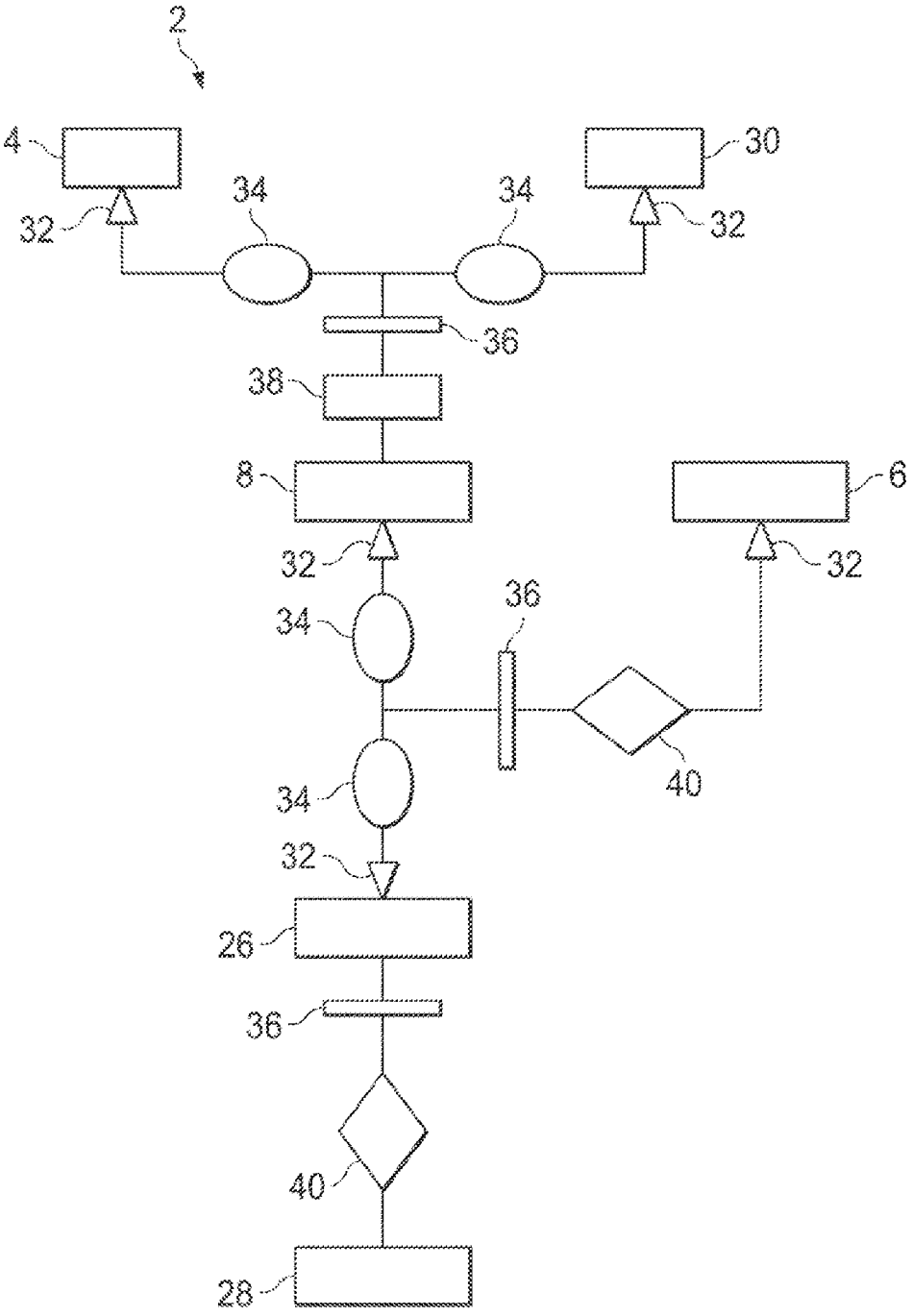


FIG. 1H

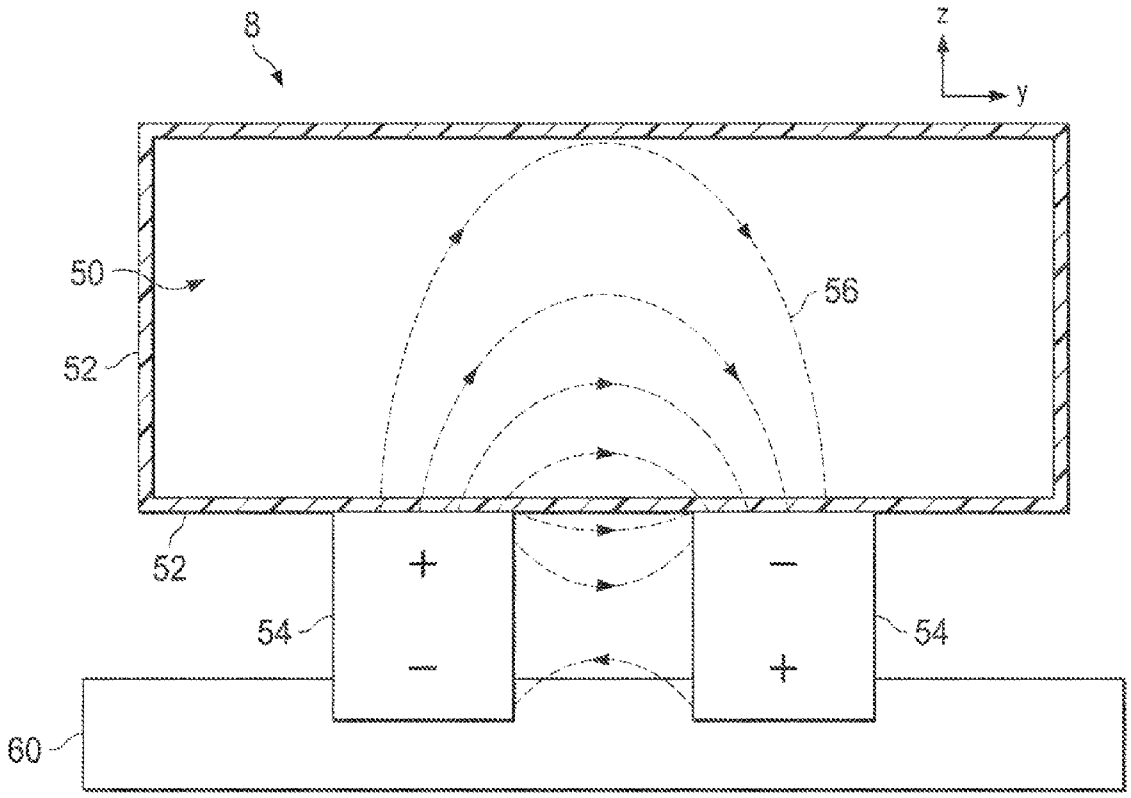


FIG. 2A

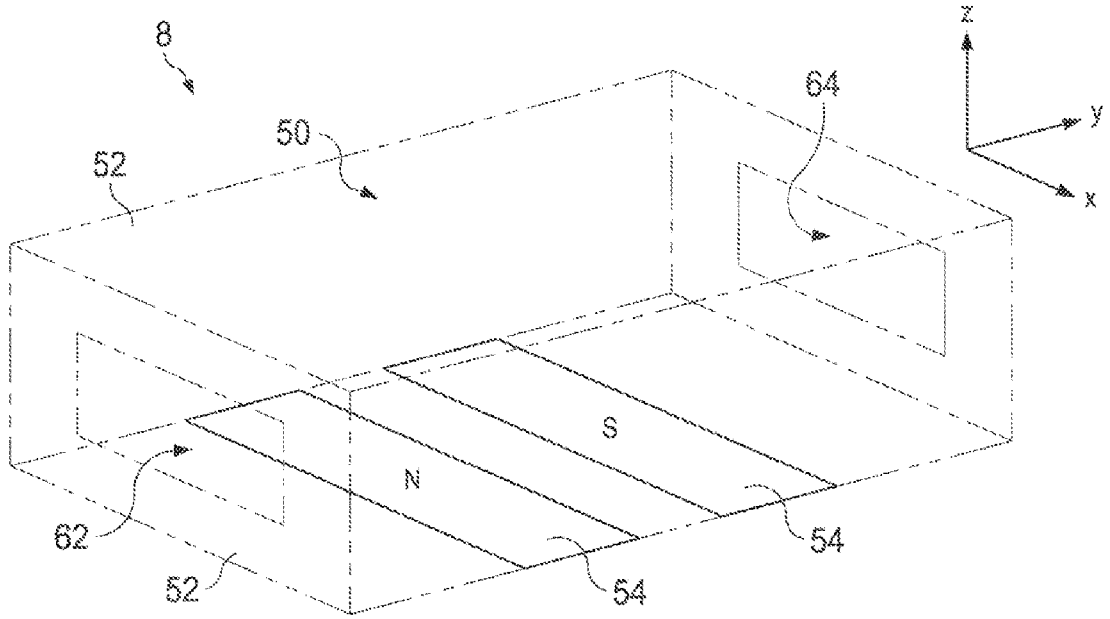


FIG. 2B

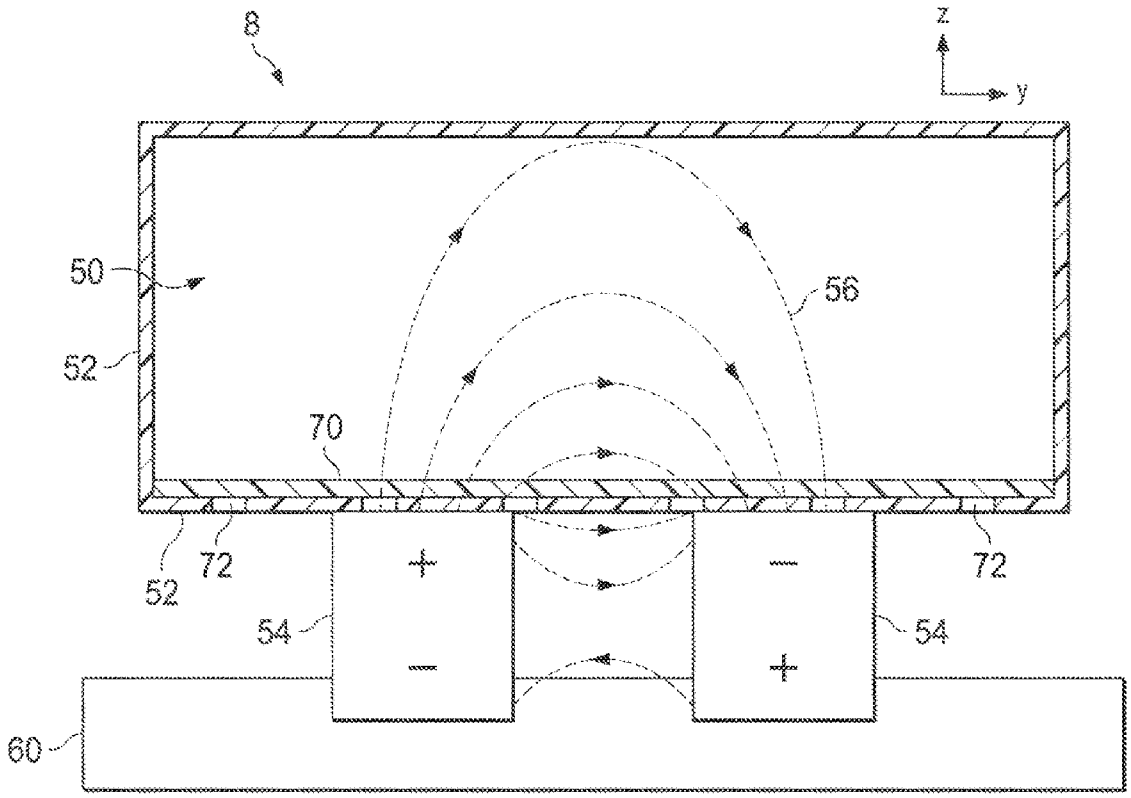


FIG. 3

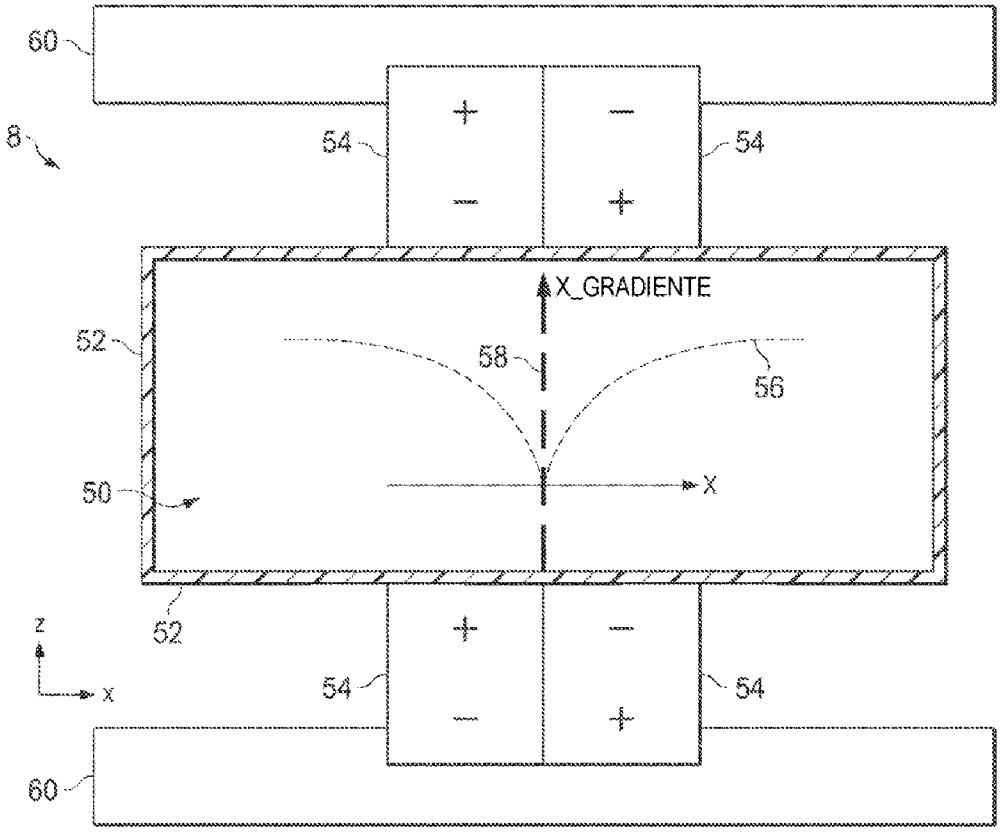

60
8
54
54
+
−
−
+
X_GRADIENTE
52
58
56
50
X
52
z
x
54
54
+
−
−
+
60

FIG. 4A

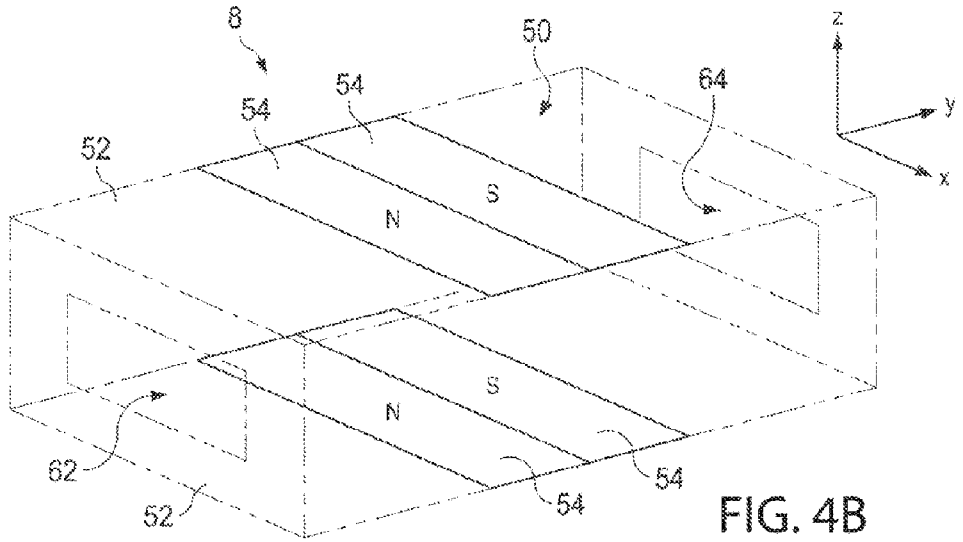

8
50
z
y
x
54
54
64
52
S
N
S
N
62
52
54
54

FIG. 4B

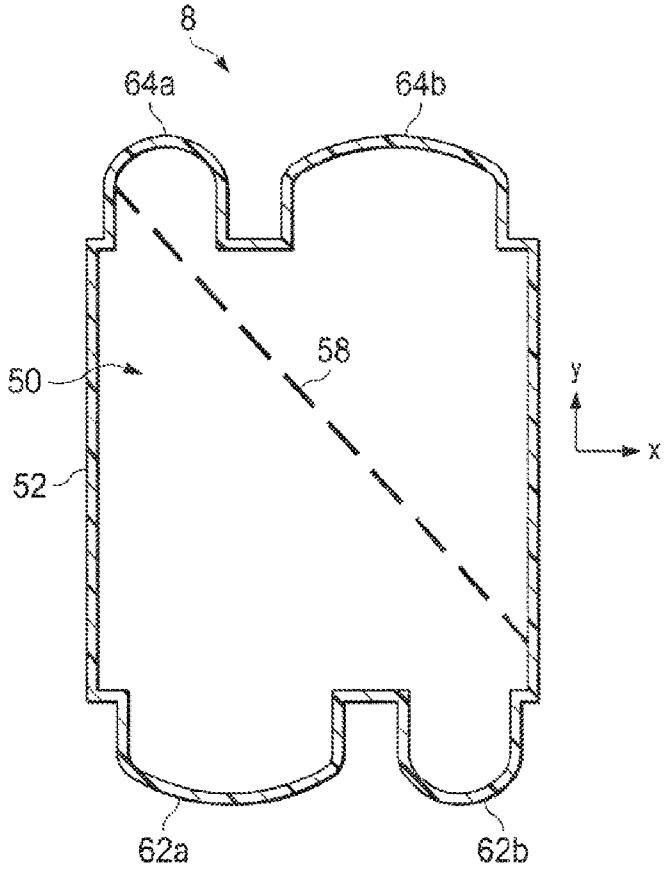


FIG. 4C

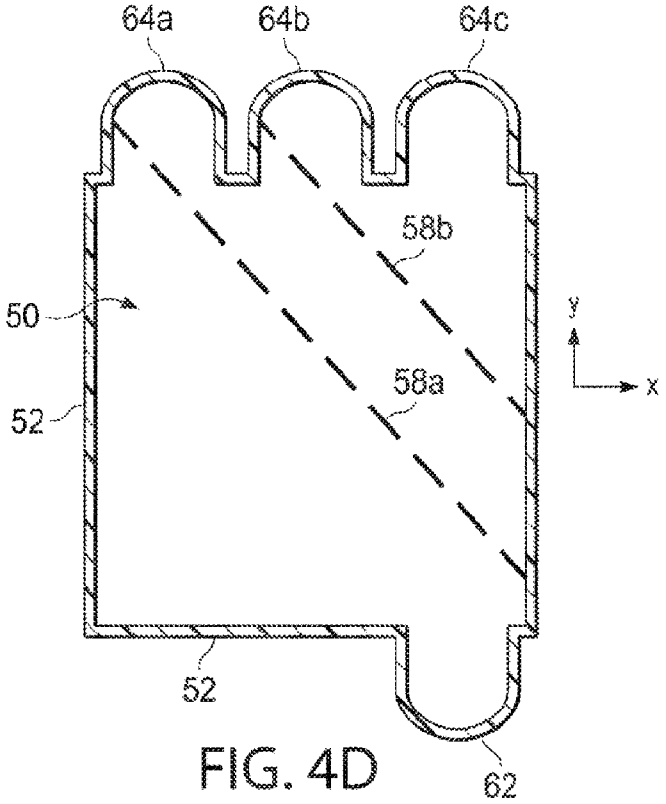


FIG. 4D

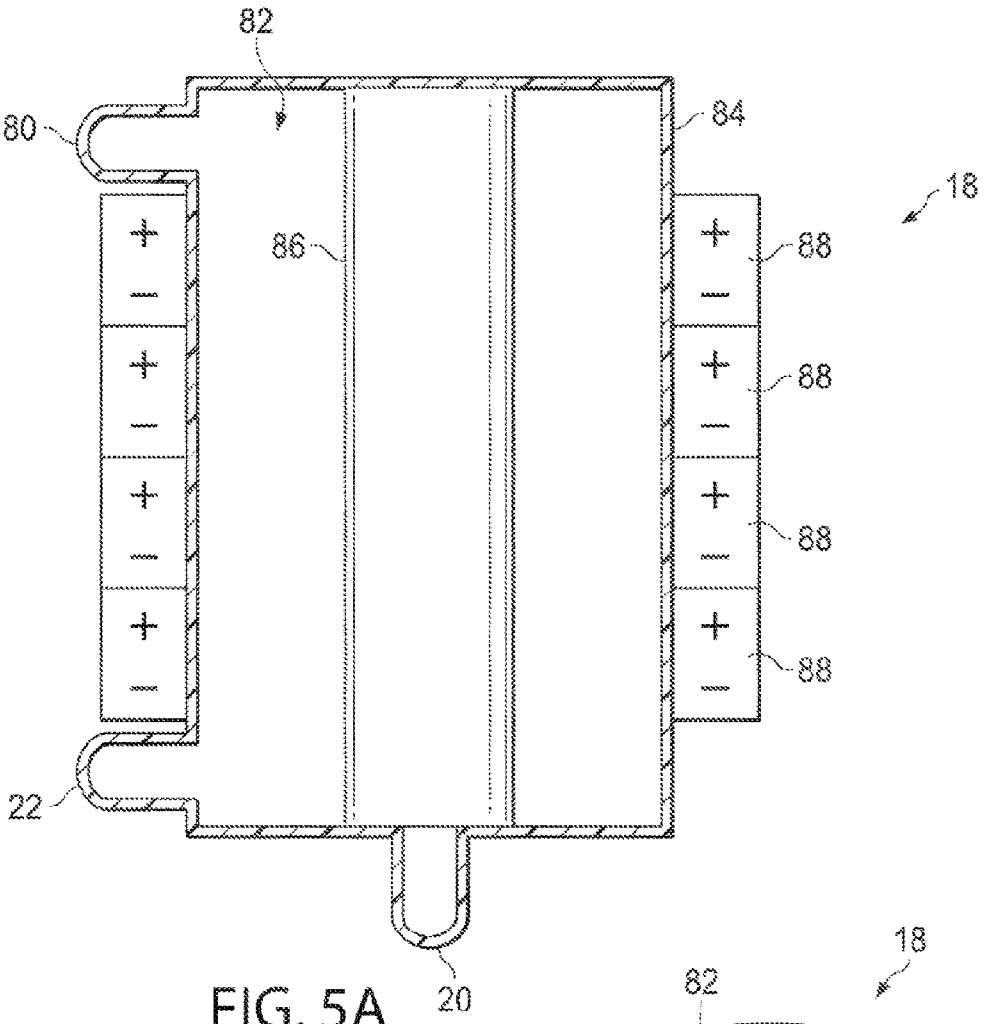


FIG. 5A

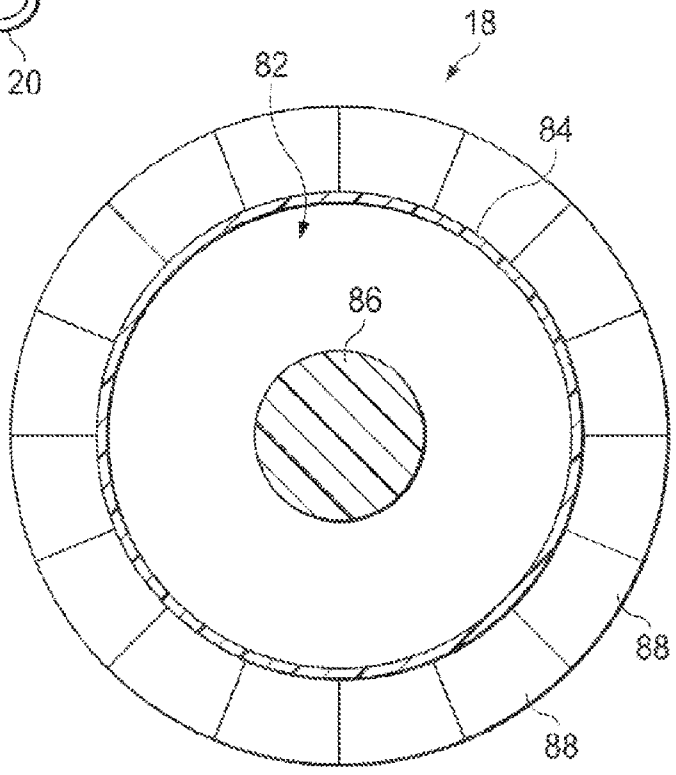


FIG. 5B

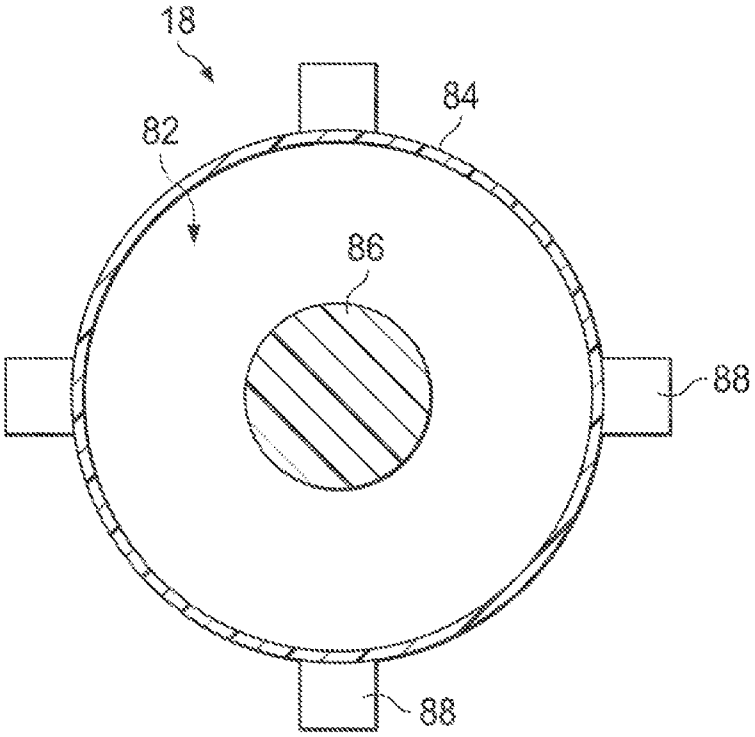


FIG. 5C

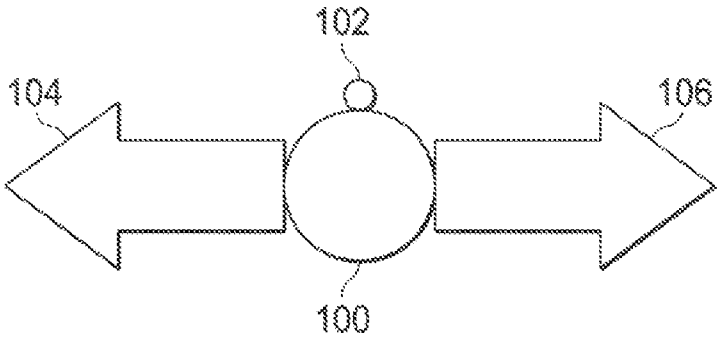


FIG. 6

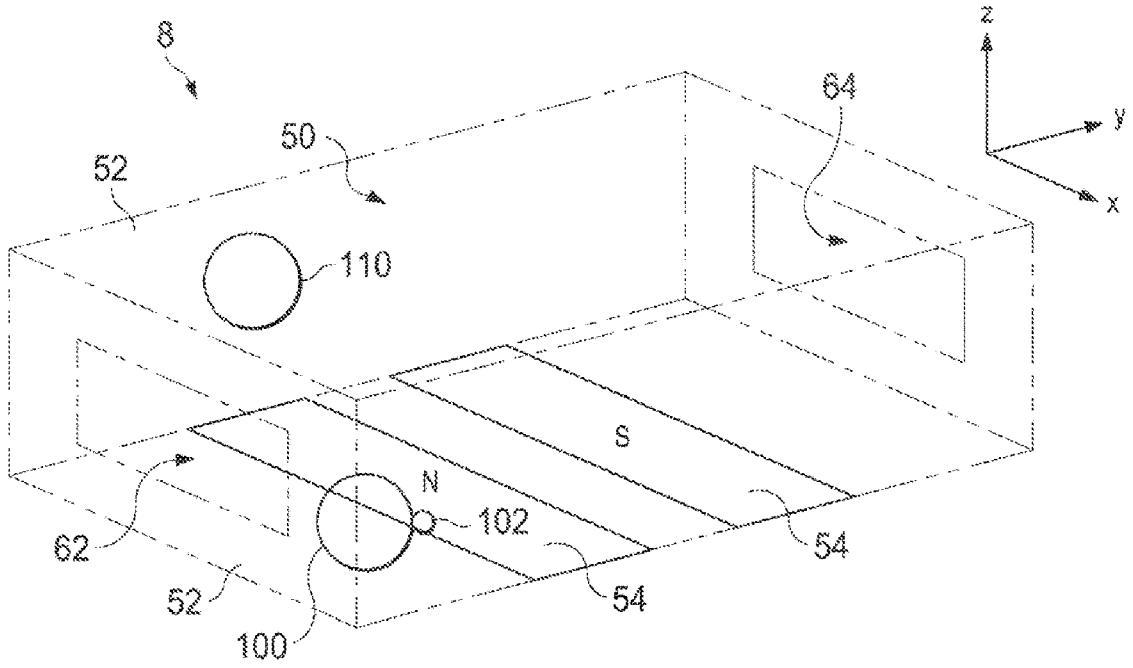

8
50
52
64
110
z
y
x
S
N
102
62
52
54
54
100

FIG. 7A

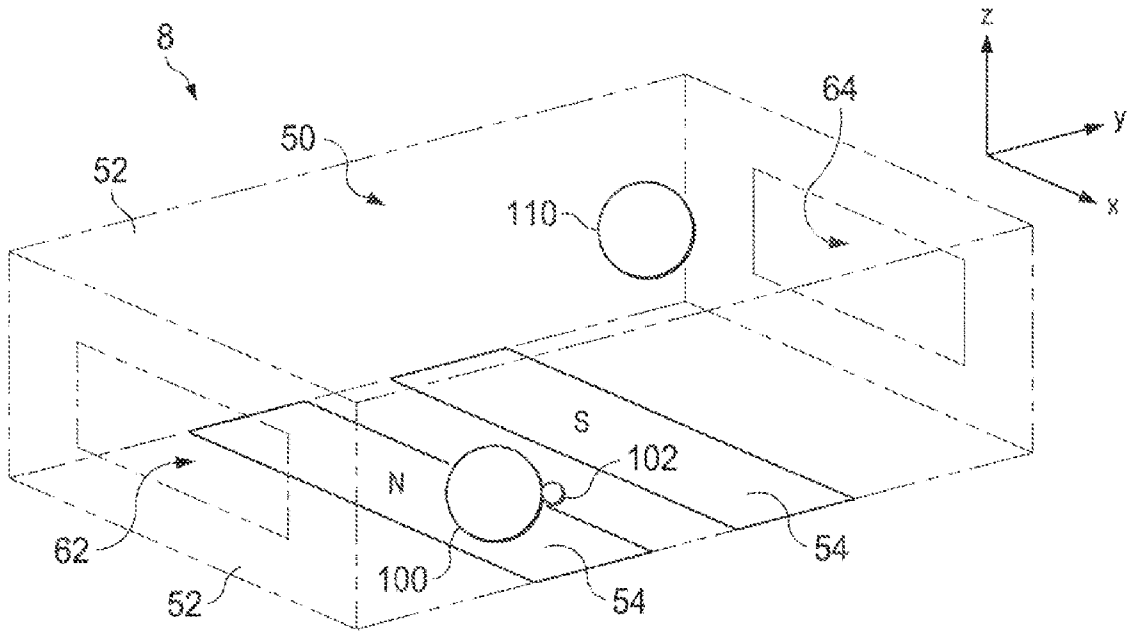

8
50
52
64
110
z
y
x
S
N
102
62
52
54
54
100

FIG. 7B

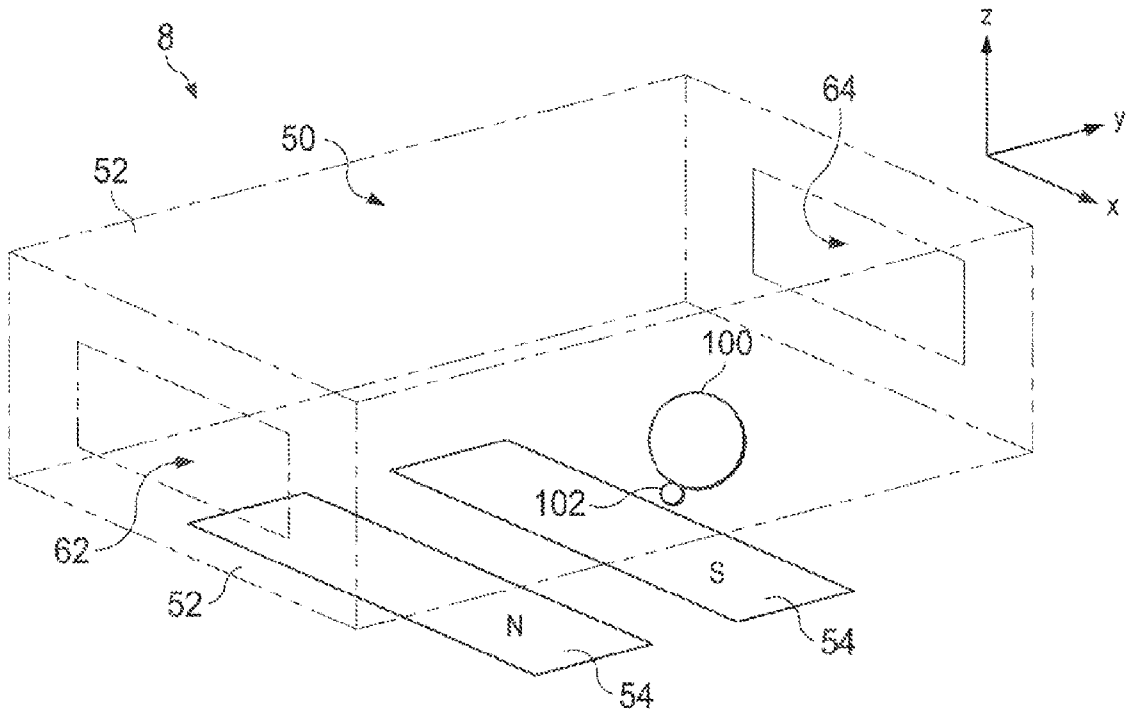

8
50
52
64
z
y
x
100
102
62
52
S
N
54
54

FIG. 7C

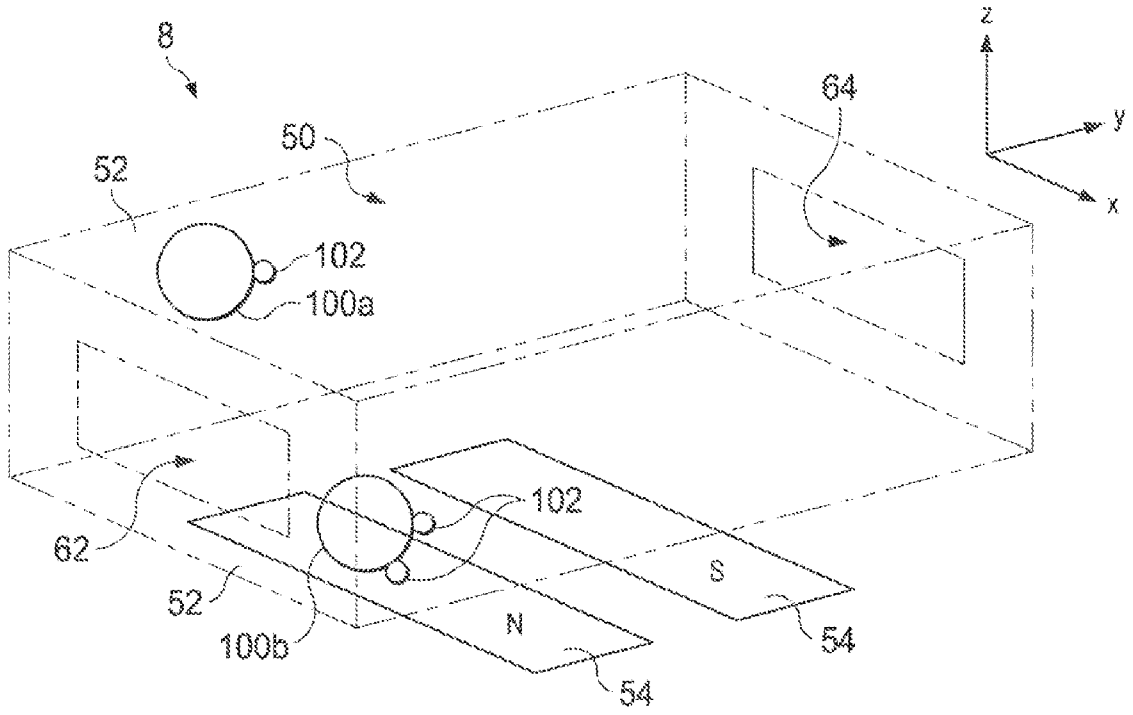

8
50
52
64
z
y
x
102
100a
62
52
100b
102
S
N
54
54

FIG. 8A

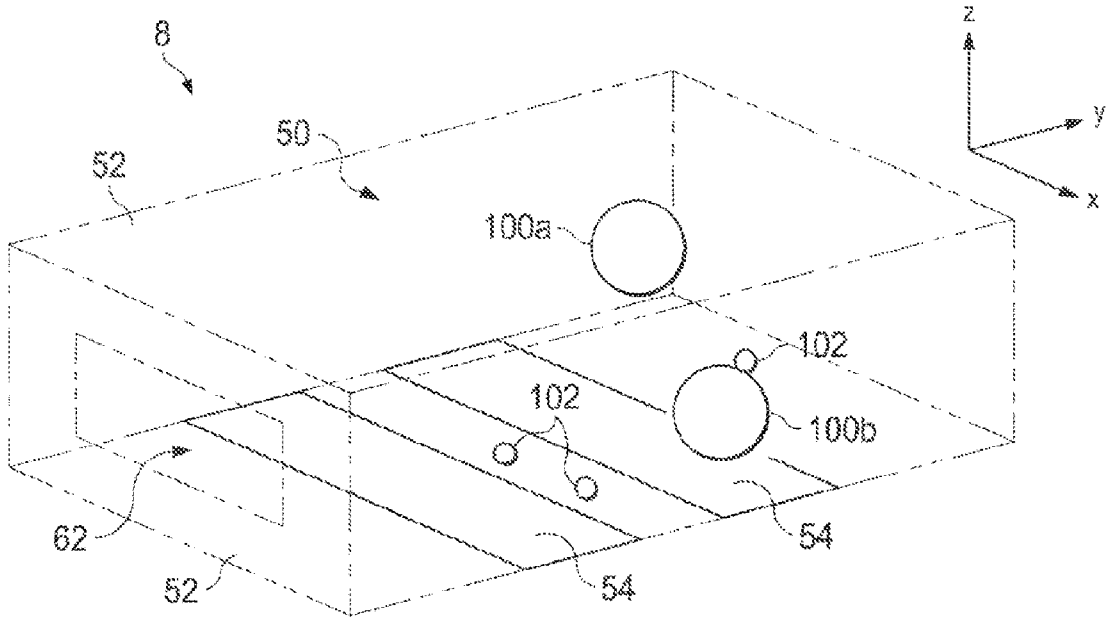

8
50
52
100a
102
102
100b
62
52
54
54
z
y
x

FIG. 8B

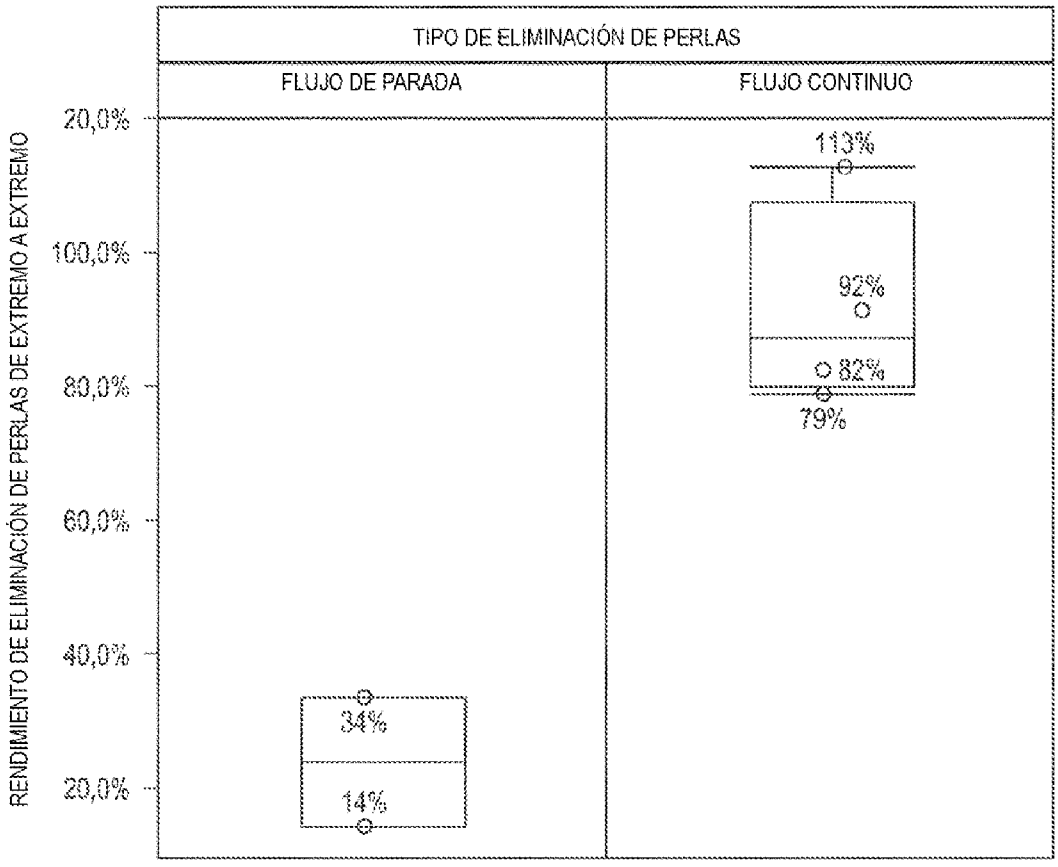

TIPO DE ELIMINACIÓN DE PERLAS
FLUJO DE PARADA
FLUJO CONTINUO
RENDIMIENTO DE ELIMINACIÓN DE PERLAS DE EXTREMO A EXTREMO
120,0%
100,0%
80,0%
60,0%
40,0%
20,0%
34%
14%
113%
92%
82%
79%

FIG. 9

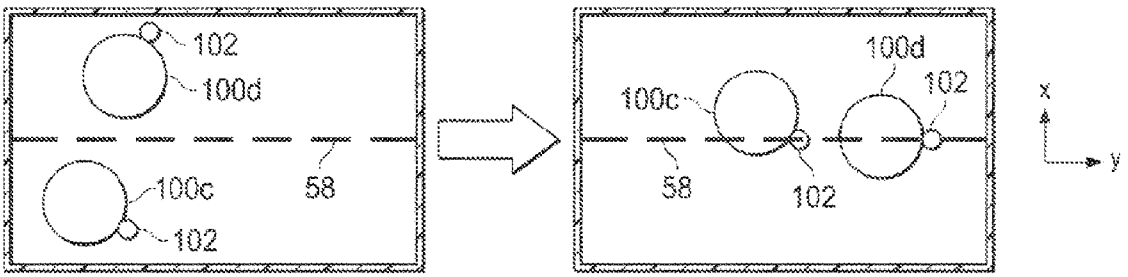


FIG. 10A

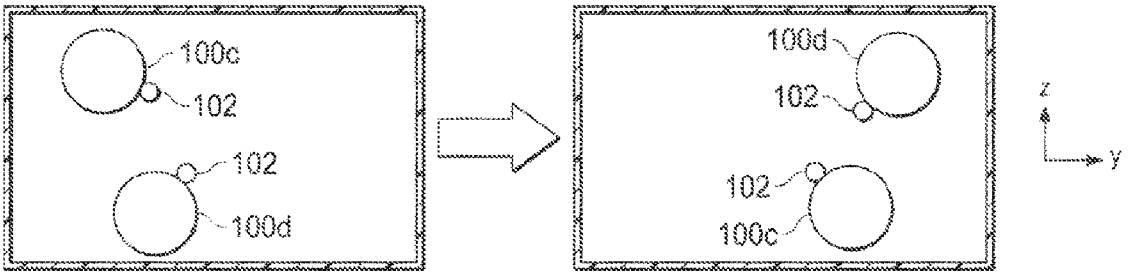


FIG. 10B

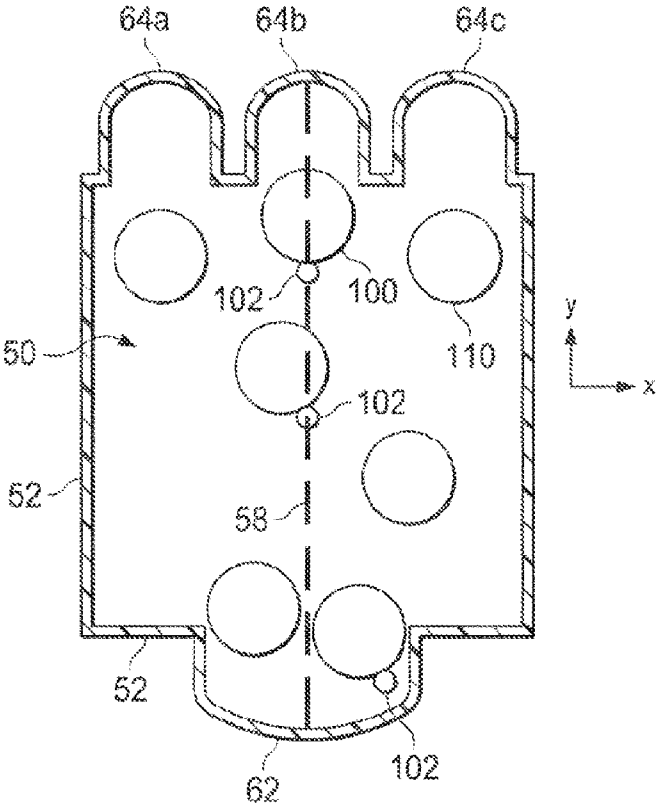

64a
64b
64c
102
100
110
50
102
52
58
52
102
62
y
x

FIG. 11

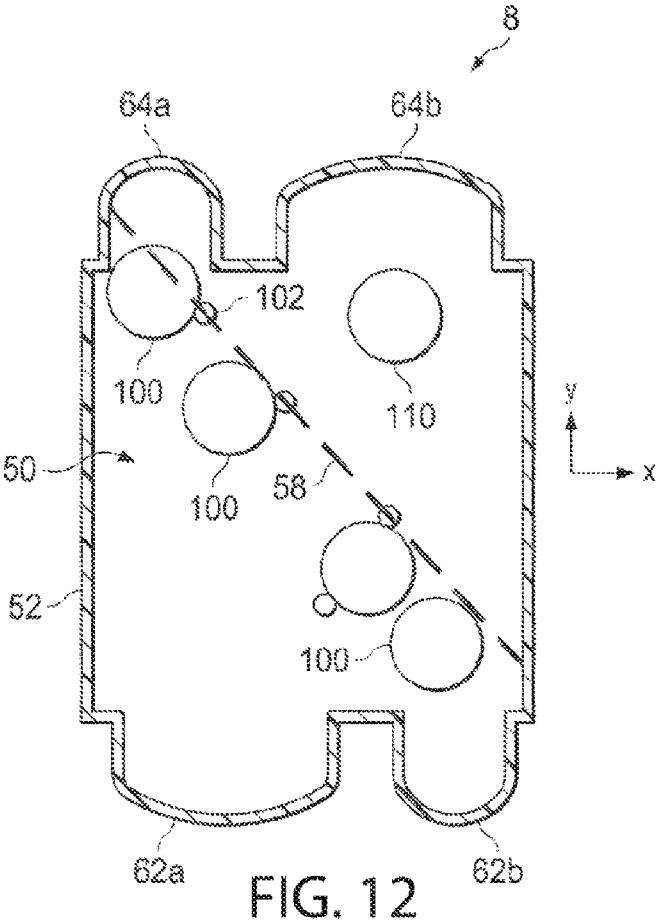

8
64a
64b
102
100
110
50
100
58
52
100
62a
62b
y
x

FIG. 12

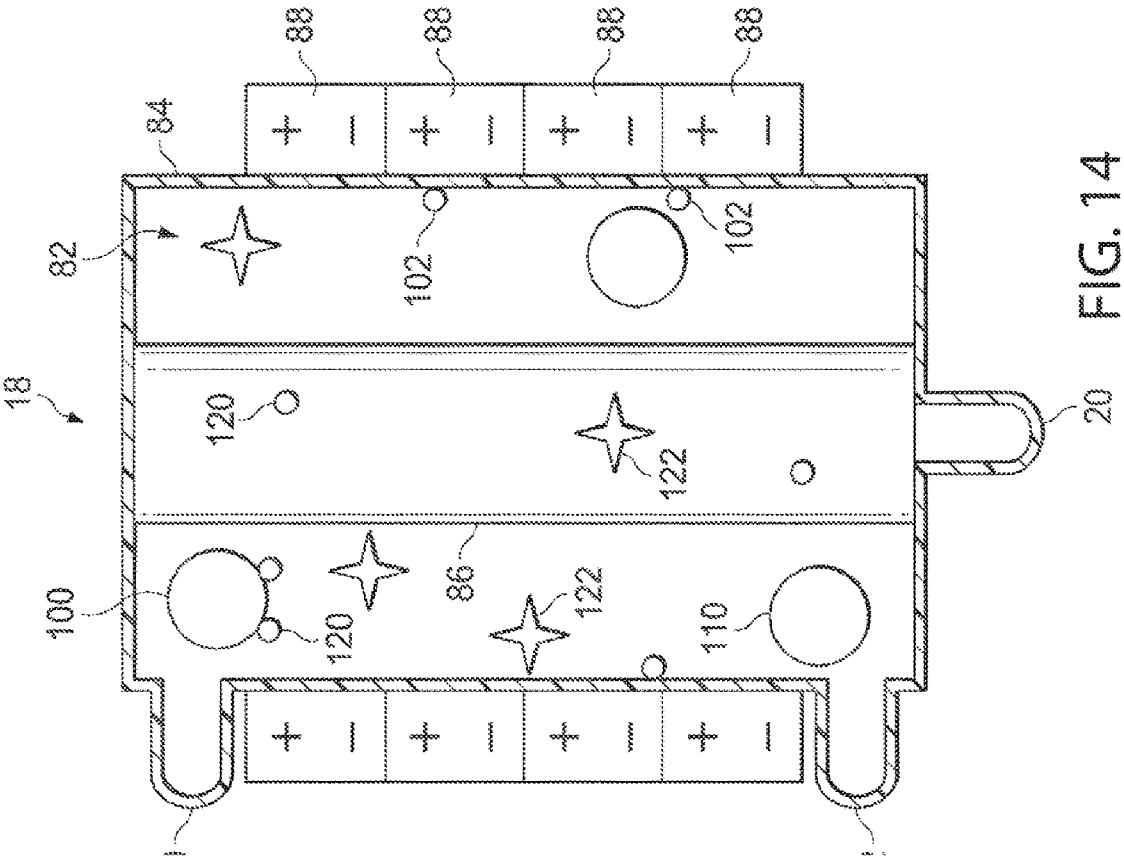

88
88
88
88
84
82
102
102
18
120
122
20
100
120
86
122
110

FIG. 14

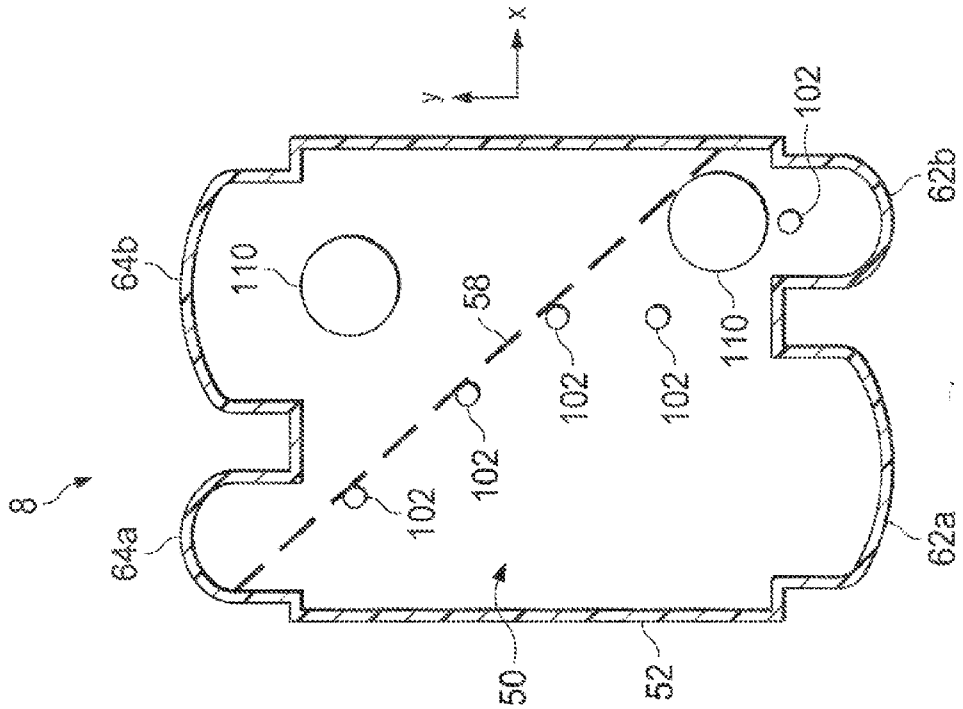

x
y
102
62b
64b
110
58
102
102
110
102
102
8
64a
62a
50
52

FIG. 13

- Se resuspenden células en MM después de SmartWash
- Se observa aglomeración después de 2 h de incubación

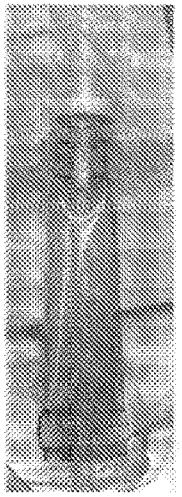
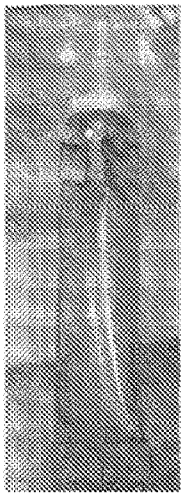
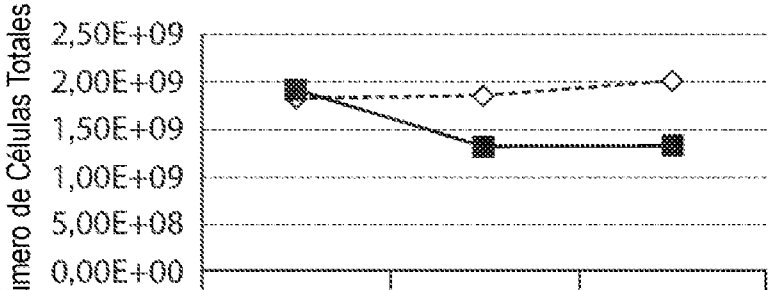


FIG. 15A



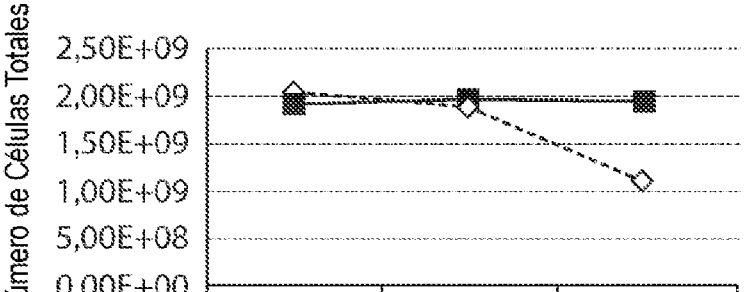
- Se resuspenden células en D5 después de SmartWash
- No se observa aglomeración después de 2 h de incubación

FIG. 15B



	Prelavado	Post Lavado	Después de 2 horas de incubación
SEPAX Smart Wash	1,85E+09	1,85E+09	2,00E+09
Lavado CS5	1,91E+09	1,31E+09	1,32E+09

FIG. 16A



	Prelavado	Post Lavado	Después de 2 horas de incubación
Medio Modificado	2,04E+09	1,88E+09	1,10E+09
5% D + 0.45% NACl	1,92E+09	1,96E+09	1,94E+09

FIG. 16B

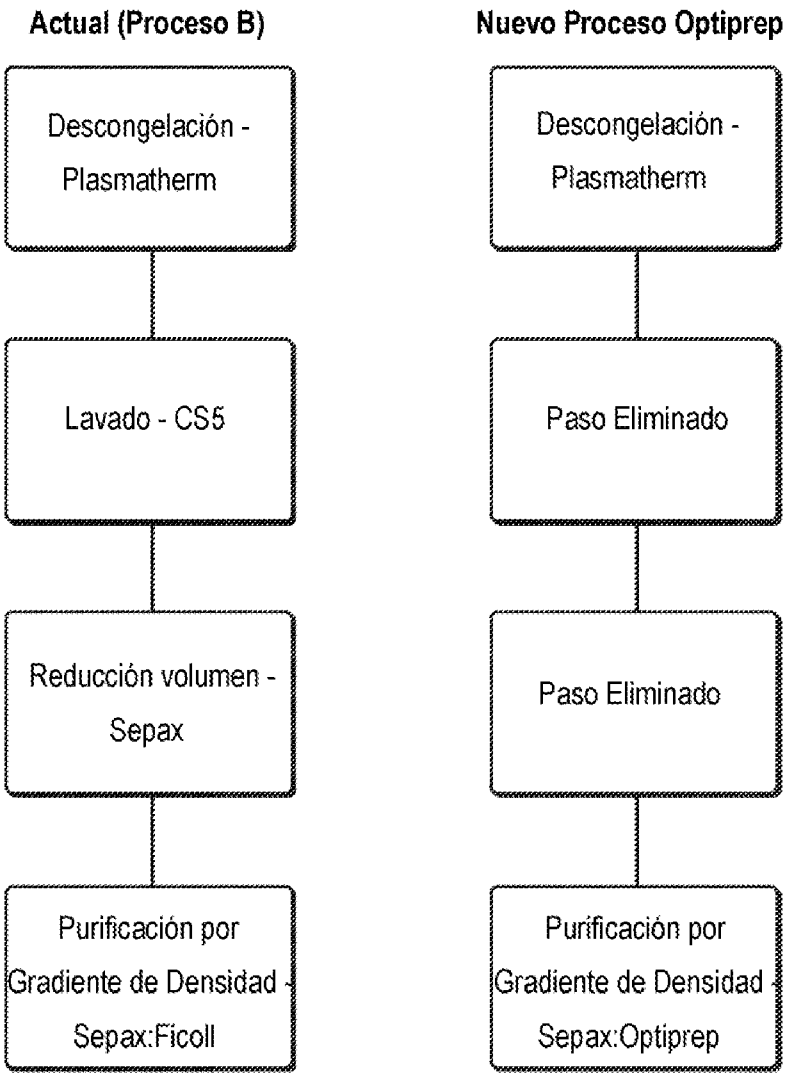

Actual (Proceso B)
Descongelación - Plasmatherm
Lavado - CS5
Reducción volumen - Sepax
Purificación por Gradiente de Densidad Sepax:Ficoll
Nuevo Proceso Optiprep
Descongelación - Plasmatherm
Paso Eliminado
Paso Eliminado
Purificación por Gradiente de Densidad Sepax:Optiprep

FIG. 17

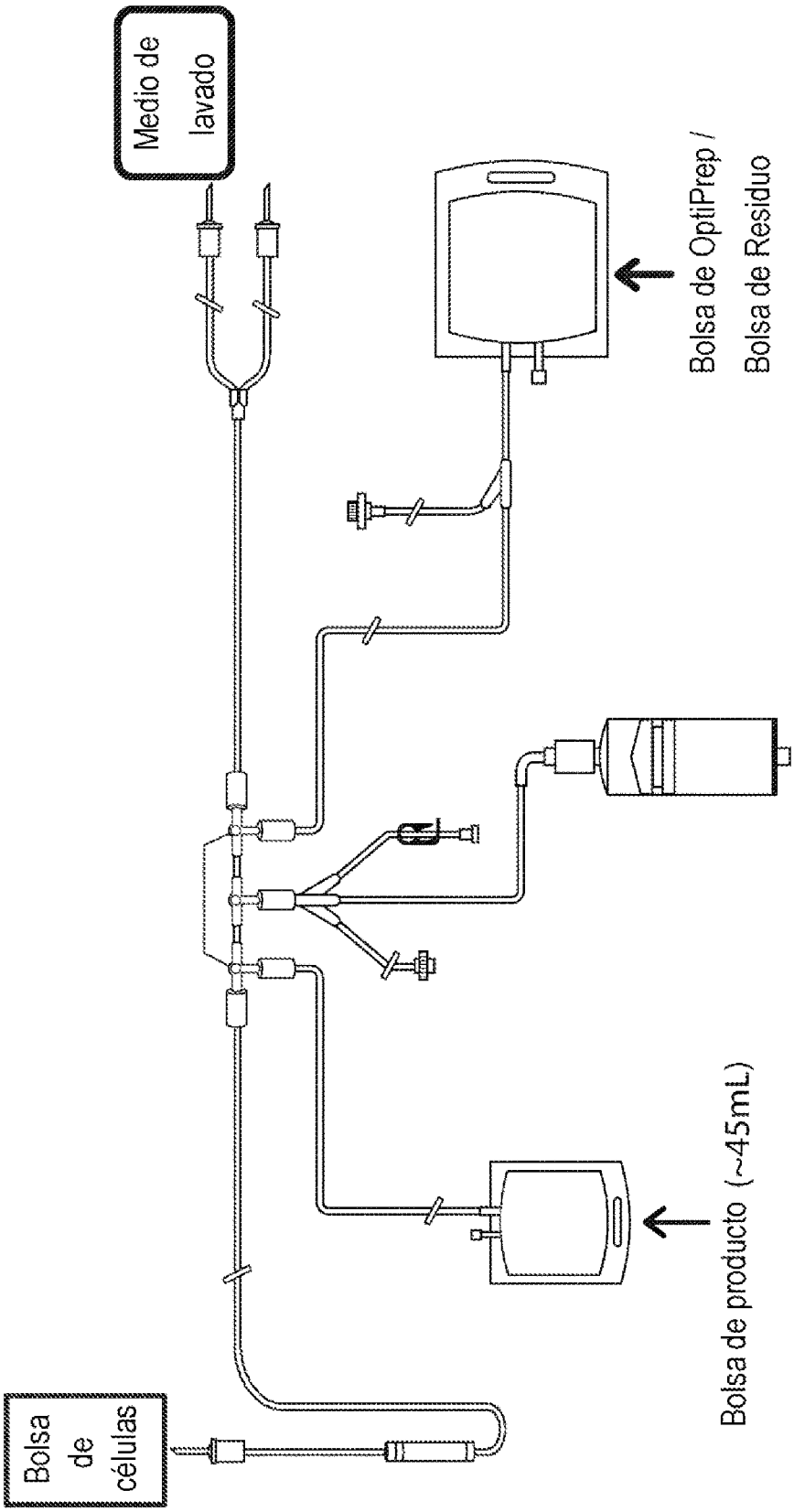

Medio de lavado
Bolsa de OptiPrep / Bolsa de Residuo
Bolsa de producto (~45mL)
Bolsa de células

FIG. 18

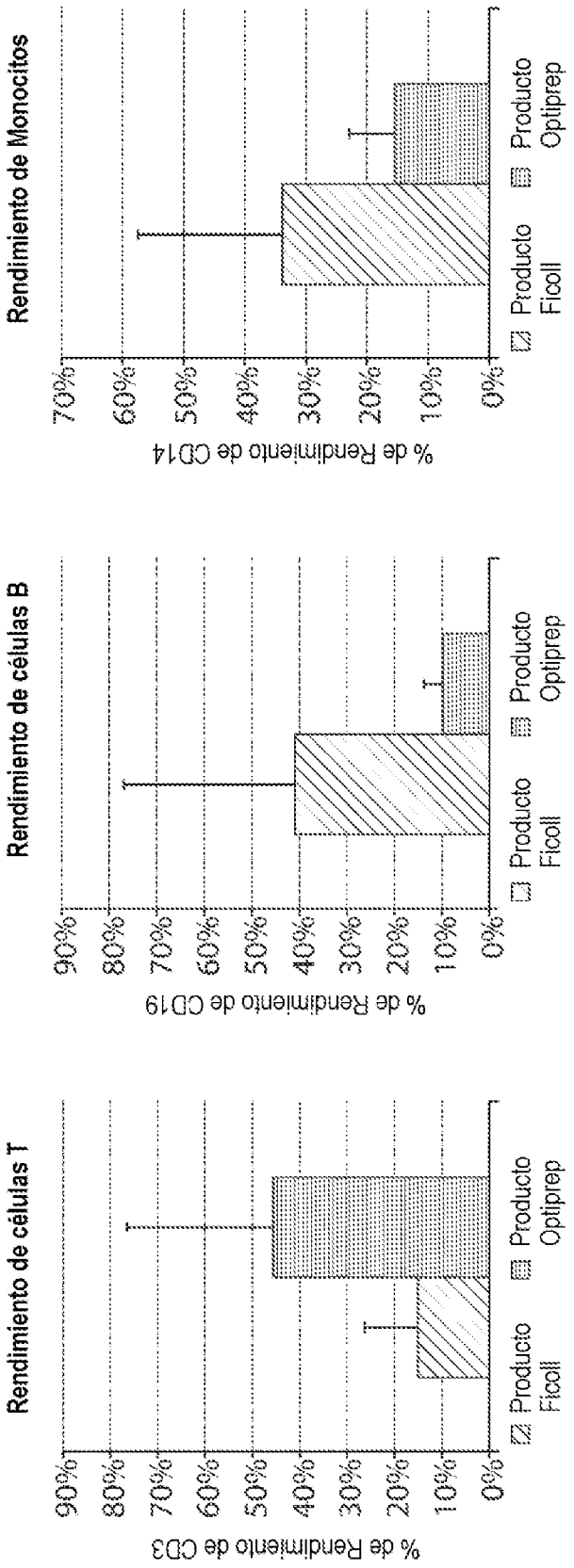


FIG. 19A

FIG. 19B

FIG. 19C

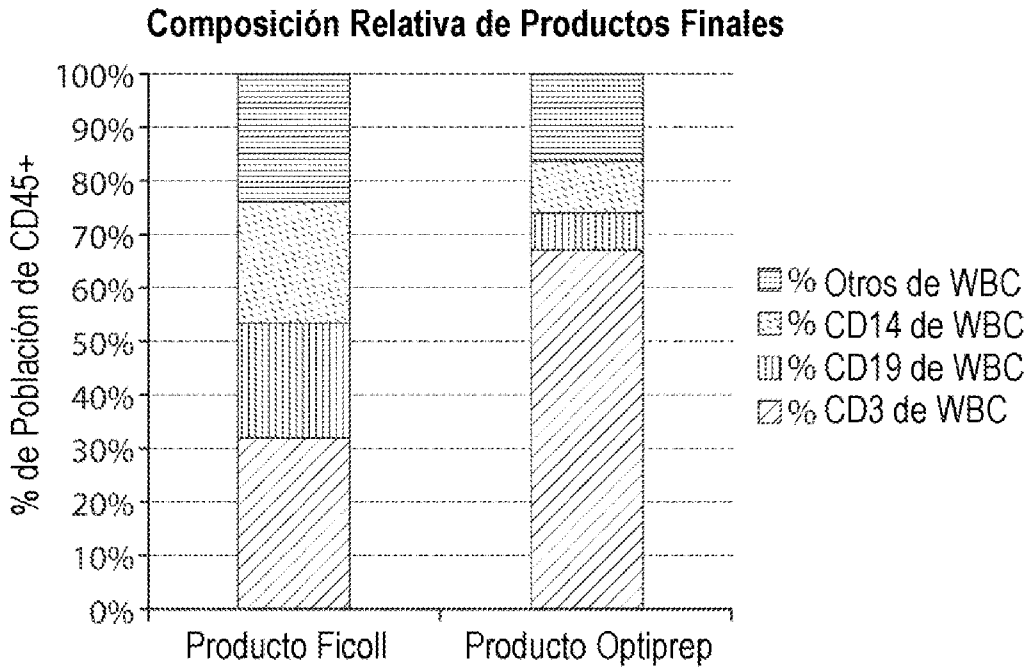


FIG. 19D

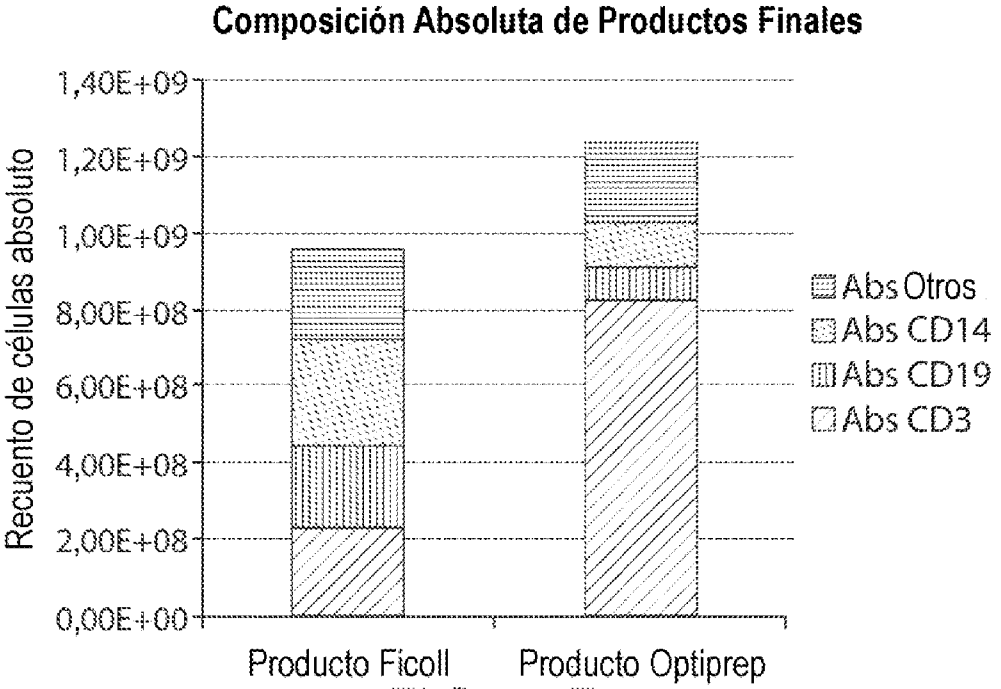


FIG. 19E

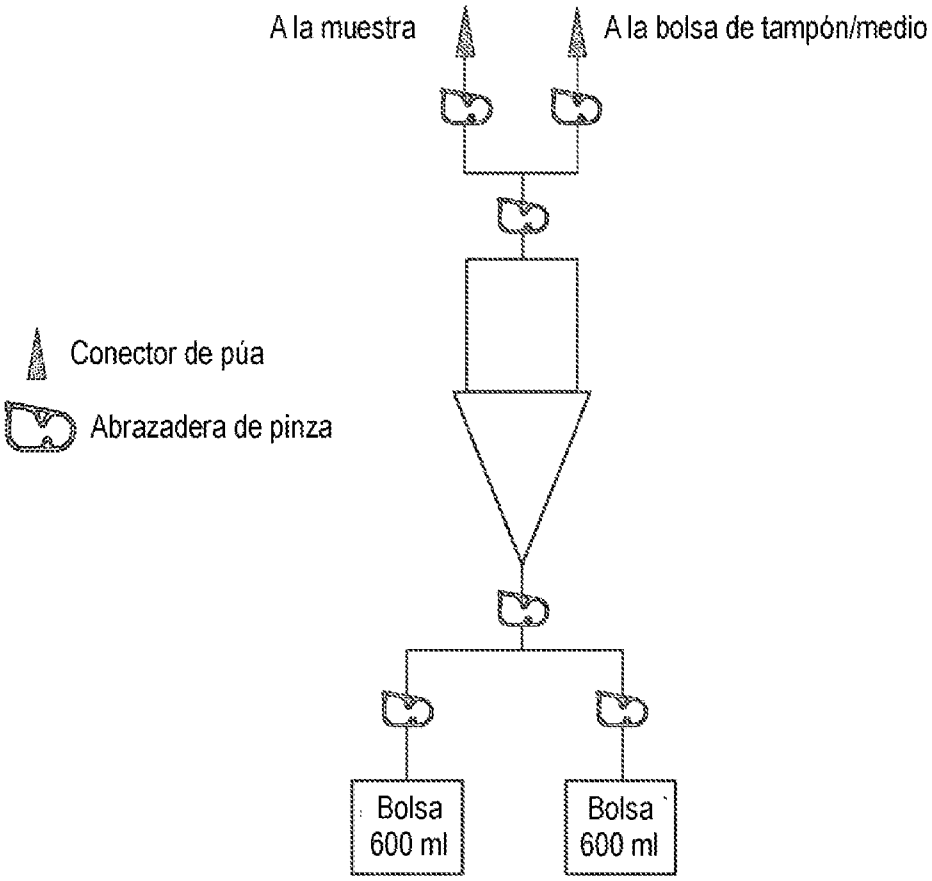

A la muestra
A la bolsa de tampón/medio
Conector de púa
Abrazadera de pinza
Bolsa 600 ml
Bolsa 600 ml
No a escala

FIG. 20

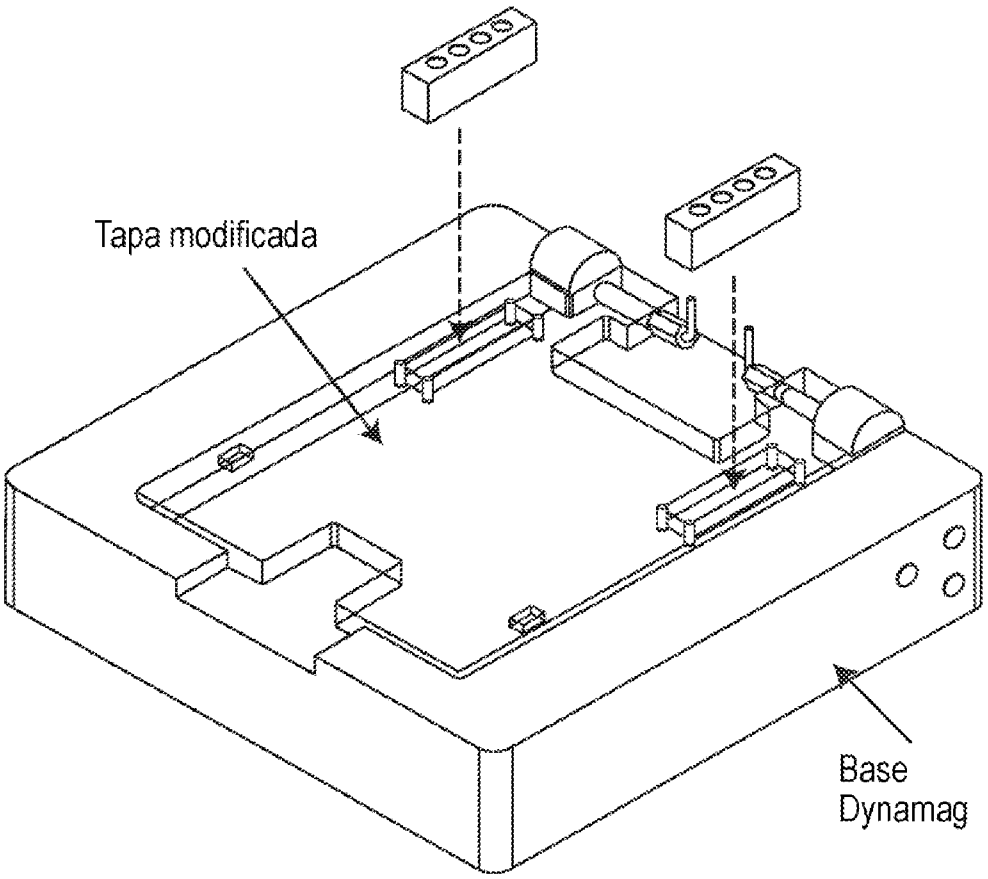


FIG. 21

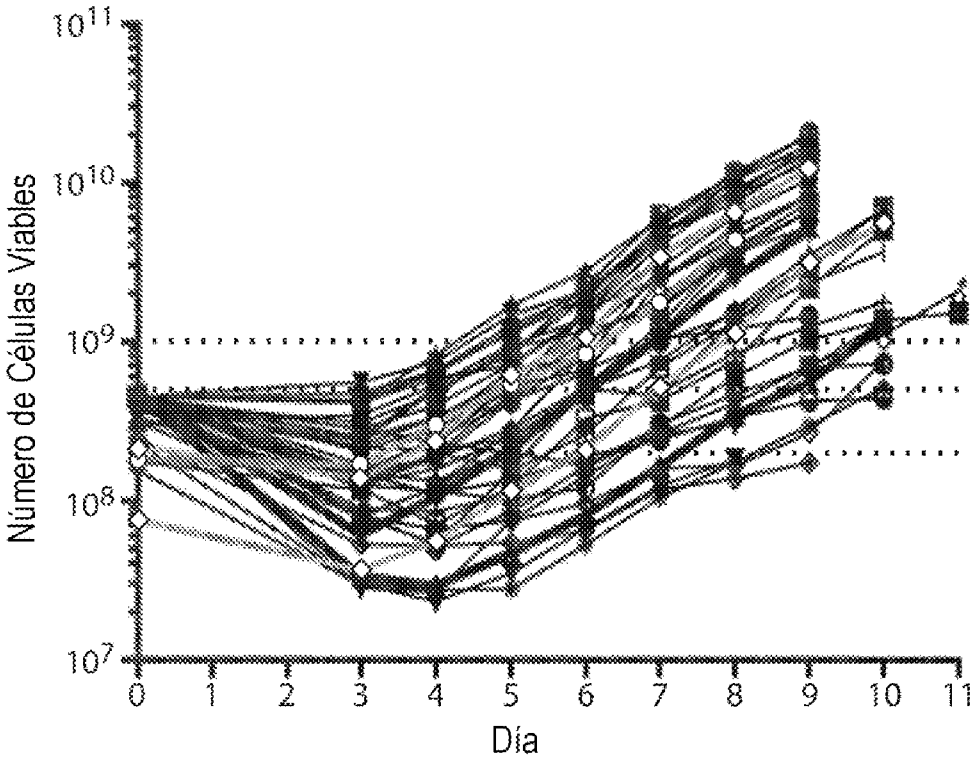
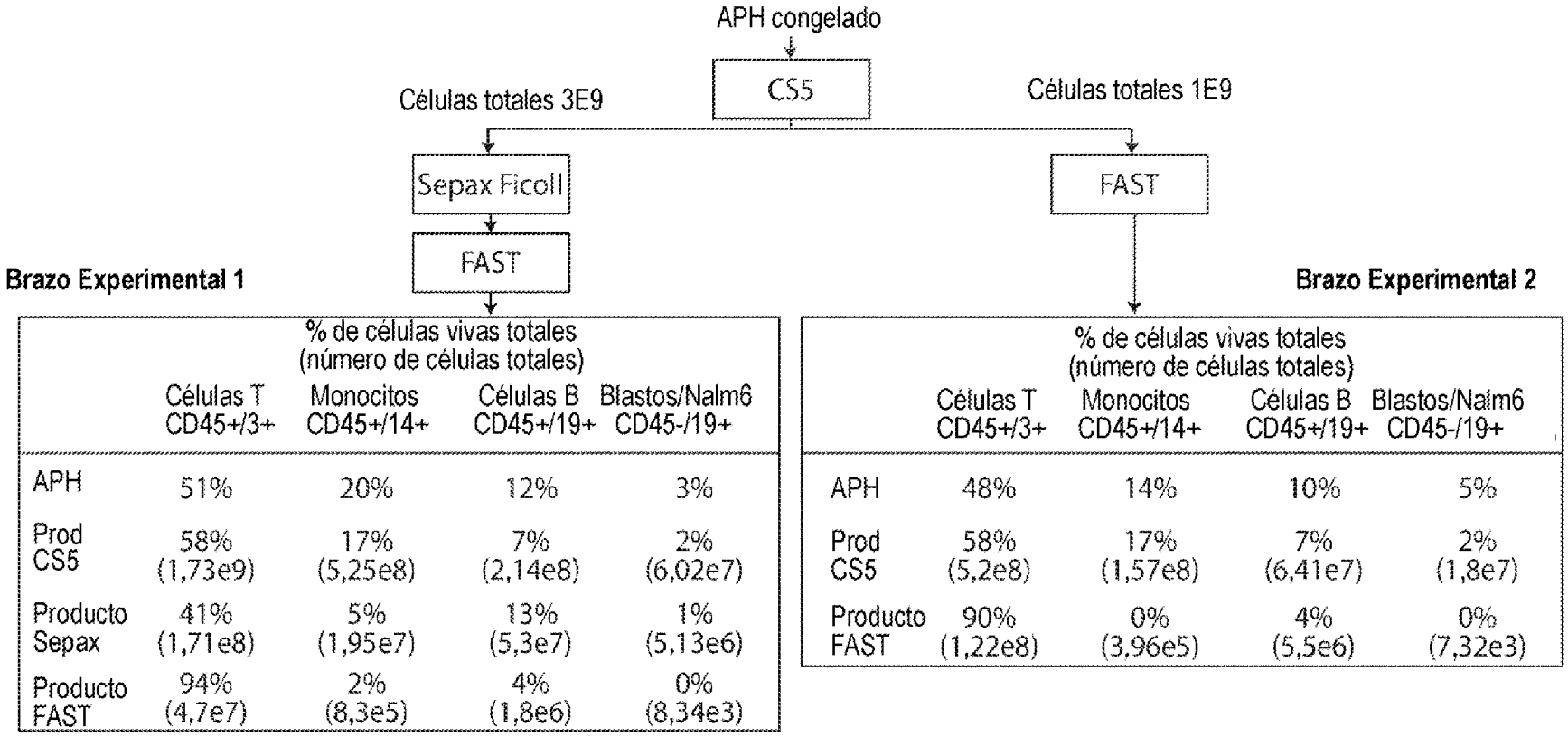

Número de Células Viables
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Día

FIG. 22



	% de células vivas totales (número de células totales)			
	Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
APH	51%	20%	12%	3%
Prod CS5	58% (1,73e9)	17% (5,25e8)	7% (2,14e8)	2% (6,02e7)
Producto Sepax	41% (1,71e8)	5% (1,95e7)	13% (5,3e7)	1% (5,13e6)
Producto FAST	94% (4,7e7)	2% (8,3e5)	4% (1,8e6)	0% (8,34e3)

	% de células vivas totales (número de células totales)			
	Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
APH	48%	14%	10%	5%
Prod CS5	58% (5,2e8)	17% (1,57e8)	7% (6,41e7)	2% (1,8e7)
Producto FAST	90% (1,22e8)	0% (3,96e5)	4% (5,5e6)	0% (7,32e3)

FIG. 23A

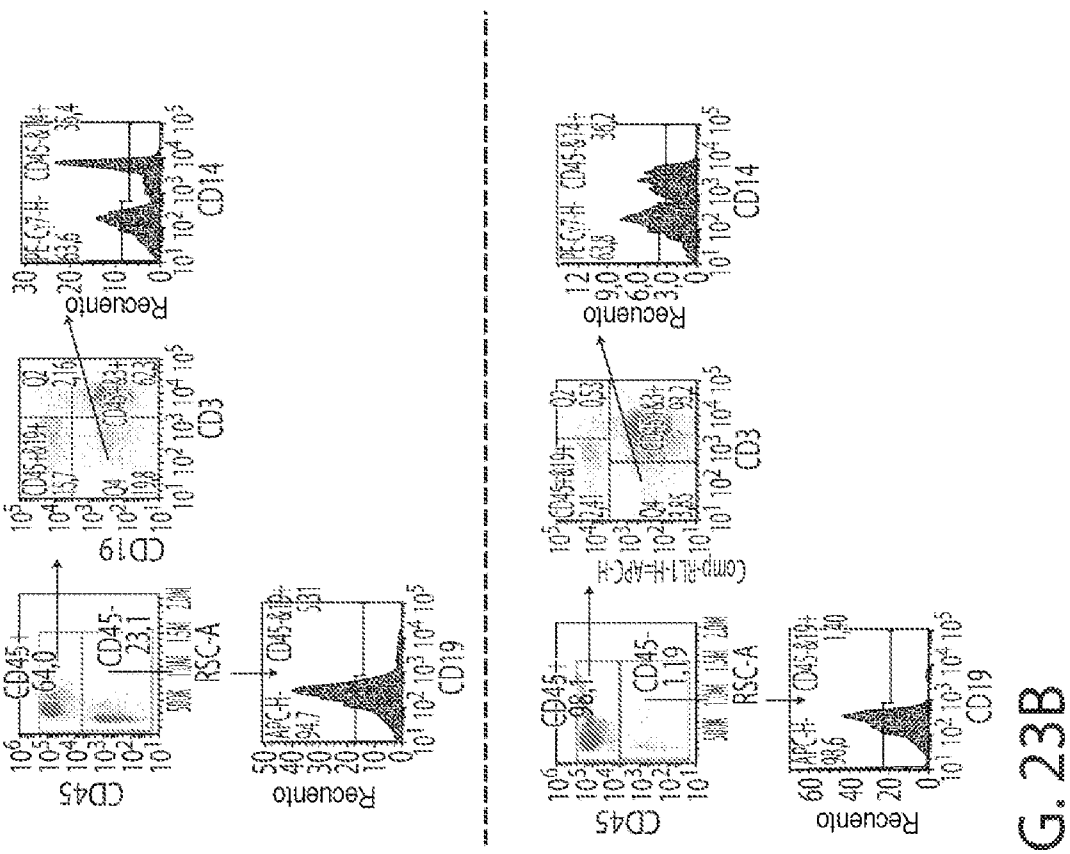


FIG. 23B

Brazo Experimental 1

Producto Sepax

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
41% (1,71e8)	5% (1,95e7)	13% (5,3e7)	1% (5,13e6)

Producto FAST

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
94% (4,7e7)	2% (8,3e5)	4% (1,8e6)	0% (8,34e3)

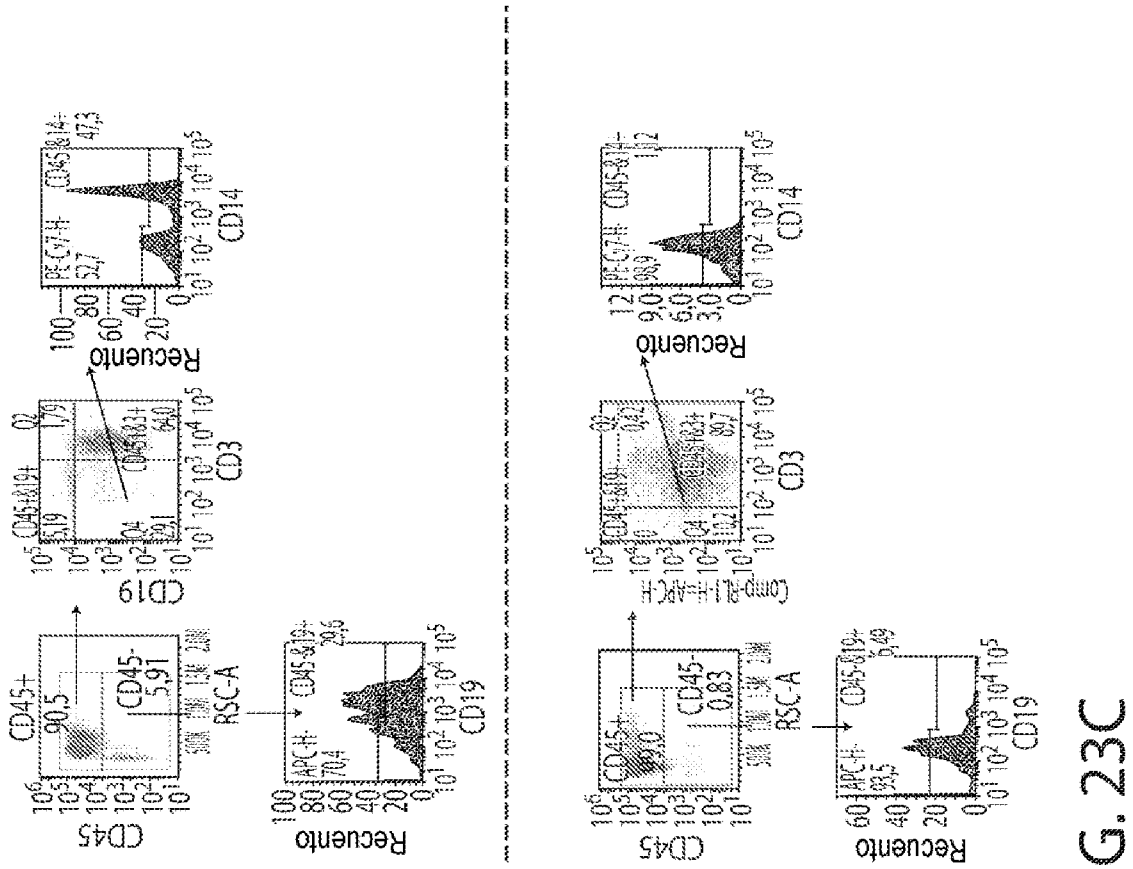


FIG. 23C

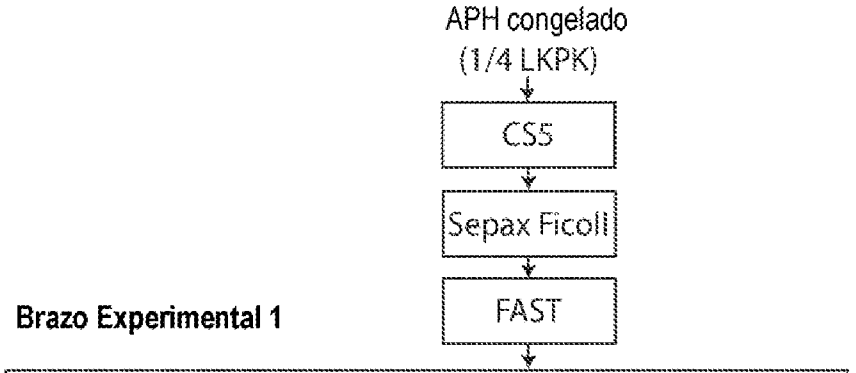
Brazo Experimental 2

Producto CS5

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
58% (5,2e8)	17% (1,57e8)	7% (6,41e7)	2% (1,8e7)

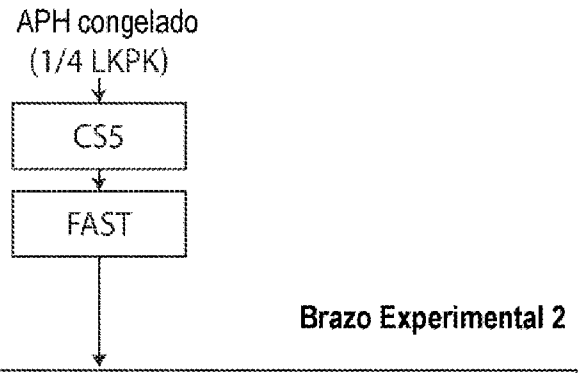
Producto FAST

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
90% (1,22e8)	0% (3,96e5)	4% (5,5e6)	0% (7,32e4)



% de células vivas totales (número de células totales)

	Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
APH	56%	14%	12%	2%
Prod CS5	58% (1,62e9)	15% (4,11e8)	12% (3,46e8)	2% (4,26e7)
Producto Sepax	38% (2,52e8)	28% (1,84e8)	18% (1,2e8)	0% (8,1e5)
Producto FAST	95% (8,7e7)	1% (1,2e6)	5% (4,3e6)	0% (6,0e3)



% de células vivas totales (números de células totales)

	Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
APH	53%	16%	16%	3%
Prod CS5	57% (1,05e9)	13% (2,38e8)	12% (2,29e8)	3% (5,28e7)
Producto FAST	92% (2,8e8)	0% (8,25e5)	2% (4,86e6)	0% (2,36e4)

FIG. 24A

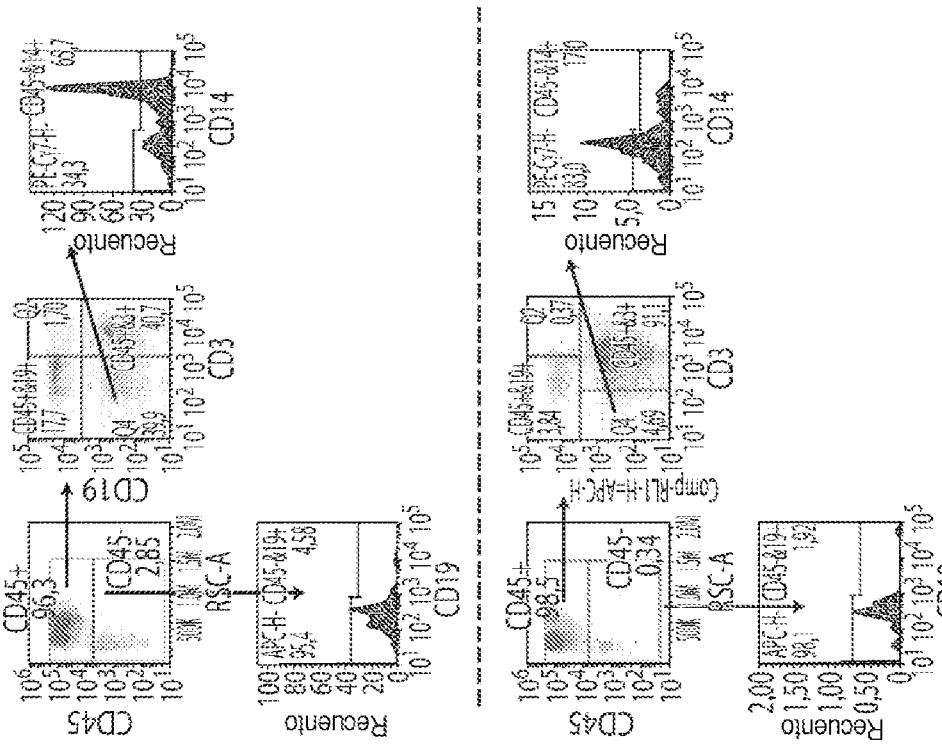


FIG. 24B

Brazo Experimental 1

Producto Sepax

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
38% (2,52e8)	28% (1,84e8)	18% (1,2e8)	0% (8,1e5)

Producto FAST

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
95% (8,7e7)	1% (1,2e6)	5% (4,3e6)	0% (6,0e3)

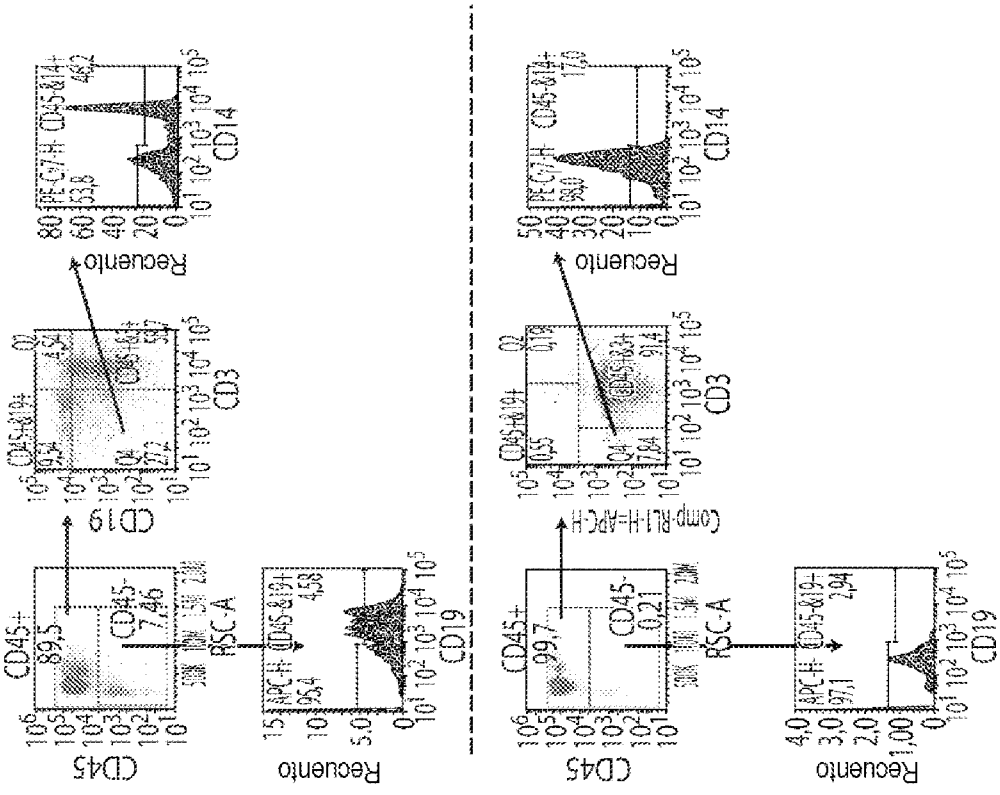


FIG. 24C

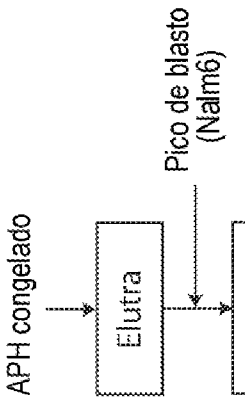
Brazo Experimental 2

Producto CS5

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
57% (1,05e9)	13% (2,38e8)	12% (2,29e8)	3% (5,28e7)

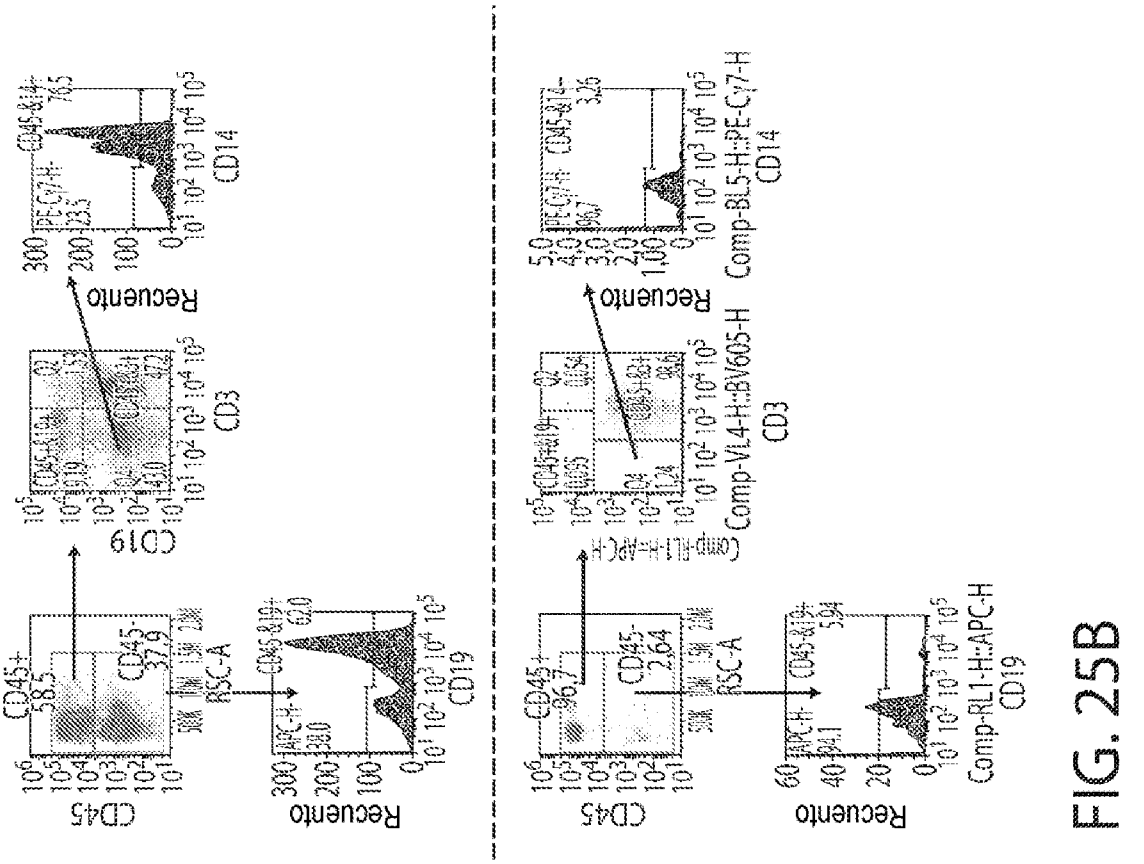
Producto FAST

Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
92% (2,8e8)	0% (8,25e5)	2% (4,86e6)	0% (2,36e4)



	% de células vivas totales (números de células totales)			
	Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
APH	20%	43%	5%	2%
Producto Elutra (pre pico Nalm6)	32% (3,98E7)	26% (3,26E7)	4% (5,36E6)	0% (5,36E4)
Producto Elutra (post pico Nalm6)	29% (4,1E7)	20% (2,94E7)	7% (9,86E6)	24% (3,42E7)
Producto FAST	95% (1,37e7)	1% (1,77e5)	0% (4,67E4)	0% (2,24E4)

FIG. 25A



Producto Elutra (post pico Nalm6)			
Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
29% (4,1E7)	20% (2,94E7)	7% (9,86E6)	24% (3,42E7)

Producto Elutra (post pico Nalm6)			
Células T CD45+/3+	Monocitos CD45+/14+	Células B CD45+/19+	Blastos/Nalm6 CD45-/19+
95% (1,37e7)	1% (1,77e5)	0% (4,67E4)	0% (2,24E4)

FIG. 25B

Fiabilidad TRD (donante sano)	%de B en Aféresis (post lavado)	% de B tras proceso en CliniMacs
Fiabilidad CliniMacs estudio#1	17,6%	0,01%
Fiabilidad CliniMacs estudio#1	15,0%	0,05%

Paciente MP AAAG1 (nivel alto de blastos)	Recogida CliniMacs	Fracción negativa CliniMacs	Fracción Negativa
Células T	49,0	15,0	15,1
Células B	0,1	78,2	76,6
Células NK	47,5	0,7	6,1
Células NKT	25,2	0,6	1,4
Monocitos	1,9	0,1	1,3
Granulocitos	0,1	0,0	0,0
Células dendríticas	0,4	0,0	0,0

FIG. 26A

TRD-TR#	% T en Aféresis	% T en células sembradas	Recuperación de rendimiento de célula T	% B en Aféresis	% B en células sembradas	% monocito en Aféresis	% monocito en células sembradas
TR149 (Proceso B)	55,0%	20,8%	18% para Sepax y 20% para selección positiva de CD23/CD28	17,7%	10,5%	15,3%	32,1%
TR150 (Elutra + CliniMACs)		82,4%	65% para Elutra; 85,0% para Clinimacs		0,0%		1,1%
TR151 (Elutra + Selección positiva)		32,6%	65% para Elutra; 20 % para selección positiva de CD23/CD28		11,7%		0,5%

FIG. 26B

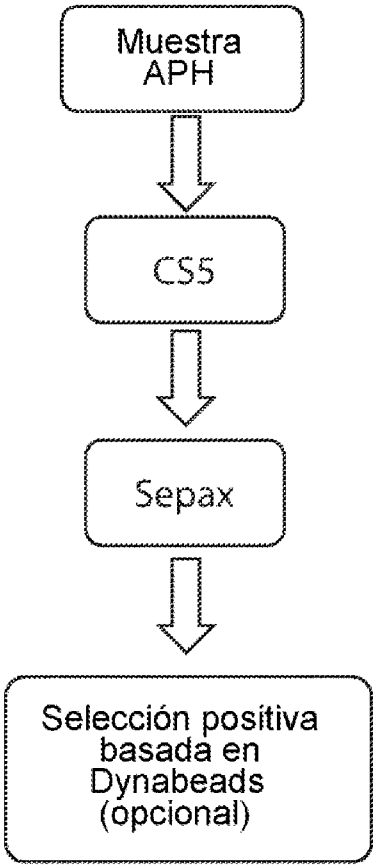

Muestra APH
CS5
Sepax
Selección positiva basada en Dynabeads (opcional)

FIG. 27

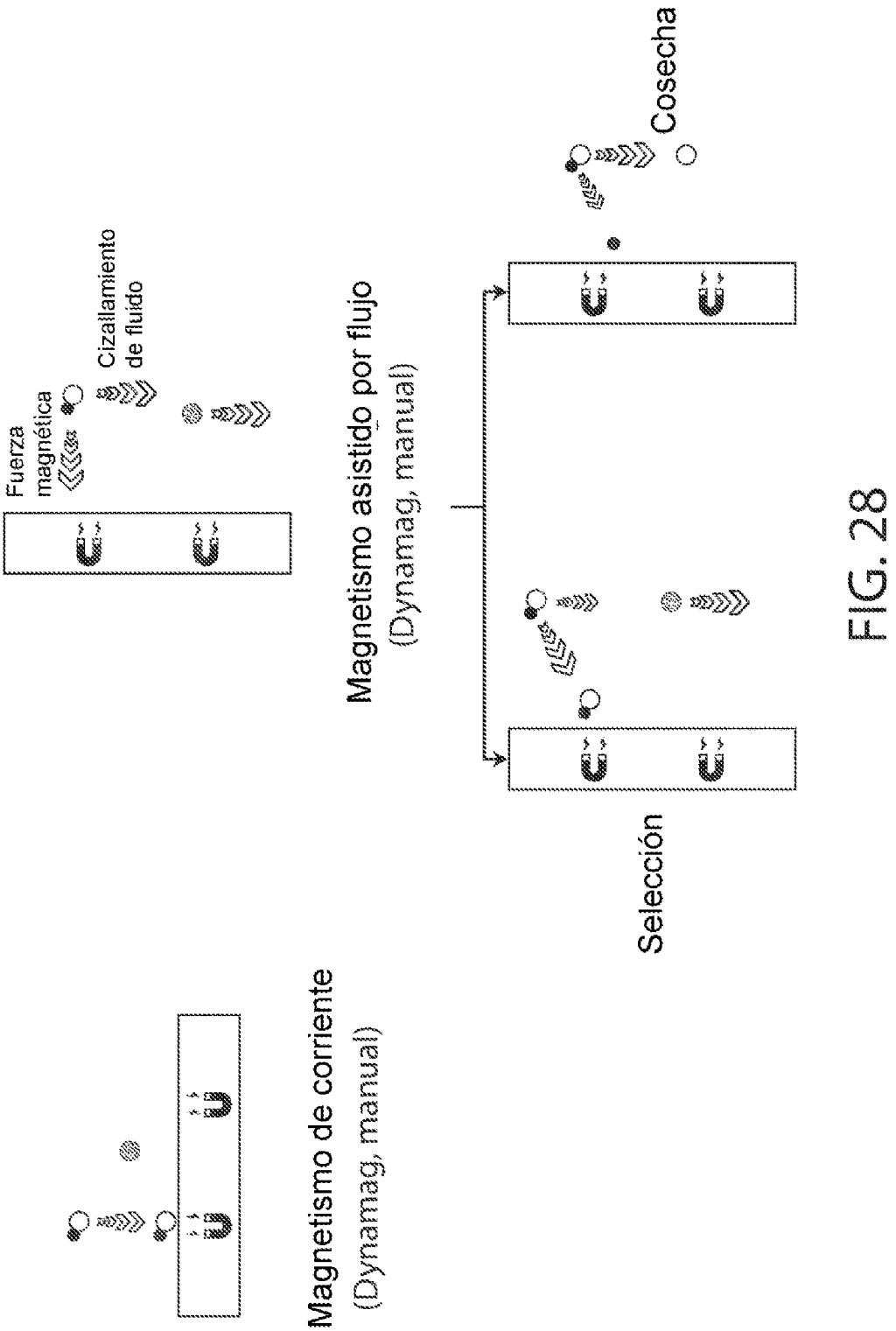

Fuerza magnética
Cizallamiento de fluido
Magnetismo de corriente
(Dynamag, manual)
Magnetismo asistido por flujo
(Dynamag, manual)
Selección
Cosecha

FIG. 28

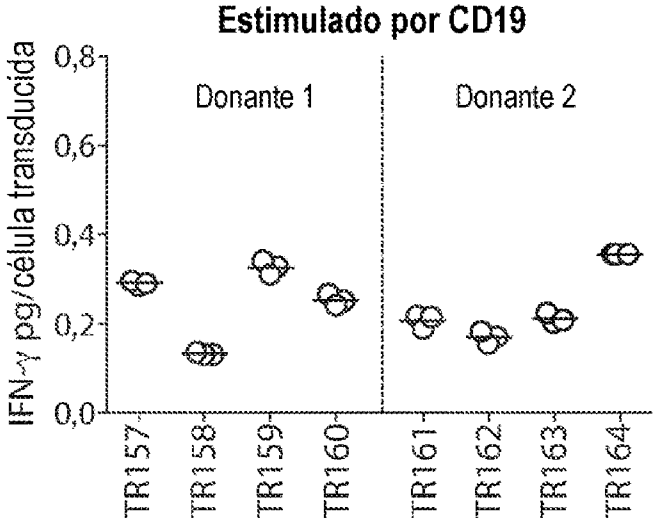


FIG. 29A

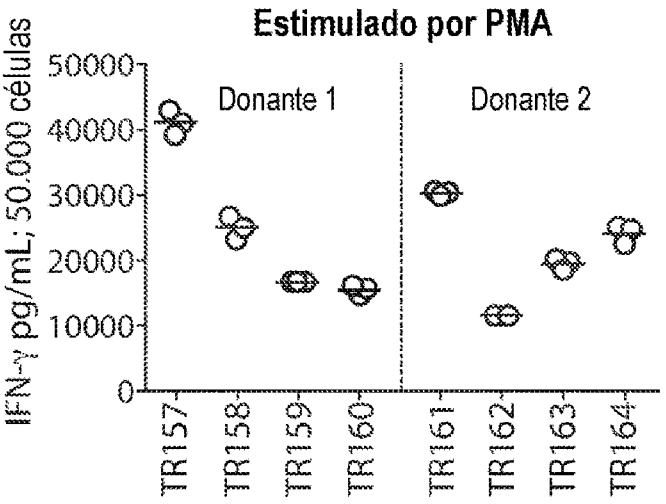


FIG. 29B

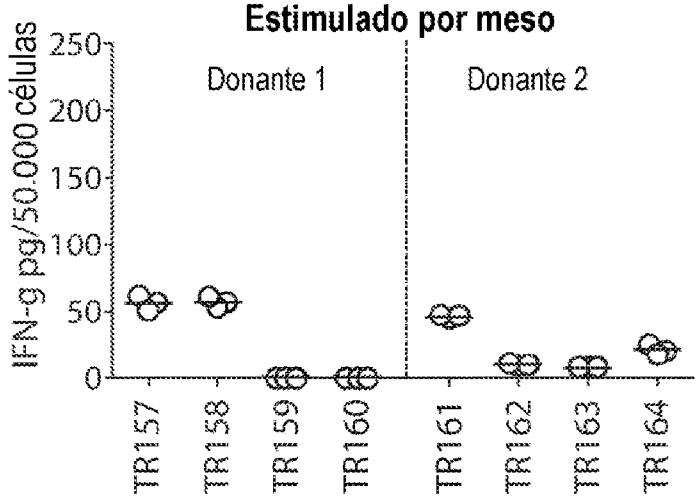


FIG. 29C

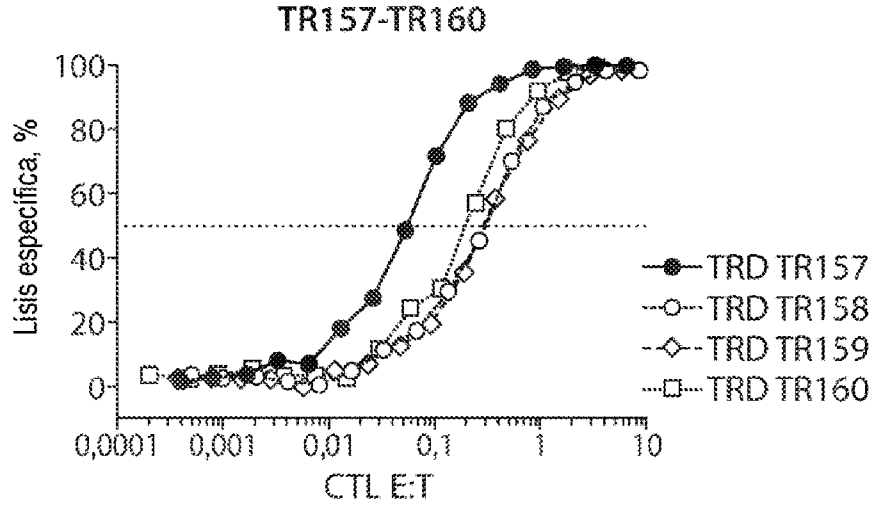


FIG. 30A

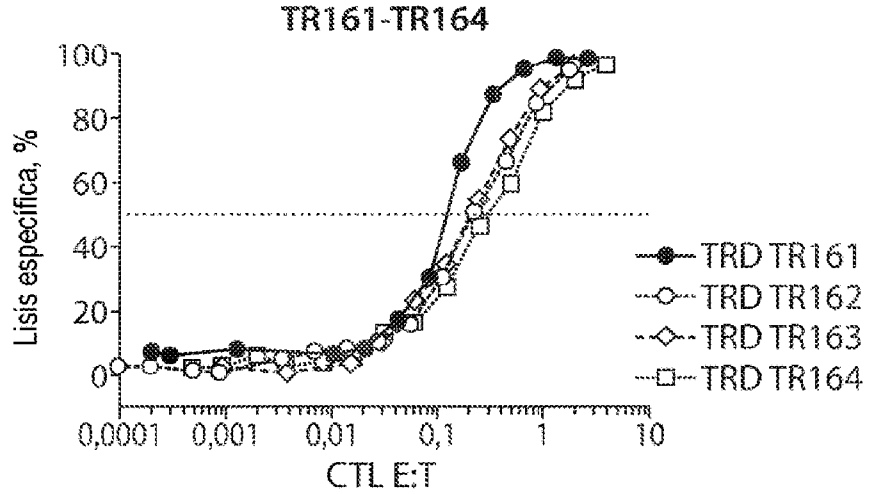


FIG. 30B

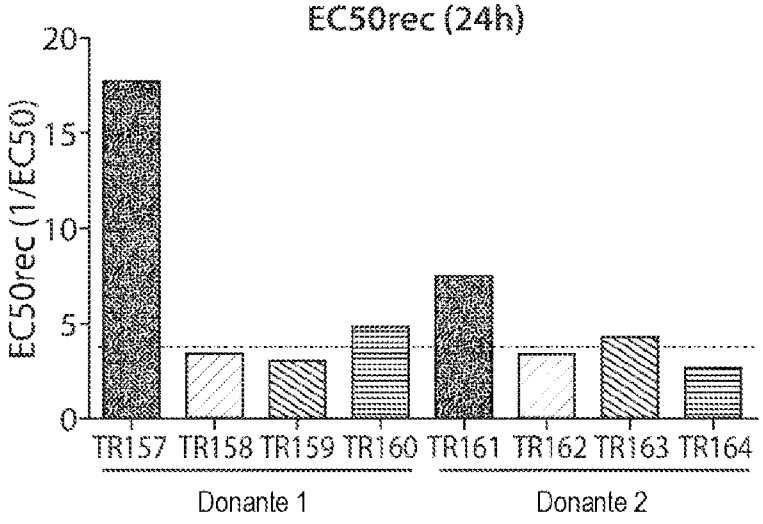


FIG. 30C

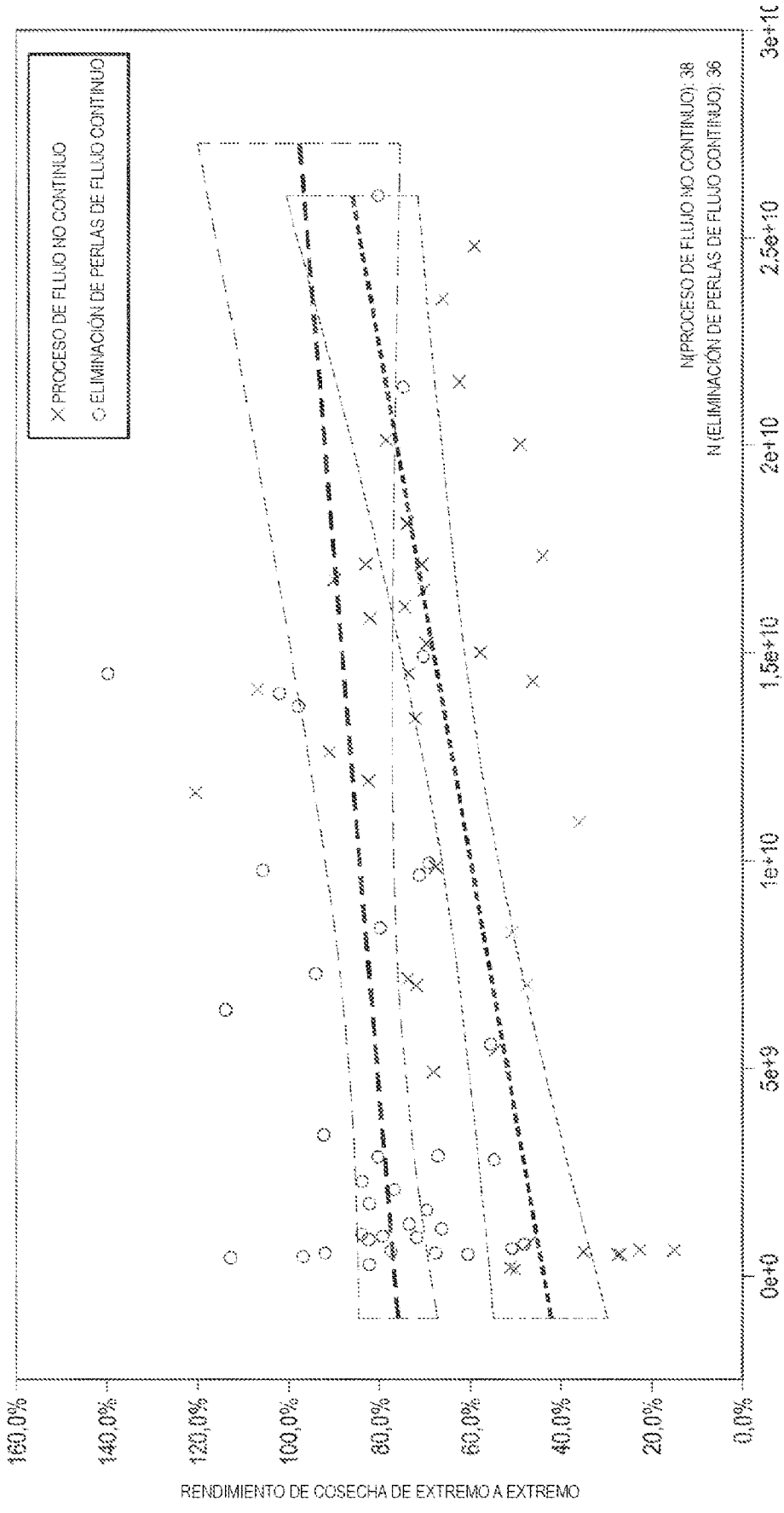

X PROCESO DE FLUJO NO CONTINUO
O ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTINUO
N(PROCESO DE FLUJO NO CONTINUO): 38
N (ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTINUO): 36
160,0%
140,0%
120,0%
100,0%
80,0%
60,0%
40,0%
20,0%
0,0%
0e+0
5e+9
1e+10
1,5e+10
2e+10
2,5e+10
3e+10
RENDIMIENTO DE COSECHA DE EXTREMO A EXTREMO
RESIDUO/ENTRADA DE MUESTRA (CÉLULAS TOTALES)

FIG. 31

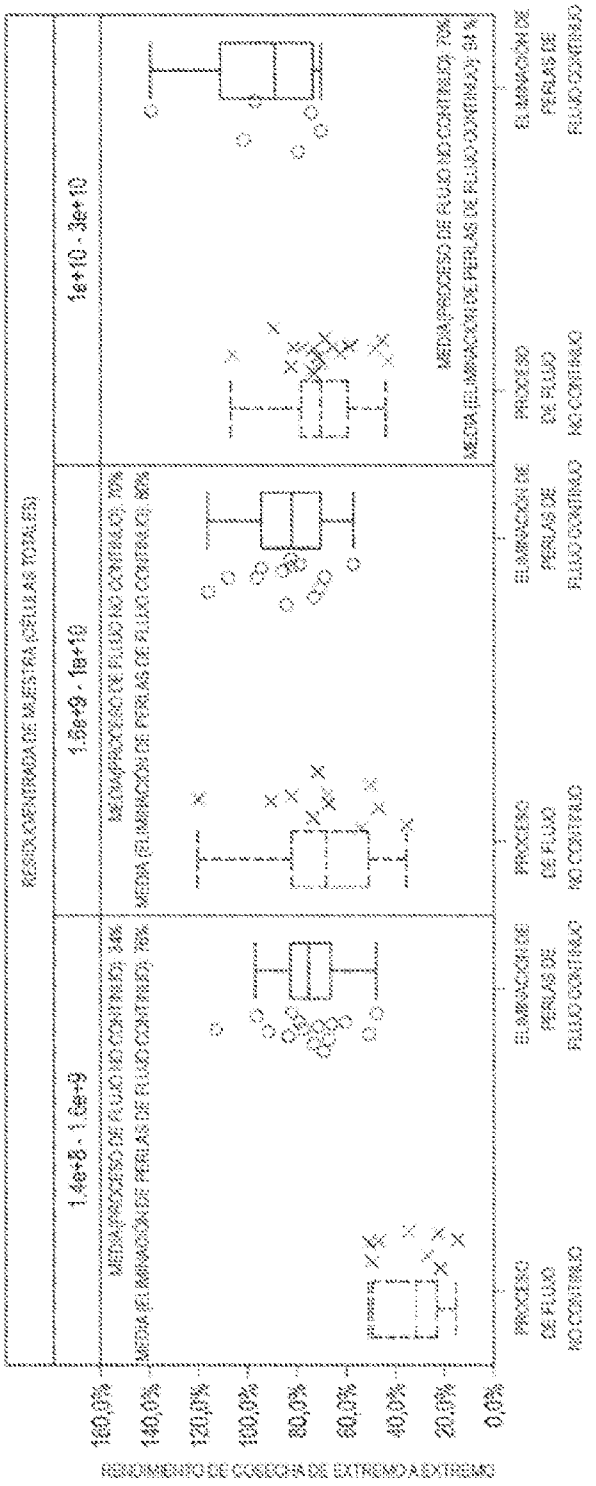

RESTA CONCENTRADA DE MUESTRA (CÉLULAS TOTALES)
1.4e+8 - 1.6e+8
1.8e+9 - 1e+10
1e+10 - 3e+10
MEDIA PROCESO DE FLUJO NO CONTIENE: 34%
MEDIA ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTIENE: 78%
MEDIA PROCESO DE FLUJO NO CONTIENE: 70%
MEDIA ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTIENE: 86%
MEDIA PROCESO DE FLUJO NO CONTIENE: 79%
MEDIA ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTIENE: 91%
160,0%
140,0%
120,0%
100,0%
80,0%
60,0%
40,0%
20,0%
0,0%
RENDIMIENTO DE COSECHA DE EXTREMO A EXTREMO
PROCESO DE FLUJO NO CONTIENE
ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTIENE
PROCESO DE FLUJO NO CONTIENE
ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTIENE
PROCESO DE FLUJO NO CONTIENE
ELIMINACIÓN DE PERLAS DE FLUJO CONTIENE
TIPO DE ELIMINACIÓN

FIG. 32